



Contents lists available at ScienceDirect

**Acta Haematologica Polonica**journal homepage: [www.elsevier.com/locate/achaem](http://www.elsevier.com/locate/achaem)**Praca poglądowa/Review****Czynniki warunkujące aktywność terapeutyczną L-asparaginazy****Factors determining therapeutic activity of L-asparaginase****Justyna Walenciak<sup>\*</sup>, Beata Zalewska-Szewczyk**

Klinika Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Uniwersytecki Szpital Kliniczny nr 4 im. M. Konopnickiej, Łódź, Polska

## INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 05.07.2013

Zaakceptowano: 10.09.2013

Dostępne online: 19.09.2013

Słowa kluczowe:

- leki przeciwnowotworowe
- białaczka
- wyniki leczenia
- pediatria

Keywords:

- Antineoplastic agents
- Leukemia
- Treatment outcome
- Pediatrics

## A B S T R A C T

L-asparaginase (L-asp) is the basis of contemporary protocols used in the treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphomas. The key factor during L-asparaginase treatment is achieving sufficient serum activity of the drug during particular time period. There are several specified factors influencing L-asp activity. One is the preparation of the enzyme and their different pharmacokinetics. The other is L-asparaginase inactivation due to immunological response. The next factor, indirectly affecting L-asp activity, is the expression of asparagine synthetase, which is an enzyme of the opposite function to L-asparaginase.

The least known process is the enzymatic degradation of L-asparaginase by lysosomal cathepsin B and asparaginyl endopeptidase.

© 2013 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

L-asparaginaza (*L-asparaginase*; L-asp) pozostaje jednym z kluczowych elementów terapii ostrej białaczki limfoblastycznej i chłoniaków niezrębnych. Jej działanie znane jest od lat 60.-tych XX wieku, kiedy to w surowicy świnki morskiej zidentyfikowano jako L-asp substancję o aktywności przeciwnowotworowej [1]. Od tego czasu L-asp ugruntowała swoją pozycję w terapii chorób limfoproliferacyjnych i stanowi podstawę obowiązujących obecnie protokołów terapeutycznych, zwłaszcza w populacji pediatrycznej.

L-asparaginaza jest enzymem o masie cząsteczkowej około 140 kDa wykazującym aktywność hydrolazy, dla której substratem jest asparagina i, w dużo mniejszym stopniu, glutamina. Działanie przeciwnowotworowe L-asp wynika z faktu, że nowotworowo transformowane limfoblasty charakteryzują się niską aktywnością syntetazy asparaginy, w związku z czym są zależne od zewnątrzkomórkowej puli asparaginy [2]. W sytuacji deplecji tego aminokwasu w komórkach blastycznych dochodzi do zahamowania syntezy białek oraz

<sup>\*</sup> Adres do korespondencji: Klinika Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii I Katedry Pediatrii UM w Łodzi Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. M. Konopnickiej, ul. Sporna 36/50, 91-738 Łódź, Polska.

Adres email: [justyna.walenciak@stud.umed.lodz.pl](mailto:justyna.walenciak@stud.umed.lodz.pl) (J. Walenciak).

uruchomienia procesów apoptozy [3]. Celem terapii z udziałem L-asp jest odpowiednio trwałe obniżenie stężenia asparaginy w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym pacjenta. Warunkiem tego jest uzyskanie odpowiedniej aktywności enzymu w surowicy. Uznaje się, że aktywność L-asp powyżej 100 U/l warunkuje pożądane obniżenie stężenia asparaginy zarówno w surowicy, jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym [4], jednakże pojawiają się również doniesienia, że niższe wartości aktywności powodują podobny efekt [5]. W badaniach *in vitro* wykazano, że minimalny czas trwania deplecji asparaginy powodujący apoptozę komórek białaczkowych wynosi 4 dni [6].

