

МЕТИОНИНОВАЯ ЗАВИСИМОСТЬ РАКОВЫХ КЛЕТОК – МИШЕНЬ МЕТИОНИНАЗЫ

Обзор

© 2023 В.С. Покровский^{1,2,3*}, Л. Або Кура^{1,2}, Е.А. Демидова¹, Ц. Хань⁴, Р.М. Хоффман^{4,5}

¹ Национальный медицинский исследовательский онкологический центр им. Н.Н. Блохина
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
115478 Москва, Россия; электронная почта: v.pokrovsky@ronc.ru

² Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины
Российского университета дружбы народов (РУДН),
117198 Москва, Россия; электронная почта: louay.ko@gmail.com

³ Научно-технологический университет «Сириус», отдел биотехнологии, 354340 Сочи, Россия

⁴ AntiCancer Inc., 92111 Сан-Диего, Калифорния, США; электронная почта: all@anticancer.com

⁵ Калифорнийский университет, отделение хирургии,
92037-7400 Сан-Диего, Ла-Хойя, Калифорния, США

Поступила в редакцию 11.02.2023

После доработки 12.03.2023

Принята к публикации 13.03.2023

Все типы раковых клеток отличаются метиониновой зависимостью, известной как эффект Хоффмана. Ограничение поступления метионина (L-Met) подавляет рост и пролиферацию раковых клеток, между тем как нормальные клетки от дефицита L-Met не страдают. Метиониновая зависимость является мишенью метиониназы (METase), которая показала свою эффективность и безопасность на всех изученных типах опухолевых моделей *in vitro* и *in vivo*, как в монотерапии, так и в комбинации с другими противоопухолевыми препаратами. Примерно 6 лет назад была получена METase, которая может применяться перорально как добавка к пище, улучшая результаты лечения некоторых пациентов с распространёнными опухолями. К настоящему моменту METase была изучена в 8 клинических исследованиях, включая 2 в 1990-х гг. и 6 – в более позднее время. Этот обзор посвящён клиническим исследованиям ограничения поступления L-Met в опухолевые клетки при помощи METase, в частности, при помощи пероральной лекарственной формы METase или в комбинации с другими препаратами в лечении пациентов с прогрессирующим раком.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: метиониновая зависимость, метионин-γ-лиаза, пероральная METase, эффект Хоффмана, клиническое исследование, ограничение метионина, разрушающий метионин фермент.

DOI: 10.31857/S0320972523070072, EDN: FXHDNJ

ВВЕДЕНИЕ

Более чем 60 лет исследований метаболизма раковых клеток показали, что отсутствие определённых аминокислот подавляет рост и пролиферацию раковых клеток гораздо более выражено, чем для нормальных клеток [1]. Sugimura et al. впервые показали, что удаление аминокислоты метионина (L-Met) из диеты крыс с опухолями уменьшает рост опухоли более выражено, чем удаление других

аминокислот [1]. 50 лет назад была обнаружена зависимость опухолевых клеток от L-Met [2], которая получила название «эффекта Хоффмана» [3]. Зависимость от L-Met обусловлена повышенной потребностью в этой аминокислоте опухолевых клеток, которые расходуют её на реакции трансметилирования [2, 4–8].

Ограничение поступления L-Met может быть эффективной стратегией в лечении опухолей, зависимых от L-Met для роста и выживания, между тем как на нормальные клетки

Принятые сокращения: CEA – карциноэмбриональный антиген; L-Hcy – L-гомоцистеин; L-Met – метионин; METase – метиониназа; o-gMETase – пероральная gMETase; PSA – простат-специфичный антиген; gMETase – рекомбинантная METase; SAM – аденозилметионин.

* Адресат для корреспонденции.

ограничение L-Met в присутствии L-гомоцистеина (L-Hcy) выраженного цитотоксического действия не оказывает [2, 4, 9, 10]. В нескольких исследованиях *in vivo* использовалась ограничивающая L-Met диета и сообщалось об ингибировании роста опухоли и возрастающей продолжительности жизни животных [11, 12].

Вегетарианская диета, которая может уменьшить поступление L-Met, может быть эффективной стратегией, предотвращающей рост опухолей у человека [11, 12], но при этом снижение уровня L-Met в организме может быть недостаточным. Другой эффективной стратегией, препятствующей опухолевому росту, может быть использование метиониназы (METase), которая уменьшает концентрацию L-Met в кровотоке [13]. Ограничение поступления L-Met с пищей в сочетании с химиотерапией было впервые использовано почти 40 лет назад [14]. Современные исследования делают акцент на применении METase в сочетании с другими химиотерапевтическими агентами [15–20].

Настоящий обзор посвящён эффективности METase, в частности, её пероральной лекарственной формы, в качестве самостоятельного средства или в комбинации с химиотерапевтическими агентами при лечении пациентов с поздней стадией злокачественных новообразований, включая гормон-независимый рак простаты, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки и инвазивный дольковый рак молочной железы.

МЕТАБОЛИЗМ L-Met

L-Met — серосодержащая аминокислота, необходимая для жизнедеятельности и роста клеток. Метаболизм L-Met можно разделить на три различных пути: (1) цикл L-Met, который продуцирует аденозилметионин (SAM) [21]; (2) путь восстановления L-Met, который перерабатывает L-Met из побочных продуктов (S-метил-5'-тиоаденозина) пути синтеза полиаминов [3]; и (3) путь транссульфурации, который продуцирует антиоксидант глутатион (рисунки) [3]. Кроме того, поскольку метаболизм фолатов и цикл L-Met тесно связаны, они оба могут косвенно влиять на биосинтез нуклеотидов. Фолаты необходимы для синтеза L-Met (рисунки), и неудивительно, что раковые заболевания зависимы от фолиевой кислоты [10].

На первом этапе метаболизма L-Met метионинаденозилтрансфераза (MAT; EC 2.5.1.6) в присутствии АТФ катализирует образование SAM из L-Met, который используется как кофактор в большинстве реакций метилирова-

ния и является основным донором метильных групп для метилирования ДНК, РНК и хроматина [3, 9, 22]. SAM впоследствии превращается в S-аденозилгомоцистеин (SAH) через серию реакций трансметилирования. SAH затем при помощи аденозилгомоцистеиназы распадается на гомоцистеин, который может затем реметилироваться с получением L-Met метионинсинтазой (MS; EC 2.1.1.13) в присутствии N₅-метилтетрагидрофолата (N₅-MTHF) и кобаламина как кофактора полного метионинового цикла [3].