Ostra białaczka limfoblastyczna jest heterogenną grupą chorób i ta heterogenność odnosi się również do wrażliwości na L-asp. Białaczki z translokacją TEL-AML1 – t(12;21), charakteryzujące się w wieku dziecięcym stosunkowo dobrym rokowaniem, wykazują wysoką wrażliwość na ten lek [7]. Z kolei grupa białaczek, do niedawna nie wyodrębniana za pomocą klasycznych metod diagnostycznych, o profilu ekspresji genów podobnym do białaczek z obecnością translokacji BCR-ABL1, charakteryzuje się opornością na L-asparaginazę [8]. Pośrednio może to tłumaczyć obserwację, że odpowiedź na L-asp stanowi ważny czynnik prognostyczny w ostrej białaczce limfoblastycznej – wg Asselin i wsp. brak takiej odpowiedzi *in vitro* związany jest z wysokim prawdopodobieństwem wznowy białaczki, niezależnie od wyjściowej kwalifikacji pacjenta do grupy ryzyka [9]. Potwierdza to również fakt, że stosowane kryteria czynników ryzyka niepowodzenia leczenia nadal nie są doskonałe, mimo ich ciągłego uzupełniania w oparciu o postęp wiedzy na temat mechanizmów patogenetycznych choroby czy oporności na stosowane terapie. Czynniki warunkujące skuteczność terapeutyczną L-asparaginazy mają istotne znaczenie kliniczne, ponieważ L-asp jest jednym z kluczowych leków stosowanych w obowiązujących obecnie programach terapeutycznych, a jednocześnie wiadomo, że jej aktywność jest parametrem o dużej zmienności osobniczej. Tym samym, jak najlepsze poznanie czynników mogących wpływać na aktywność L-asp pozwoli dostosować terapię do poszczególnego pacjenta, optymalizując działanie leku wraz z redukcją potencjalnych działań niepożądanych.

## Rodzaj preparatu

Obecnie w naszym kraju stosuje się trzy preparaty L-asparaginazy pochodzące z dwóch źródeł bakteryjnych: *Escherichia coli* i *Erwinia chrysantemii*. *E. coli*-asparaginaza występuje w dwóch postaciach: natywnej i związanej z glikolem polietylenowym (PEG-asparaginaza). Każdy z wymienionych preparatów wykazuje różnice w zakresie parametrów farmakokinetycznych, immunogenności czy też występowania działań niepożądanych. Okres półtrwania pegylowanej postaci L-asp jest wielokrotnie dłuższy (około tygodnia) niż w przypadku formy natywnej *E. coli*-asparaginazy (ponad dobę) czy *Erwinia*-asparaginazy (mniej niż dobę) [10]. Dlatego dla uzyskania odpowiedniej aktywności terapeutycznej leku konieczne jest dostosowanie dawkowania leku do tych parametrów. Potrzeba modyfikacji dawkowania L-asp w zależności od stosowanego preparatu jest wyraźnie

widoczna po przeanalizowaniu wyników badania Duval i wsp., które porównywało wyniki leczenia dziecięcych chorób limfoproliferacyjnych z zastosowaniem jednakowych dawek natywnej *E. coli*-asparaginazy i asparaginazy pochodzącej z *Erwinia chrysantemii* [11]. Zaobserwowano istotnie gorsze wyniki przeżycia wolnego od zdarzeń i ryzyka wznowy w grupie pacjentów leczonych z zastosowaniem *Erwinia*-asparaginazy, wynikające z niedostosowania dawki leku do jego parametrów farmakokinetycznych. Wymienione preparaty różnią się między sobą również potencjałem generowania odpowiedzi immunologicznej. Wydaje się, że bardziej immunogenna, w porównaniu z PEG-asp, jest natywna L-asp *E. coli* [12]. Nie obserwuje się natomiast znaczących różnic w zakresie immunogenności *E. coli*-asparaginazy i *Erwinia*-asparaginazy [13]. Częstość działań niepożądanych, niezwiązanych z nadwrażliwością na lek, wydaje się zależna od farmakokinetyki leku – preparaty L-asparaginazy o krótszym okresie półtrwania rzadziej powodują toksyczności [11, 14]. Nie znajduje to jednak potwierdzenia we wszystkich wynikach badań [12, 15].

## Inaktywacja na drodze odpowiedzi immunologicznej i „cicha inaktywacja”

L-asparaginaza jako obcogatunkowe białko o wysokim ciężarze cząsteczkowym ma duży potencjał generowania odpowiedzi immunologicznej. W efekcie u części pacjentów po jej zastosowaniu dochodzi do pojawienia się objawów nadwrażliwości pod postacią reakcji miejscowych (rumień, obrzęk, świąd), a także objawów ogólnych (duszność, wysypka, a nawet wstrząs anafilaktyczny). Najczęściej objawy te pojawiają się podczas kolejnej ekspozycji na lek, po dłuższej przerwie w jego stosowaniu i mogą dotyczyć nawet 60% pacjentów [12, 16]. Powstające przeciwciała mają charakter przeciwciał inaktywujących, co powoduje, że u pacjentów dochodzi do znaczącego obniżenia aktywności L-asp. W tej sytuacji dalsze podawanie leku, nawet przy skutecznym wygaszeniu objawów nadwrażliwości poprzez zastosowanie leków przeciwalergicznych, jest bezcelowe. Celowa jest natomiast zmiana preparatu na inny z dostępnych. Vrooman i wsp. obserwowali skuteczne zastosowanie *Erwinia*-asparaginazy u pacjentów pediatrycznych, u których wystąpiła alergia na *E. coli*-asparaginazę, zarówno w zakresie tolerancji preparatu, jego skuteczności mierzonej jako nadir aktywności L-asp w surowicy, jak też wyników leczenia [17]. W leczeniu drugiej linii, po wystąpieniu alergii na natywną *E. coli*-asparaginazę, stosowana jest również PEG-asparaginaza. Mimo mniejszej immunogenności tego preparatu jego stosowanie może być nieefektywne, ponieważ przeciwciała wytworzone w odpowiedzi na natywną *E. coli*-asparaginazę reagują krzyżowo z jej pegylowaną formą [18–20]. W świetle tych informacji po wystąpieniu alergii na natywną *E. coli*-asparaginazę bardziej wskazane wydaje się być stosowanie *Erwinia*-asparaginazy.

Wytworzenie przeciwciał przeciwko L-asp wpływa nie tylko na samą aktywność, ale również na farmakokinetykę leku. W grupie pacjentów, u których obecne były przeciwciała, obserwowano zwiększenie klirensu L-asp [21]. Aktywność L-asp na drodze zależnej od przeciwciał może z kolei

obniżyć się niezależnie od wystąpienia objawów klinicznych nadwrażliwości. Ma wówczas miejsce tzw. cicha inaktywacja leku. Może ona dotyczyć nawet ponad 40% pacjentów [16, 22], którzy rekrutują się przede wszystkim z grupy wysokiego ryzyka [23]. Zjawisko to prawdopodobnie jest odpowiedzialne za występujące u niektórych pacjentów gwałtowne obniżenie aktywności preparatu w trakcie leczenia. Ponieważ pomiar aktywności L-asp nadal nie należy do rutynowej praktyki klinicznej, brak objawów nadwrażliwości związanych z powstaniem przeciwciał nie implikuje zmiany preparatu, a tym samym aktywność enzymu w surowicy pacjenta nie osiąga wartości skutecznych terapeutycznie, co może wpłynąć negatywnie na wyniki leczenia. Wraz ze stosowaniem L-asparaginazy sprzężonej z glikolem polietylenowym (PEG) pojawia się także problem obecności przeciwciał anty-PEG. Początkowo obecność tych przeciwciał stwierdzano u 0,2% zdrowej populacji i uważano, że nie mają one znaczenia klinicznego [24]. W ciągu ostatnich lat obserwuje się jednak wzrost odsetka populacji ze stwierdzanymi przeciwciałami przeciwko glikolowi polietylenowemu do ponad 25% [25]. Armstrong i wsp. obserwowali je u blisko połowy pacjentów leczonych PEG-asparaginazą i, co niezwykle istotne, ich obecność wiązała się z brakiem aktywności leku, mimo nieobecnych przeciwciał anty-L-asp [26].

Na podstawie niektórych doniesień można wnioskować, że droga podania leku również wpływa na częstość występowania alergii na L-asp. Opisywane było częstsze występowanie reakcji alergicznych po podaniu dożylnym leku w stosunku do podania domięśniowego [27]. Próbowano tłumaczyć to faktem, że stosowane wówczas preparaty były preparatami o większej liczbie zanieczyszczeń. Jednak podobne reakcje obserwowane są również obecnie, mimo zastosowania wysoko oczyszczonych preparatów [23]. Sprzeczne dane na temat pojawiania się przeciwciał dotyczą także wieku pacjentów otrzymujących L-asp: według niektórych badań, częstość występowania przeciwciał nie zależy od wieku chorego [28], natomiast autorzy innych opracowań podkreślają wzrost ryzyka powstania odpowiedzi immunologicznej i reakcji nadwrażliwości wraz z wiekiem pacjentów [29].