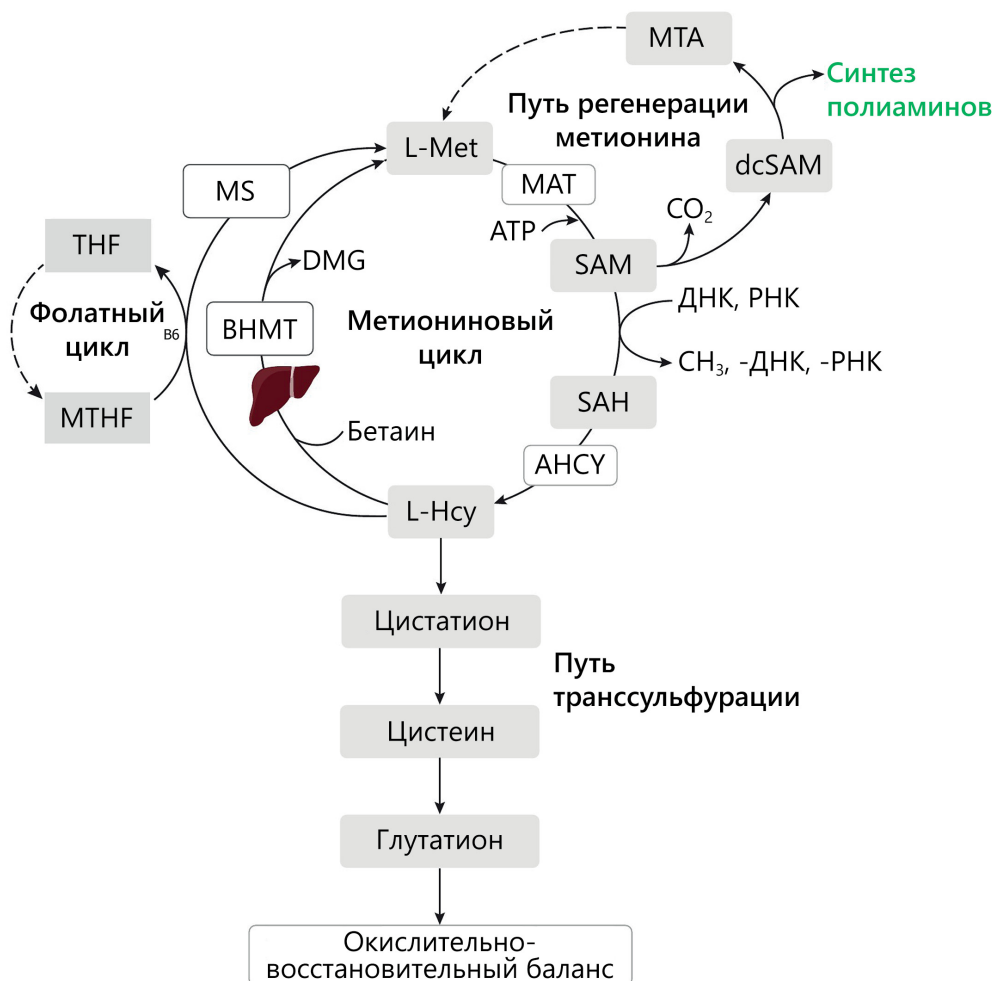
В нормальных условиях MS реметилирует приблизительно 50% L-Hcy с образованием L-Met во всех тканях. Активность MS необходима не только для реметилирования L-Hcy, но также и для поддержания клеточных уровней восстановленного тетрагидрофолата, который необходим для одноуглеродного метаболизма в клетках [3, 23]. L-Hcy может также быть реметилирован с использованием бетаина, который образуется из холина бетаингомоцистеин-S-метилтрансферазой (BHMT; EC 2.1.1.5), которая экспрессируется преимущественно в печени и почках и не зависит от присутствия фолатов [3].

Альтернативно, цистатион-бета-синтаза (EC 4.2.1.22) может преобразовывать L-Hcy в пути транссульфурации, где L-Hcy превращается в цистатион, который затем под действием цистатионазы (EC 4.4.1.1) превращается в цистеин, использующийся в синтезе глутатиона и поддержании окислительно-восстановительного баланса [3].

Низкий уровень L-Met — причина падения уровня SAM, который имеет следующие эффекты: (1) ингибирование ферментов BHMT и MTHFR и предотвращение активации цистатион-бета-синтазы для поддержания цикла L-Met [3]; (2) накопление 5-MTHF, который ингибирует глицин-N-метилтрансферазу и переключает потребление SAM на ДНК-метилтрансферазы [3]; и (3) преимущественное усиление экспрессии гена *MAT*, что говорит о том, что контроль за образованием SAM осуществляется для поддержания его постоянных клеточных уровней [3].

Восстановительные пути также восстанавливают L-Met, который необходим для синтеза полиаминов [3]. SAM декарбоксилируется и утилизируется в синтезе полиаминов [3]. Многочисленные ферментативные шаги требуются для преобразования метилтиоаденозина в метилтиорибозу и, в конечном счёте, в метилтиоксобутират (МТОВ).

Таким образом, биосинтез SAM контролирует сохранение клеточных концентраций SAM.



Обзор метаболизма L-Met: SAM, S-аденозилметионин; MAT, метионинаденозилтрансфераза; SAH, S-аденозилгомоцистеин; АНСУ, аденозилгомоцистеиназа; MS, метионинсинтаза; BHMT, бетаин-гомоцистеин-S-метилтрансфераза; dcSAM, декарбоксилат SAM; MTA, метилтиоаденозин; DMG, диметилглицин; 5-MTHF, 5-метилтетрагидрофолат; и THF, тетрагидрофолат

Эти скоординированные взаимодействия позволяют клеткам поддерживать синтез белков и полиаминов и другие реакции метилирования для клеточного роста и выживания при диете с низким уровнем L-Met.