Znaczenie kliniczne przeciwciał przeciwko L-asp i ich wpływ na wyniki leczenia nie są jednoznaczne. Istnieją doniesienia, że obecność przeciwciał anty-L-asp czy też wystąpienie reakcji alergicznej nie wiążą się z niekorzystnym rokowaniem [22, 30]. Z drugiej strony wyniki niektórych badań wykazują, że do wystąpienia reakcji nadwrażliwości dochodzi częściej u pacjentów z grup wysokiego ryzyka [23]. Ponadto, według części autorów, pacjenci, którzy wytworzyli przeciwciała przeciwko L-asp, trudniej osiągają remisję choroby [15]. Brak aktywności L-asp spowodowany inaktywacją immunologiczną u pacjentów z grupy wysokiego ryzyka może odpowiadać za gorsze wyniki leczenia [16]. Istnieją także doniesienia na temat wpływu odpowiedzi immunologicznej na L-asp na farmakokinetykę deksametazonu – kolejnego kluczowego elementu terapii przeciwbiałczkowej. Wykazano w nich, że obecność przeciwciał przeciwko L-asp wiąże się z szybszym klirensiem deksametazonu oraz wyższym ryzykiem wznowy, w tym wznowy w ośrodkowym układzie nerwowym [31].

## Syntetaza asparaginy

Jak już wspomniano na wstępie, działanie przeciwnowotworowe L-asp opiera się na zależności komórek blastycznych od zewnętrznych źródeł asparaginy, wynikającej z niskiej aktywności syntetazy asparaginy (*asparagine synthetase*; ASNS). Białaczki z prekursorów limfocyta B są heterogenną grupą pod względem aktywności syntetazy asparaginy, niemniej jednak jest ona niższa niż w białaczkach T-komórkowych [32]. Nadekspresja syntetazy asparaginy nasuwa się więc jako jeden z potencjalnych mechanizmów oporności na L-asp. Nie hamuje ona bezpośrednio aktywności leku, obniża jednak jego skuteczność poprzez zwiększenie puli egzogennej asparaginy. Teoria ta znalazła potwierdzenie w badaniu Li i wsp. Wykazali oni, że obniżenie ekspresji genu dla ASNS za pomocą interferencji RNA powodowało wzrost wrażliwości na L-asp badanych linii komórkowych [33]. Niestety w badaniach *in vivo* nie można stwierdzić takiej bezpośredniej zależności. W ostrej białaczce limfoblastycznej z translokacją TEL-AML1, charakteryzującej się w badaniach *in vitro* znaczącą wrażliwością na L-asp, stwierdzono 5-krotnie wyższą ekspresję mRNA syntetazy asparaginy w porównaniu z grupą pacjentów bez wymienionej translokacji oraz kontrolną grupą osób zdrowych. Białaczki z TEL-AML1 wykazywały różny poziom wrażliwości na L-asp, nie był on jednak zależny od poziomu ekspresji ASNS [34]. Według innych autorów, wyższy poziom ekspresji syntetazy asparaginy w białaczkach z TEL-AML1 wiązał się z lepszym rokowaniem [35]. Trudno w tym przypadku jednoznacznie określić rolę ekspresji ASNS, niemniej jednak można stwierdzić, że wysoka wrażliwość na L-asp białaczek z t(21,21) nie wynika z niskiej aktywności ASNS. Z drugiej strony natomiast istnieją dane na to, że wyższa ekspresja ASNS u pacjentów z białaczką bez translokacji TEL-AML1 częściej dotyczy wznów i jest wskaźnikiem rokowniczo niekorzystnym [36].

Nie wolno jednak zapominać o istotnych interakcjach, jakie mogą zachodzić między komórkami białczkowymi a środowiskiem oraz fakcie, że odpowiedź na leczenie może być wynikiem nie tylko właściwości samej komórki nowotworowej. I tak, według Iwamoto i wsp., komórki podścieliska szpiku kostnego charakteryzują się 20-krotnie wyższą ekspresją ASNS niż komórki białczkowe i w związku z tym mogą działać ochronnie na limfoblasty w sytuacji deplecji asparaginy spowodowanej podaniem L-asp [37]. Dotychczasowe badania *in vivo* nie potwierdziły tej teorii: nie wykazano zmian stężenia asparaginy w szpiku kostnym w trakcie terapii z zastosowaniem L-asp [38].