УЯЗВИМЫЕ МЕСТА МЕТАБОЛИЗМА ОПУХОЛИ: МЕТИОНИНОВАЯ ЗАВИСИМОСТЬ

Метиониновая зависимость является повсеместной и фундаментальной отличительной чертой раковых клеток [24, 25]. Метиониновая зависимость была впервые описана как неспособность опухолевых клеток выживать и расти при замене L-Met в культуральной среде на его предшественник L-Hcy [2, 8, 26–27].

В нормальных и некоторых опухолевых клетках активны естественные пути ресинтеза L-Met из L-Hcy с помощью метионинсинтазы,

тем не менее раковые клетки имеют повышенную потребность в её работе, поскольку используют чрезмерное количество L-Met для реакций трансметилирования и, таким образом, могут быть более уязвимы к дефициту L-Met [5, 27–28].

На сегодняшний день все изученные линии нормальных клеток показали отсутствие метиониновой зависимости и растут почти так же хорошо в среде Met⁻ Hcy⁺, как и в среде Met⁺ Hcy⁻, несмотря на активный синтез L-Met из L-Hcy в раковых клетках [24, 25]. Из 23 исследованных клеточных линий различных типов злокачественных опухолей человека 11 вообще не растут в среде Met⁻ Hcy⁺, таким образом, их можно считать полностью L-Met-зависимыми, и три клеточные линии дают в ней минимальный рост [24]. Впоследствии, используя чувствительность к METase как показатель метиониновой зависимости, все тестируемые раковые клеточные линии были идентифици-

рованы как зависимые от L-Met [25]. Согласно этим результатам, метиониновая зависимость часто наблюдается у многих видов опухолевых клеток человека, и предполагается, что это может быть важным фактором в онкогенной трансформации и терапевтической мишени.

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) с [^{11}C]L-Met показала яркий сигнал и была более специфичной для обнаружения опухолевых клеток, чем изображения, полученные с [^{18}F]дезоксиглюкозой, представляя дополнительные доказательства того, что метиониновая зависимость характерна для всех типов раковых клеток [29]. Эти данные позволяют предположить, что различия потребности в L-Met между раковыми и нормальными клетками могут быть более выраженными, чем различия потребности в глюкозе.

Метиониновая зависимость раковых клеток обусловлена избыточной активацией реакций трансметилирования, которая, вероятно, является причиной гиперметилирования ДНК [22, 30], приводящего к анеуплоидии в опухолевых клетках [22, 30], или же гиперметилированием лизиновых меток гистона H3 [27, 28].

В среде Met⁻ Hcy⁺ ингибирование роста L-Met-зависимых раковых клеток приводит к уменьшению доли делящихся клеток в популяции, в отличие от накопления клеток в фазе G₁ в культуре нормальных фибробластов при высокой плотности в среде с добавлением L-Met [31]. Ограничение L-Met останавливает раковые клетки в фазе S/G₂ клеточного цикла и приводит к гибели клоногенных клеток, которые эквивалентны иницирующим опухоль клеткам, и делает раковые клетки чувствительными к препаратам, специфически действующим на клеточный цикл [28, 31].

ОГРАНИЧЕНИЕ ПОСТУПЛЕНИЯ L-Met

Из-за окислительного стресса и гиперпролиферации, вызванной онкогенным перепрограммированием, раковые клетки имеют высокую потребность в L-Met. Когда происходит такое увеличение потребности в L-Met одновременно с ограничением его доступности, в результате окислительного стресса и отсутствия предшественников нуклеотидов проявляется метаболическая уязвимость, называемая метиониновой зависимостью, которая является отличительной чертой раковых клеток. Использование метиониновой зависимости при диете с низким содержанием L-Met показало многообещающие результаты у онкологиче-

ских больных. Ферменты, снижающие уровень L-Met, в монотерапии или в комбинации с диетой с низким содержанием L-Met и химиотерапевтическими препаратами имеют потенциал как новая парадигма в лечении рака [32].

Метионин-γ-лиаза (methioninase; EC 4.4.1.11, метиониназа, METase) является бактериальным пиридоксаль-5'-фосфат-зависимым ферментом, она катализирует гамма-элиминацию L-Met с образованием альфа-кетомасляной кислоты, метилмеркаптана и аммиака [33–35]. Впервые METase была использована для лечения рака в 1973 г. Kreis et al., когда на модели карциномы крыс Уокера-256 было показано ингибирование роста опухоли ферментом, выделенным из *Clostridium sporogenes* [36]. Этот фермент подавлял рост опухоли более эффективно, чем рацион без L-Met, и не вызывал потерю массы тела [36]. Однократное внутривенное введение METase истощало уровень L-Met в плазме крови до 8% от контрольного уровня [36]. Ген METase был клонирован из *Pseudomonas putida* и экспрессирован в *E. coli* [13], и было показано, что он эффективен против всех типов рака *in vitro* и *in vivo* [37–49]. Пегилированная рекомбинантная METase (rMETase) была использована *in vivo* для увеличения периода полувыведения и минимизации иммунологических реакций [50].

Единственным побочным эффектом внутривенного введения пегилированной rMETase у обезьян была непродолжительная анемия [50]. После внутривенной инъекции кофактор rMETase пиридоксаль-5'-фосфат (PLP) быстро диссоциировал, что привело к снижению активности фермента [50]. Наблюдавшиеся проблемы анафилаксии и диссоциации PLP rMETase были решены при помощи пероральной доставки rMETase (o-rMETase): при пероральном применении rMETase действует в желудочно-кишечном тракте без попадания в кровь. В моделях ортотопических ксено-трансплантатов (PDOX) у мышей o-rMETase продемонстрировала исключительную эффективность против рефрактерной саркомы, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки и меланомы [40–43, 45].