## Degradacja L-asparaginazy

Kolejnym z mechanizmów mogących wpływać na aktywność terapeutyczną L-asparaginazy jest proces jej degradacji. Spośród procesów mogących odpowiadać za brak skuteczności L-asp jest to proces stosunkowo najmniej dotychczas poznany i scharakteryzowany. W 2009 roku ukazała się praca, której autorzy wykazali udział dwóch enzymów lizosomalnych – katepsyny B (*cathepsin B*; CTSB) i endopeptydazy asparaginyłowej (*asparaginyl endopeptidase*;

AEP), zwanej również legumainą (*legumain*; LGMN) w procesie rozkładu L-asparaginazy [39]. Co ciekawe, od wielu lat dyskutowano o udziale zarówno CTSSB, jak i AEP w procesach nowotworzenia. Dotyczyło to jednak przede wszystkim guzów litych, a zwłaszcza procesów ich przerzutowania oraz miejscowej inwazji. Jeśli zaś chodzi o choroby limfoproliferacyjne, to dotychczas zaobserwowano zwiększoną ekspresję AEP w grupie ostrych białaczek limfoblastycznych z obecnością cytogenetycznych markerów wysokiego ryzyka [40] oraz wykazano, że wysoka aktywność CTSSB wraz z wysoką aktywnością katepsyny L w ostrej białaczce szpikowej związana jest z gorszym rokowaniem [41]. Podjęto również próbę wyjaśnienia na modelu zwierzęcym mechanizmów patogenetycznych zajęcia ośrodkowego układu nerwowego (OUN) w ostrej białaczce limfoblastycznej pre-B *common*, gdzie wykazano, że AEP ułatwia inwazję komórek blastycznych, jednak wydaje się, że nie jest to jedyny mechanizm odpowiedzialny za zajęcie OUN [42]. Z kolei wysoka aktywność CTSSB zaobserwowana w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów może odpowiadać za szerzenie się u nich przerzutów nowotworowych właśnie tą drogą [43].

W procesie degradacji L-asp uczestniczą obie wymienione proteazy, jednak w chwili obecnej wiadomo, że katepsyna B jest enzymem degradującym zarówno *E. coli*-, jak i *Erwinia*-asparaginazę, podczas gdy AEP specyficznie rozkłada natywną *E. coli*-asparaginazę. Dodatkowo produktami ostatniej z wymienionych reakcji są znane epitopy L-asparaginazy, w związku z czym endopeptydaza asparaginylowa może wpływać na aktywność L-asp nie tylko poprzez jej rozkład, ale również poprzez potencjalne nasilenie odpowiedzi immunologicznej na lek, powodując jego inaktywację. Wyniki niniejszej pracy dały początek próbie stworzenia enzymu opornego na działanie endopeptydaz – stworzone przez Offmana i wsp. zmutowane formy L-asp są nie tylko oporne na działanie AEP, ale też różnią się w zakresie właściwości antygenowych, wykazując przy tym nie mniejszą aktywność enzymatyczną co forma natywna [44]. Stanowi to kolejny krok, po próbach enkapsulacji L-asp w erytrocytach oraz stworzenia pegylowanej formy *Erwinia*-asparaginazy, na drodze do dalszej optymalizacji terapii z zastosowaniem L-asparaginazy.

## Podsumowanie

L-asparaginaza warunkuje skuteczne leczenie ostrej białaczki limfoblastycznej i chłoniaków nieziarniczych. Jako że jest to bardzo heterogenna grupa chorób, można wśród nich wyodrębnić te o szczególnej wrażliwości na lek, jak i te cechujące się wysoką opornością na L-asp. Aby osiągnąć pożądaną efekt terapeutyczny L-asp, należy uzyskać odpowiednio trwałą deplecję asparaginy w osoczu i płynie mózgowo-rdzeniowym. Jest to możliwe dzięki osiągnięciu odpowiedniej aktywności enzymu w surowicy pacjenta. Niestety istnieje wiele czynników mogących tę aktywność modyfikować czy nawet zaburzać. Ponadto, część z nich jest nieodłącznie związana z działaniami niepożądanymi leku, co często ogranicza jego zastosowanie. Poznanie tych czynników jest warunkiem poprawy wyników leczenia chorób

limfoproliferacyjnych zarówno wśród pacjentów pediatrycznych, jak i w grupie dorosłych chorych.

## Wkład autorów/Authors' contributions

JW, BZ-S – koncepcja pracy, przygotowanie pracy, przygotowanie literatury.

## Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

## Finansowanie/Financial support

Nie występuje.

## Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

## PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- [1] Broome JD. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. *J Exp Med* 1963;118:99-120.
- [2] Leslie M, Case MC, Hall AG, Coulthard SA. Expression levels of asparagine synthetase in blasts from children and adults with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2006;132:740-742.
- [3] Broome JD. Studies on the mechanism of tumor inhibition by L-asparaginase. Effects of the enzyme on asparagine levels in the blood, normal tissues, and 6C3HED lymphomas of mice: differences in asparagine formation and utilization in asparaginase-sensitive and -resistant lymphoma cells. *J Exp Med* 1968;127:1055-1072.
- [4] Riccardi R, Holcenberg JS, Glaubiger DL, Wood JH, Poplack DG. L-asparaginase pharmacokinetics and asparagine levels in cerebrospinal fluid of rhesus monkeys and humans. *Cancer Res* 1981;41:4554-4558.
- [5] Rizzari C, Zucchetti M, Conter V, et al. L-asparagine depletion and L-asparaginase activity in children with acute lymphoblastic leukemia receiving i.m. or i.v. *Erwinia C. or E. coli* L-asparaginase as first exposure. *Ann Oncol* 2000;11:189-193.
- [6] Asselin BL, Ryan D, Frantz CN, et al. In vitro and in vivo killing of acute lymphoblastic leukemia cells by L-asparaginase. *Cancer Res* 1989;49:4363-4368.
- [7] Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, et al. TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96:1094-1099.
- [8] den Boer ML, van SM, De Menezes RX, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol* 2009;10:125-134.