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Ранние клинические испытания рационов питания с ограничением L-Met с химиотерапией и без неё показали многообещающие результаты у некоторых пациентов с поздней стадией рака. С 1990-х гг. были проведены пилотные клинические испытания первой

Резюме клинических исследований METase

Заболевание (состояние)	Тип METase	Количество пациентов	Дозы и режимы применения	Комбинация с другими химио-терапевтическими препаратами	Развитие заболевания	Авторы
Прогрессирующий рак молочной железы	нерекомбинантная METase	3	От 5000 до 20 000 единиц путём внутривенной инфузии в течение 4 или 10 ч однократно	—	—	Tan et al. (1996) [51]
Рак лёгких, молочной железы, лимфома и рак почки на поздних стадиях	гMETase	9	От 5000 до 20 000 единиц в течение 6–24 ч путём внутривенной инфузии однократно	—	—	Tan et al. (1997) [34]
Прогрессирующий рак яичников и рак предстательной железы	о-гMETase	2	500 единиц о-гMETase ежедневно, разделённые на две пероральные дозы по 250 единиц в течение 1 мес. для пациента с раком яичников или 3 мес. для пациента с раком простаты	один пациент: пероральный приём дексаметазона и диета с низким содержанием L-Met	уровень PSA снизился, уровень гемоглобина повысился	Han et al. (2020) [20]
Прогрессирующий рак предстательной железы	о-гMETase	2	500 единиц о-гMETase ежедневно, разделённые на две пероральные дозы по 250 единиц в течение 1 мес.	один пациент: диета с низким содержанием L-Met	уровень PSA снизился	Han et al. (2021) [19]
Прогрессирующий рак предстательной железы	о-гMETase	1	500 единиц о-гMETase ежедневно, разделённые на две пероральные дозы по 250 единиц	—	уровень PSA стабилен	Han et al. (2021) [18]
IV стадия рака поджелудочной железы	о-гMETase	1	500 единиц о-гMETase ежедневно, разделённые на две пероральные дозы по 250 единиц в течение 19 мес.	FOLFIRINOX или FOLFIRI каждые две недели	уровень CA19-9 снизился; объём опухоли не изменился при компьютерной томографии	Kubota et al. (2022) [16]
Рак прямой кишки	о-гMETase	1	500 единиц о-гMETase ежедневно, разделённые на две пероральные дозы по 250 единиц в течение 18 мес.	диета с низким содержанием L-Met	уровень CEA снизился; объём опухоли не изменился при компьютерной томографии	Kubota et al. (2022) [15]
Инвазивная дольковая карцинома молочных желез	о-гMETase	1	250 единиц о-гMETase ежедневно каждые 6 ч в течение 6 мес.	диета с низким содержанием L-Met, доксорубицин и циклофосфамид в течение первых 3 мес., затем доцетаксел в течение следующих 3 мес.	уровень CEA снизился; объём опухоли не изменился при компьютерной томографии и МЕТРЕТ	Kubota et al. (2022) [17]

фазы для оценки цитотоксичности, фармакокинетики, истощения L-Met и определения максимальной переносимой дозы METase, rMETase [34, 51] и недавно появившейся o-rMETase [15–20].

Пробное клиническое испытание первой фазы с использованием нерекомбинантной METase *P. putida* показало отсутствие острой клинической токсичности или побочных эффектов после воздействия METase [51] в дозе менее 20 000 единиц при внутривенной инфузии в течение 10 ч. У пациента 1 (5000 единиц) и пациента 2 (10 000 единиц) с распространённым раком молочной железы истощение L-Met началось через 30 мин после начала инфузии и продолжалось 4 ч после её завершения. Значительное снижение уровня L-Met в сыворотке крови составило 19%, 35% и 50% в конце терапии у пациента 1, пациента 2 и пациента 3 (20 000 единиц в течение 10 ч внутривенной инфузии) соответственно [51]. Результат исследований показал наличие корреляции снижения L-Met с дозой rMETase и временем инфузии.

В другом клиническом исследовании первой фазы была использована rMETase, которая была клонирована из *P. putida* и экспрессирована в *E. coli*, для истощения пула L-Met в сыворотке крови пациентов с раком. Девять пациентов с поздней стадией рака лёгких, молочных желез, лимфомы и рака почки получали однократную внутривенную инфузию rMETase в дозах от 5000 до 20 000 единиц в течение 6–24 ч (таблица). Клинической токсичности не наблюдалось ни у одного пациента после лечения rMETase. Истощение L-Met началось в течение первого часа после начала инфузии rMETase и достигало максимума через 2 ч. Низкая концентрация L-Met сохранялась в течение всей инфузии и 2 ч с момента её окончания. L-Met у пациентов снижался до всего 0,1 мкМ в течение 2 ч, что сопоставимо с 300-кратным истощением без признаков токсичности [34]. Однако авторы не оценивали противоопухолевую активность этого лечения. Согласно этим результатам, rMETase безопасна при внутривенном введении и эффективно истощает свою биохимическую мишень — L-Met сыворотки крови.

Восемь пациентов с различными солидными опухолями, включая гормон-независимый рак простаты, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки и инвазивный дольковый рак молочной железы, получали o-rMETase в качестве отдельной добавки или в комбинации с химиотерапевтическими агентами [15–20].

В ранних клинических исследованиях, проведённых Han et al. [18–20], уровень циркулирующего L-Met у 67-летней женщины с поздней стадией рака яичников снизился на 50% в течение 4 ч после приёма 250 единиц o-rMETase. Четырём взрослым пациентам с прогрессирующим раком простаты было назначено 500 единиц o-rMETase ежедневно, разделённых на 2 пероральные дозы по 250 единиц с разной продолжительностью введения. У пациента 1 уровень простат-специфического антигена (PSA) снизился на 70% с 2000 нг/мл в начале терапии до примерно 600 нг/мл в течение трёх месяцев приёма o-rMETase и дексаметазона перорально (таблица), оба препарата внесли вклад в снижение уровня PSA. За 4 нед. приёма o-rMETase у пациентов 2 и 3 произошло снижение уровня PSA на 38% и 20% соответственно, затем его уровень стабилизировался. Пациент 2 придерживался вегетарианской диеты с низким содержанием L-Met, что могло повлиять на уровни L-Met и PSA. Уровень L-Met у этого пациента снизился на 42,7% в течение 12 дней с использованием o-rMETase. За 6 недель до начала терапии у пациента 4 резко вырос уровень PSA с 38 до 56 нг/мл, но к 15 неделе после начала приёма o-rMETase его уровень стабилизировался на 62 нг/мл. Не наблюдалось клинической токсичности и других побочных эффектов ни у одного из пациентов с прогрессирующим раком предстательной железы после лечения o-rMETase отдельно или в комбинации с диетой с низким содержанием L-Met. Эти результаты позволяют предположить, что диета с низким содержанием L-Met, а также изменение дозы o-rMETase может помочь снизить уровни L-Met и PSA в крови, тем самым предотвращая прогрессию рака простаты.

Согласно статистике, лишь у около 5% пациентов с IV стадией рака поджелудочной железы, принимавших FOLFIRINOX, происходила стабилизация заболевания в течение 18 мес. с момента постановки диагноза [16]. В клиническом исследовании ограничение L-Met при помощи o-rMETase, принимаемой 2 раза в день как добавка к пище, и диеты с низким содержанием L-Met показало очевидно взаимоусиливающий эффект в комбинации с FOLFIRINOX или FOLFIRI каждые 2 недели. Для мониторинга прогрессирования заболевания использовался уровень ракового антигена 19-9 (CA19-9) в крови и компьютерная томография (таблица). У пациента с поздней стадией рака поджелудочной железы заболевание стабилизировалось, и он оставался живым через 19 мес. после постановки диагноза [16].

Другое клиническое исследование осуществлялось с участием пациентов с раком прямой кишки, в нём уровень L-Met снижали с помощью о-гМЕТase и диеты с низким содержанием L-Met. Уровень карциноэмбрионального антигена (СЕА) был стабилен в течение 18 мес. после начала терапии. Пациенты регулярно проходили ректороманоскопию, при которой измерялся размер опухоли (таблица). Согласно этим результатам, о-гМЕТase в качестве добавки к пище и диета с низким содержанием L-Met могут быть эффективны при раке толстой кишки с долгосрочной стабилизацией заболевания [15].

Ограничение L-Met при помощи о-гМЕТase каждые 6 ч в течение 6 мес. и диета с низким содержанием L-Met показали взаимоусиливающий эффект в комбинации с доксорубицином и циклофосфамидом, которые применялись первые 3 мес., затем с доцетакселом в течение последующих 3 мес., что привело к полному ответу, который ожидается менее чем у 10% пациентов с инвазивной дольковой карциномой молочных желез, получающих только неоадьювантную химиотерапию. Уровень СЕА в крови и компьютерная томография использовались для отслеживания развития заболевания, а полный ответ был продемонстрирован с помощью МЕТРЕТ через 6 мес., когда терапия была завершена (таблица) [17].

Ни в одном клиническом исследовании не было выявлено выраженной токсичности или побочных эффектов после длительного периода лечения с о-гМЕТase в виде добавки в дозе 500 единиц в день, разделённой на две пероральные дозы по 250 единиц. Эти результаты предполагают, что использование МЕТase может быть безопасной и эффективной стратегией снижения уровней циркулирующего и внутриклеточного L-Met без изменения диеты, тем самым ускоряя клиническое применение ограничения L-Met.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из описанного выше можно сделать вывод, что о-гМЕТase является важным дополнением

в лечении пациентов с различными видами злокачественных новообразований. Благодаря отсутствию у о-гМЕТase поздних побочных эффектов и токсичности она становится идеальным агентом для стратегии комбинированной терапии поздних стадий рака. С наступлением эры о-гМЕТase иммуногенные осложнения, связанные со способом введения нативных форм фермента (внутривенные инъекции) и необходимостью частого введения, судя по всему, были устранены. Новые технологии сделали возможным проведение обширных фармакокинетических и фармакодинамических исследований о-гМЕТase, что даёт возможность разработать более эффективный режим дозирования препарата для клинического применения. Наилучшие результаты, по-видимому, достигаются посредством фармакологически направленной и индивидуальной терапевтической стратегии. Можно надеяться на скорую разработку деталей такой стратегии, что даст возможность полностью реализовать потенциал гМЕТase в клинической практике. Наконец, выявление L-Met-зависимых биомаркеров опухолей, таких как важные эпигенетические признаки, и более глубокое понимание клеточного ответа на ограничение L-Met в опухолевых клетках могут дать более эффективные методы борьбы с раком за счёт его уникальной метаболической уязвимости.

Вклад авторов. Вадим С. Покровский, Луай Або Кура и Елена А. Демидова — сбор и анализ информации, написание и редактирование рукописи, создание иллюстраций; Цинхун Хань и Роберт М. Хоффман — редактирование рукописи. Все авторы одобрили окончательный вариант рукописи до её представления к публикации.

Финансирование. Данное исследование поддержано государственной программой Министерства образования и науки, госзадание № 075-01551-23-00 (ФССП-2023-0006).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит исследований с участием людей или животных, проведённых кем-либо из авторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sugimura, T., Birnbaum, S. M., Winitz, M., and Greenstein, J. P. (1959) 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.*, **81**, 448-455, doi: 10.1016/0003-9861(59)90225-5.
2. Hoffman, R. M., and Erbe, R. W. (1976) High *in vivo* rates of methionine biosynthesis in transformed human and malignant rat cells auxotrophic for me-