- [9] Asselin BL, Kreissman S, Coppola DJ, et al. Prognostic significance of early response to a single dose of asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 1999;21:6-12.
- [10] Asselin BL. The three asparaginases. Comparative pharmacology and optimal use in childhood leukemia. *Adv Exp Med Biol* 1999;457:621-629.
- [11] Duval M, Suci S, Ferster A, et al. Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood* 2002;99:2734-2739.
- [12] Avramis VI, Sencer S, Periclou AP, et al. A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood* 2002;99:1986-1994.
- [13] Albertsen BK, Schroder H, Ingerslev J, et al. Comparison of intramuscular therapy with *Erwinia* asparaginase and asparaginase Medac: pharmacokinetics, pharmacodynamics, formation of antibodies and influence on the coagulation system. *Br J Haematol* 2001;115:983-990.
- [14] Alvarez OA, Zimmerman G. Pegaspargase-induced pancreatitis. *Med Pediatr Oncol* 2000;34:200-205.
- [15] Kurtzberg J, Asselin B, Bernstein M, et al. Polyethylene Glycol-conjugated L-asparaginase versus native L-asparaginase in combination with standard agents for children with acute lymphoblastic leukemia in second bone marrow relapse: a Children's Oncology Group Study (POG 8866). *J Pediatr Hematol Oncol* 2011;33:610-616.
- [16] Panosyan EH, Seibel NL, Martin-Aragon S, et al. Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Cancer Group Study CCG-1961. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004;26:217-226.
- [17] Vrooman LM, Supko JG, Neuberg DS, et al. *Erwinia* asparaginase after allergy to *E. coli* asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2010;54:199-205.
- [18] Wang B, Relling MV, Storm MC, et al. Evaluation of immunologic crossreaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and lymphoma patients. *Leukemia* 2003;17:1583-1588.
- [19] Willer A, Gerss J, Konig T, et al. Anti-*Escherichia coli* asparaginase antibody levels determine the activity of second-line treatment with pegylated *E. coli* asparaginase: a retrospective analysis within the ALL-BFM trials. *Blood* 2011;118:5774-5782.
- [20] Zalewska-Szewczyk B, Gach A, Wyka K, Bodalski J, Mlynarski W. The cross-reactivity of anti-asparaginase antibodies against different L-asparaginase preparations. *Clin Exp Med* 2009;9:113-116.
- [21] Panetta JC, Gajjar A, Hijjiya N, et al. Comparison of native *E. coli* and PEG asparaginase pharmacokinetics and pharmacodynamics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 2009;86:651-658.
- [22] Woo MH, Hak LJ, Storm MC, et al. Hypersensitivity or development of antibodies to asparaginase does not impact treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2000;18:1525-1532.
- [23] Pidaparti M, Bostrom B. Comparison of allergic reactions to pegasparaginase given intravenously versus intramuscularly. *Pediatr Blood Cancer* 2012;59:436-439.
- [24] Richter AW, Akerblom E. Polyethylene glycol reactive antibodies in man: titer distribution in allergic patients treated with monomethoxy polyethylene glycol modified allergens or placebo, and in healthy blood donors. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1984;74:36-39.
- [25] Armstrong JK, Leger R, Wenby RB, et al. Antibody to poly(ethylene glycol) in normal donors. *Blood* 2003;102:556A.
- [26] Armstrong JK, Hempel G, Koling S, et al. Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer* 2007;110:103-111.
- [27] Nesbit M, Chard R, Evans A, Karon M, Hammond GD. Evaluation of intramuscular versus intravenous administration of L-asparaginase in childhood leukemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1979;1:9-13.
- [28] Barry E, DeAngelo DJ, Neuberg D, et al. Favorable outcome for adolescents with acute lymphoblastic leukemia treated on Dana-Farber Cancer Institute Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium Protocols. *J Clin Oncol* 2007;25:813-819.
- [29] Avramis VI, Tiwari PN. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Int J Nanomedicine* 2006;1:241-254.
- [30] Klug AB, Schmiegelow K, Schroder H, Carlsen NT, Rosthøj S, Avramis VI, et al. Anti-*Erwinia* asparaginase antibodies during treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia and their relationship to outcome: a case-control study. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002;50:117-120.
- [31] Kawedia JD, Liu C, Pei D, et al. Dexamethasone exposure and asparaginase antibodies affect relapse risk in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012;119:1658-1664.
- [32] Dubbers A, Wurthwein G, Muller HJ, et al. Asparagine synthetase activity in paediatric acute leukaemias: AML-M5 subtype shows lowest activity. *Br J Haematol* 2000;109:427-429.
- [33] Li BS, Gu LJ, Luo CY, et al. The downregulation of asparagine synthetase expression can increase the sensitivity of cells resistant to L-asparaginase. *Leukemia* 2006;20:2199-2201.
- [34] Stams WA, den Boer ML, Beverloo HB, et al. Sensitivity to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21)+ pediatric ALL. *Blood* 2003;101:2743-2747.
- [35] Krejci O, Starkova J, Otova B, et al. Upregulation of asparagine synthetase fails to avert cell cycle arrest induced by L-asparaginase in TEL/AML1-positive leukaemic cells. *Leukemia* 2004;18:434-441.
- [36] Stams WA, den Boer ML, Holleman A, et al. Asparagine synthetase expression is linked with L-asparaginase resistance in TEL-AML1-negative but not TEL-AML1-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005;105:4223-4225.
- [37] Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, Pui CH, Campana D. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest* 2007;117:1049-1057.
- [38] Tong WH, Pieters R, Hop WC, et al. No evidence of increased asparagine levels in the bone marrow of patients with acute lymphoblastic leukemia during asparaginase therapy. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60:258-261.
- [39] Patel N, Krishnan S, Offman MN, et al. A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug L-asparaginase. *J Clin Invest* 2009;119:1964-1973.
- [40] Strefford JC, van Delft FW, Robinson HM, et al. Complex genomic alterations and gene expression in acute lymphoblastic leukemia with intrachromosomal amplification of chromosome 21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:8167-8172.

- [41] Jain M, Bakhshi S, Shukla AA, Chauhan SS. Cathepsins B and L in peripheral blood mononuclear cells of pediatric acute myeloid leukemia: potential poor prognostic markers. *Ann Hematol* 2010;89:1223-1232.
- [42] Holland M, Castro FV, Alexander S, et al. RAC2, AEP, and ICAM1 expression are associated with CNS disease in a mouse model of pre-B childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011;118:638-649.
- [43] Nagai A, Terashima M, Harada T, et al. Cathepsin B and H activities and cystatin C concentrations in cerebrospinal fluid from patients with leptomeningeal metastasis. *Clin Chim Acta* 2003;329:53-60.
- [44] Offman MN, Krol M, Patel N, et al. Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. *Blood* 2011;117:1614-1621.