- thionine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1523-1527, doi: 10.1073/pnas.73.5.1523.
3. Kaiser, P. (2020) Methionine dependence of cancer, *Biomolecules*, **10**, 568, doi: 10.3390/biom10040568.
4. Coalson, D. W., Mecham, J. O., Stern, P. H., and Hoffman, R. M. (1982) Reduced availability of endogenously synthesized methionine for S-adenosyl-methionine formation in methionine-dependent cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4248-4251, doi: 10.1073/pnas.79.14.4248.
5. Stern, P. H., and Hoffman, R. M. (1984) Elevated overall rates of transmethylation in cell lines from diverse human tumors, *In Vitro*, **20**, 663-670, doi: 10.1007/BF02619617.
6. Stern, P. H., Mecham, J. O., Wallace, C. D., and Hoffman, R. M. (1983) Reduced free-methionine in methionine-dependent SV40-transformed human fibroblasts synthesizing apparently normal amounts of methionine, *J. Cell. Physiol.*, **117**, 9-14, doi: 10.1002/jcp.1041170103.
7. Singhal, T., Narayanan, T. K., Jacobs, M. P., Bal, C., and Mantil, J. C. (2012) ¹¹C-methionine PET for grading and prognostication in gliomas: a comparison study with ¹⁸F-FDG PET and contrast enhancement on MRI, *J. Nucl. Med.*, **53**, 1709-1715, doi: 10.2967/jnumed.111.102533.
8. Tisdale, M. J. (1980) Effect of methionine deprivation on methylation and synthesis of macromolecules, *Br. J. Cancer*, **42**, 121-128, doi: 10.1038/bjc.1980.210.
9. Hoffman, R. M. (1984) Altered methionine metabolism, DNA methylation and oncogene expression in carcinogenesis, *Biochim. Biophys. Acta BBA Rev. Cancer*, **738**, 49-87, doi: 10.1016/0304-419X(84)90019-2.
10. Hoffman, R. M., Coalson, D. W., Jacobsen, S. J., and Erbe, R. W. (1981) Folate polyglutamate and monoglutamate accumulation in normal and SV40-transformed human fibroblasts, *J. Cell. Physiol.*, **109**, 497-505, doi: 10.1002/jcp.1041090316.
11. Epner, D. E., Morrow, S., Wilcox, M., and Houghton, J. L. (2002) Nutrient intake and nutritional indexes in adults with metastatic cancer on a phase I clinical trial of dietary methionine restriction, *Nutr. Cancer*, **42**, 158-166, doi: 10.1207/S15327914NC422_2.
12. Hoshiya, Y., Guo, H., Kubota, T., Inada, T., Asanuma, F., Yamada, Y., Koh, J., Kitajima, M., Hoffman, R. M. (1995) Human tumors are methionine dependent *in vivo*, *Anticancer Res.*, **15**, 717-718.
13. Tan, Y., Xu, M., Tan, X., Tan, X., Wang, X., Saikawa, Y., Nagahama, T., Sun, X., Lenz, M., and Hoffman, R. M. (1997) Overexpression and large-scale production of recombinant L-methionine- α -deamino- γ -mercaptomethane-lyase for novel anticancer therapy, *Protein Expr. Purif.*, **9**, 233-245, doi: 10.1006/prep.1996.0700.
14. Stern, P. H., and Hoffman, R. M. (1986) Enhanced *in vitro* selective toxicity of chemotherapeutic agents for human cancer cells based on a metabolic defect, *J. Natl. Cancer Inst.*, **76**, 629-639, doi: 10.1093/jnci/76.4.629.
15. Kubota, Y., Han, Q., Hamada, K., Aoki, Y., Masaki, N., Obara, K., Tsunoda, T., and Hoffman, R. M. (2022) Long-term stable disease in a rectal-cancer patient treated by methionine restriction with oral recombinant methioninase and a low-methionine diet, *Anticancer Res.*, **42**, 3857-3861, doi: 10.21873/anticancer.15877.
16. Kubota, Y., Han, Q., Hozumi, C., Masaki, N., Yamamoto, J., Aoki, Y., Tsunoda, T., and Hoffman, R. M. (2022) Stage IV pancreatic cancer patient treated with FOLFIRINOX combined with oral methioninase: a highly-rare case with long-term stable disease, *Anticancer Res.*, **42**, 2567-2572, doi: 10.21873/anticancer.15734.
17. Kubota, Y., Han, Q., Masaki, N., Hozumi, C., Hamada, K., Aoki, Y., Obara, K., Tsunoda, T., and Hoffman, R. M. (2022) Elimination of axillary-lymph-node metastases in a patient with invasive lobular breast cancer treated by first-line neo-adjuvant chemotherapy combined with methionine restriction, *Anticancer Res.*, **42**, 5819-5823, doi: 10.21873/anticancer.16089.
18. Han, Q., and Hoffman, R. M. (2021) Chronic treatment of an advanced prostate-cancer patient with oral methioninase resulted in long-term stabilization of rapidly rising PSA levels, *In Vivo*, **35**, 2171-2176, doi: 10.21873/invivo.12488.
19. Han, Q., and Hoffman, R. M. (2021) Lowering and stabilizing PSA levels in advanced-prostate cancer patients with oral methioninase, *Anticancer Res.*, **41**, 1921-1926, doi: 10.21873/anticancer.14958.
20. Han, Q., Tan, Y., and Hoffman, R. M. (2020) Oral dosing of recombinant methioninase is associated with a 70% drop in PSA in a patient with bone-metastatic prostate cancer and 50% reduction in circulating methionine in a high-stage ovarian cancer patient, *Anticancer Res.*, **40**, 2813-2819, doi: 10.21873/anticancer.14254.
21. Cantoni, G. L. (1975) Biological methylation: selected aspects, *Annu. Rev. Biochem.*, **44**, 435-451, doi: 10.1146/annurev.bi.44.070175.002251.
22. Hoffman, R. M. (2015) Development of recombinant methioninase to target the general cancer-specific metabolic defect of methionine dependence: a 40-year odyssey, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **15**, 21-31, doi: 10.1517/14712598.2015.963050.
23. Pokrovsky, V. S., Abo Qoura, L., Morozova, E., and Bunik, V. I. (2022) Predictive markers for efficiency of the amino-acid deprivation therapies in cancer, *Front. Med.*, **9**, 1035356, doi: 10.3389/fmed.2022.1035356.
24. Mecham, J. O., Rowitch, D., Wallace, C. D., Stern, P. H., and Hoffman, R. M. (1983) The metabolic defect of methionine dependence occurs frequently

- in human tumor cell lines, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**, 429-434, doi: 10.1016/0006-291X(83)91218-4.
25. Tan, Y., Xu, M., and Hoffman, R. M. (2010) Broad selective efficacy of recombinant methioninase and polyethylene glycol-modified recombinant methioninase on cancer cells *in vitro*, *Anticancer Res.*, **30**, 1041-1046.
 26. Yamamoto, J., Han, Q., Inubushi, S., Sugisawa, N., Hamada, K., Nishino, H., Miyake, K., Kumamoto, T., Matsuyama, R., Bouvet, M., Endo, I., and Hoffman, R. M. (2020) Histone methylation status of H3K4me3 and H3K9me3 under methionine restriction is unstable in methionine-addicted cancer cells, but stable in normal cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **533**, 1034-1038, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.09.108.
 27. Yamamoto, J., Inubushi, S., Han, Q., Tashiro, Y., Sugisawa, N., Hamada, K., Aoki, Y., Miyake, K., Matsuyama, R., Bouvet, M., Clarke, S. G., Endo, I., and Hoffman, R. M. (2020) The linkage of methionine addiction, overmethylation of histone H3 lysines and malignancy demonstrated when cancer cells revert to methionine-independence, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.12.04.412437.
 28. Wang, Z., Yip, L. Y., Lee, J. H. J., Wu, Z., Chew, H. Y., Chong, P. K. W., Teo, C. C., Ang, H. Y., Peh, K. L. E., Yuan, J., Ma, S., Choo, L. S. K., Basri, N., Jiang, X., Yu, Q., Hillmer, A. M., Lim, W. T., Lim, T. K. H., Takano, A., Tan, E. H., Tan, D. S. W., Ho, Y. S., Lim, B., and Tam, W. L. (2019) Methionine is a metabolic dependency of tumor-initiating cells, *Nat. Med.*, **25**, 825-837, doi: 10.1038/s41591-019-0423-5.
 29. Kubota, Y., Sato, T., Hozumi, C., Han, Q., Aoki, Y., Masaki, N., Obara, K., Tsunoda, T., and Hoffman, R. M. (2023) Superiority of [¹¹C] methionine over [¹⁸F] deoxyglucose for PET imaging of multiple cancer types due to the methionine addiction of cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 1935, doi: 10.3390/ijms24031935.
 30. Bloomfield, M., and Duesberg, P. (2016) Inherent variability of cancer-specific aneuploidy generates metastases, *Mol. Cytogenet.*, **9**, 90, doi: 10.1186/s13039-016-0297-x.
 31. Hoffman, R. M., and Jacobsen, S. J. (1980) Reversible growth arrest in simian virus 40-transformed human fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7306-7310, doi: 10.1073/pnas.77.12.7306.
 32. Yamamoto, J., Han, Q., Simon, M., Thomas, D., and Hoffman, R. M. (2022) Methionine restriction: ready for prime time in the cancer clinic? *Anticancer Res.*, **42**, 641-644, doi: 10.21873/anticancer.15521.
 33. Tanaka, H., Esaki, N., and Soda, K. (1985) A versatile bacterial enzyme: L-methionine γ -lyase, *Enzyme Microb. Technol.*, **7**, 530-537, doi: 10.1016/0141-0229(85)90094-8.
 34. Tan, Y., Zavala, J., Han, Q., Xu, M., Sun, X., Tan, X., Tan, X., Magana, R., Geller, J., and Hoffman, R. M. (1997) Recombinant methioninase infusion reduces the biochemical endpoint of serum methionine with minimal toxicity in high-stage cancer patients, *Anticancer Res.*, **17**, 3857-3860.
 35. Hoffman, R. M. (2017) Is DNA methylation the new guardian of the genome? *Mol. Cytogenet.*, **10**, 11, doi: 10.1186/s13039-017-0314-8.
 36. Kreis, W., and Hession, C. (1973) Biological effects of enzymatic deprivation of L-methionine in cell culture and an experimental tumor, *Cancer Res.*, **33**, 1866-1869.
 37. Higuchi, T., Kawaguchi, K., Miyake, K., Han, Q., Tan, Y., Oshiro, H., Sugisawa, N., Zhang, Z., Razmjooei, S., Yamamoto, N., Hayashi, R., Kimura, H., Miwa, S., Igarashi, K., Chawla, S. P., Singh, A. S., Eilber, F. C., Singh, S. R., Tsuchiya, H., and Hoffman, R. M. (2018) Oral recombinant methioninase combined with caffeine and doxorubicin induced regression of a doxorubicin-resistant synovial sarcoma in a PDOX mouse model, *Anticancer Res.*, **38**, 5639-5644, doi: 10.21873/anticancer.12899.
 38. Higuchi, T., Oshiro, H., Miyake, K., Sugisawa, N., Han, Q., Tan, Y., Park, J., Zhang, Z., Razmjooei, S., Yamamoto, N., Hayashi, K., Kimura, H., Miwa, S., Igarashi, K., Bouvet, M., Chawla, S. P., Singh, S. R., Tsuchiya, H., and Hoffman, R. M. (2019) Oral recombinant methioninase, combined with oral caffeine and injected cisplatin, overcome cisplatin-resistance and regresses patient-derived orthotopic xenograft model of osteosarcoma, *Anticancer Res.*, **39**, 4653-4657, doi: 10.21873/anticancer.13646.
 39. Higuchi, T., Sugisawa, N., Yamamoto, J., Oshiro, H., Han, Q., Yamamoto, N., Hayashi, K., Kimura, H., Miwa, S., Igarashi, K., Tan, Y., Kuchipudi, S., Bouvet, M., Singh, S. R., Tsuchiya, H., and Hoffman, R. M. (2020) The combination of oral-recombinant methioninase and azacitidine arrests a chemotherapy-resistant osteosarcoma patient-derived orthotopic xenograft mouse model, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **85**, 285-291, doi: 10.1007/s00280-019-03986-0.
 40. Kawaguchi, K., Han, Q., Li, S., Tan, Y., Igarashi, K., Kiyuna, T., Miyake, T., Miyake, M., Chmielowski, B., Nelson, S. D., Russell, T. A., Dry, S. A., Li, Y., Singh, A. S., Eckardt, M. A. R., Unno, M., Eilber, F. C., and Hoffman, R. M. (2018) Targeting methionine with oral recombinant methioninase (o-rMETase) arrests a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) model of BRAF-V600E mutant melanoma: implications for chronic clinical cancer therapy and prevention, *Cell Cycle*, **17**, 356-361, doi: 10.1080/15384101.2017.1405195.
 41. Kawaguchi, K., Han, Q., Li, S., Tan, Y., Igarashi, K., Murakami, T., Unno, M., and Hoffman, R. M. (2019) Efficacy of recombinant methioninase (rMETase) on recalcitrant cancer patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) mouse models: a review, *Cells*, **8**, 410, doi: 10.3390/cells8050410.

42. Kawaguchi, K., Higuchi, T., Li, S., Han, Q., Tan, Y., Igarashi, K., Zhao, M., Miyake, K., Kiyuna, T., Miyake, M., Ohshiro, H., Sugisawa, N., Zhang, Z., Razmjooei, S., Wangsiricharoen, S., Chmielowski, B., Nelson, S. D., Russell, T. A., Dry, S. M., Li, Y., and Hoffman, R. M. (2018) Combination therapy of tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R and oral recombinant methioninase regresses a BRAF-V600E-negative melanoma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **503**, 3086-3092, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.08.097.
43. Kawaguchi, K., Miyake, K., Han, Q., Li, S., Tan, S., Igarashi, K., Kiyuna, K., Miyake, M., Higuchi, T., Oshiro, H., Zhang, Z., Razmjooei, S., Wangsiricharoen, S., Bouvet, M., Singh, S. R., Unno, M., and Hoffman, R. M. (2018) Oral recombinant methioninase (o-rMETase) is superior to injectable rMETase and overcomes acquired gemcitabine resistance in pancreatic cancer, *Cancer Lett.*, **432**, 251-259, doi: 10.1016/j.canlet.2018.06.016.
44. Yoshioka, T., Wada, T., Uchida, N., Maki, H., Yoshida, H., Ide, N., Kasai, H., Hojo, K., Shono, K., Maekawa, R., Yagi, S., Hoffman, R. M., and Sugita, K. (1998) Anticancer efficacy *in vivo* and *in vitro*, synergy with 5-fluorouracil, and safety of recombinant methioninase, *Cancer Res.*, **58**, 2583-2587.
45. Oshiro, H., Tome, Y., Kiyuna, T., Yoon, S. N., Lwin, T. M., Han, Q., Tan, Y., Miyake, K., Higuchi, T., Sugisawa, N., Katsuya, Y., Park, J. H., Zang, Z., Razmjooei, S., Bouvet, M., Clary, B., Singh, S. R., Kanaya, F., Nishida, F., and Hoffman, R. M. (2019) Oral recombinant methioninase overcomes colorectal-cancer liver metastasis resistance to the combination of 5-fluorouracil and oxaliplatin in a patient-derived orthotopic xenograft mouse model, *Anticancer Res.*, **39**, 4667-4671, doi: 10.21873/anticancer.13648.
46. Morozova, E. A., Kulikova, V. V., Yashin, D. V., Anufrieva, N. V., Anisimova, N. Y., Revtovich, S. V., Kotlov, M. I., Belyi, Y. F., Pokrovsky, V. S., and Demidkina, T. V. (2013) Kinetic Parameters and Cytotoxic Activity of Recombinant Methionine γ -Lyase from *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, *Porphyromonas gingivalis* and *Citrobacter freundii*, *Acta Naturae*, **5**, 92-98, doi: 10.32607/20758251-2013-5-3-92-98.
47. Morozova, E. A., Anufrieva, N. V., Davydov, D. Zh., Komarova, M. V., Dyakov, I. N., Rodionov, A. N., Demidkina, T. V., and Pokrovsky, V. S. (2017) Plasma methionine depletion and pharmacokinetic properties in mice of methionine γ -lyase from *Citrobacter freundii*, *Clostridium tetani* and *Clostridium sporogenes*, *Biomed. Pharmacother.*, **88**, 978-984, doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.127.
48. Pokrovsky, V. S., Anisimova, N. Y., Davydov, D. Zh., Bazhenov, S. V., Bulushova, N. V., Zavilgelsky, G. B., Kotova, V. Y., and Manukhov, I. V. (2019) Methionine gamma lyase from *Clostridium sporogenes* increases the anticancer effect of doxorubicin in A549 cells and human cancer xenografts, *Invest. New Drugs*, **37**, 201-209, doi: 10.1007/s10637-018-0619-4.
49. Pokrovsky, V. S., Chepikova, O. E., Davydov, D. Zh., Zamyatnin, A. A., Lukashev, A. N., and Lukasheva, E. V. (2019) Amino acid degrading enzymes and their application in cancer therapy, *Curr. Med. Chem.*, **26**, 446-464, doi: 10.2174/0929867324666171006132729.
50. Yang, Z., Wang, J., Yoshioka, T., Li, B., Lu, Q., Li, S., Sun, X., Tan, Y., Yagi, S., Frenkel, E. P., and Hoffman, R. M. (2004) Pharmacokinetics, methionine depletion, and antigenicity of recombinant methioninase in primates, *Clin. Cancer Res.*, **10**, 2131-2138, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0068.
51. Tan, Y., Zavala, J., Xu, M., Zavala, J., and Hoffman, R. M. (1996) Serum methionine depletion without side effects by methioninase in metastatic breast cancer patients, *Anticancer Res.*, **16**, 3937-3942.

METHIONINE ADDICTION OF CANCER CELLS TARGETED BY METHIONINASE

Review

V. S. Pokrovsky^{1,2,3*}, L. Abo Qoura^{1,2}, E. A. Demidova¹, Q. Han⁴, and R. M. Hoffman^{4,5}

¹ N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of Ministry of Health of Russian Federation, 115478 Moscow, Russia; e-mail: v.pokrovsky@ronc.ru

² Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, People's Friendship University of Russia (RUDN University), 117198 Moscow, Russia; e-mail: louay.ko@gmail.com

³ Department of Biotechnology, Sirius University of Science and Technology, 354340 Sochi, Russia

⁴ AntiCancer Inc., San Diego, CA 92111, USA; e-mail: all@anticancer.com

⁵ Department of Surgery, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92037-7400, USA

All types of cancer are addicted to methionine, which is known as the “Hoffman effect”. Restricting methionine inhibits the growth and proliferation of all tested types of cancer cells, while normal cells are unaffected. Methionine addiction is targeted with methioninase (METase), which has been shown to be effective and safe as a therapy for all types of cancer cells and animal cancer models, either alone or in combination with common cancer medications. Approximately six years ago, researchers developed a rMETase that may be taken orally as a supplement and has resulted in anecdotal positive results in patients with advanced cancer. Currently, there are 8 clinical studies on METase, including 2 from the 1990s and 6 more recent ones. This review focuses on the clinical studies of METase-mediated methionine restriction, specifically the oral dosage form of rMETase as a supplement alone or in combination with common chemotherapeutic agents in the treatment of patients with advanced cancer.

Keywords: methionine addiction, methionine γ -lyase, oral methioninase, Hoffman effect, clinical study, methionine restriction, methionine-degrading enzyme