

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-63-73>

Современные подходы к суицидальной генотерапии злокачественных новообразований

Е.В. Дудкина, В.В. Ульянова, О.Н. Ильинская*ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; Россия, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18***Контакты:** Вера Владимировна Ульянова ulyanova.vera@gmail.com

Одним из перспективных направлений противоопухолевой терапии является суицидальная генотерапия, основанная на внедрении в опухолевые клетки цитотоксических генов. Чаще всего это гены ферментов бактериального или вирусного происхождения, способные напрямую или опосредованно уничтожать клетки опухоли. В настоящем обзоре представлены сведения о современных стратегиях суицидальной генотерапии злокачественных новообразований, описаны их достоинства и недостатки, а также проанализированы свойства потенциального кандидата для создания на его основе новой высокоэффективной суицидальной системы, совмещающей в себе достоинства уже существующих подходов.

Ключевые слова: онкологическое заболевание, генотерапия, суицидальный ген, цитотоксичность, биназа**Для цитирования:** Дудкина Е.В., Ульянова В.В., Ильинская О.Н. Современные подходы к суицидальной генотерапии злокачественных новообразований. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):63–73.DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-63-73>

Modern approaches in suicidal gene therapy of malignant neoplasms

E.V. Dudkina, V.V. Ulyanova, O.N. Ilinskaya*Kazan (Volga Region) Federal University; 18 Kremlevskaya St., Kazan 420008, Russia***Contacts:** Vera Vladimirovna Ulyanova ulyanova.vera@gmail.com

One of the promising directions in antitumor therapy is suicidal gene therapy based on the introduction of cytotoxic genes into tumor cells. Most often, these genes encode for enzymes of bacterial or viral origin, capable of direct or indirect killing of tumor cells. This review provides information about modern strategies for suicidal cancer gene therapy, discusses their advantages and disadvantages, and analyzes the properties of a potential candidate for creating a new highly effective suicidal system, combining the advantages of existing approaches.

Keywords: cancer, gene therapy, suicidal gene, cytotoxicity, binase**For citation:** Dudkina E.V., Ulyanova V.V., Ilinskaya O.N. Modern approaches in suicidal gene therapy of malignant neoplasms. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(2):63–73. (In Russ.).DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-63-73>

ВВЕДЕНИЕ

Изучение молекулярной природы канцерогенеза показало, что в основе малигнизации клеток лежат нарушения в их генетическом аппарате. В процессе жизнедеятельности под действием различных канцерогенов в клетках образуются и накапливаются мутации, приводящие к инициации и прогрессии опухолевого роста. В настоящее время разработан широкий спектр подходов к лечению онкологических заболеваний, основу которых составляют лучевая и химиотерапия, а также хирургическое удаление опухоли. Данные

стратегии направлены на элиминацию опухолевых клеток из организма и являются «золотым стандартом» противоопухолевой терапии, несмотря на высокую агрессивность их воздействия на организм пациента.

Современные методы лечения злокачественных новообразований (ЗНО) предполагают использование препаратов на основе моноклональных антител и низкомолекулярных ингибиторов тирозинкиназ. Данные лекарственные средства отличаются высокой эффективностью и действуют даже на поздних стадиях заболевания [1, 2]. Однако с течением времени эффективность

терапии снижается в связи с возникновением лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Кроме того, возникает ряд побочных эффектов, снижающих качество жизни пациентов. Таким образом, высокая токсичность, а также развитие метастазов и резистентности опухолей к терапии сильно ограничивают эффективность существующих методов лечения [3].

Для решения этих проблем в течение последних двух десятилетий разрабатывались новые подходы к противоопухолевой терапии. Генотерапия — одно из современных перспективных направлений в лечении онкологических заболеваний, направленных на борьбу с малигнизацией клеток на молекулярно-генетическом уровне. В основе данного метода лежит доставка терапевтических нуклеиновых кислот (ДНК, РНК, матричной РНК (мРНК), малой интерферирующей РНК (миРНК)), антисмысловых олигонуклеотидов и т. д.) в клетки-мишени с целью восстановления работы поврежденных генов, участвующих в инициации канцерогенеза. К основным стратегиям генотерапии злокачественных опухолей относят создание копии или замену поврежденного гена, доставку и увеличение экспрессии терапевтических генов, а также ингибирование экспрессии поврежденного/мутировавшего гена [4]. Так, различают онколитическую вирусную терапию, иммунотерапию, генотерапию на основе антисмысловых олигонуклеотидов, систем редактирования генома ZFN, TALENs и CRISPR/Cas, а также суицидальную генотерапию [5].

Суицидальная генотерапия является одной из наиболее обнадеживающих терапевтических стратегий при ЗНО. В ее основе лежит использование генов,

экспрессия которых в опухолевых клетках вызывает их гибель. Чаще всего в качестве суицидальных используют гены ферментов, метаболизирующих нетоксичное пролекарство в противоопухолевый агент, а также гены токсинов и проапоптотических белков [6].

Целью настоящего обзора стала систематизация данных о последних достижениях в области суицидальной генотерапии онкологических заболеваний.

СИСТЕМЫ ФЕРМЕНТ/ПРОЛЕКАРСТВО

Наиболее популярным направлением в суицидальной генотерапии ЗНО является подход, основанный на введении в опухолевые клетки генов ферментов, способных метаболизировать пролекарство в цитотоксический агент [7] (рис. 1). В качестве целевого гена для конверсии пролекарства изучены различные ферменты, преимущественно бактериального и вирусного происхождения, такие как тимидинкиназа, цитозиндезаминаза, оксидаза D-аминокислот, карбоксипептидаза, пуриноклеотидфосфорилаза, тимидинфосфорилаза, ксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза, нитроредуктаза, пенициллин-G-амидаза, фермент активации множественных лекарств, β -лактамаза, пероксидаза хрена, β -галактозидаза и дезоксирибонуклеотидкиназа. Использование бактериальных и вирусных ферментов позволяет добиться специфичности распознавания субстратов, а отсутствие их аналогов у человека — избежать перекрестной ферментативной реактивности при метаболизме субстратов в клетках человека. Однако основным недостатком данных систем является их значительная иммуногенность. При этом ферменты млекопитающих также могут быть

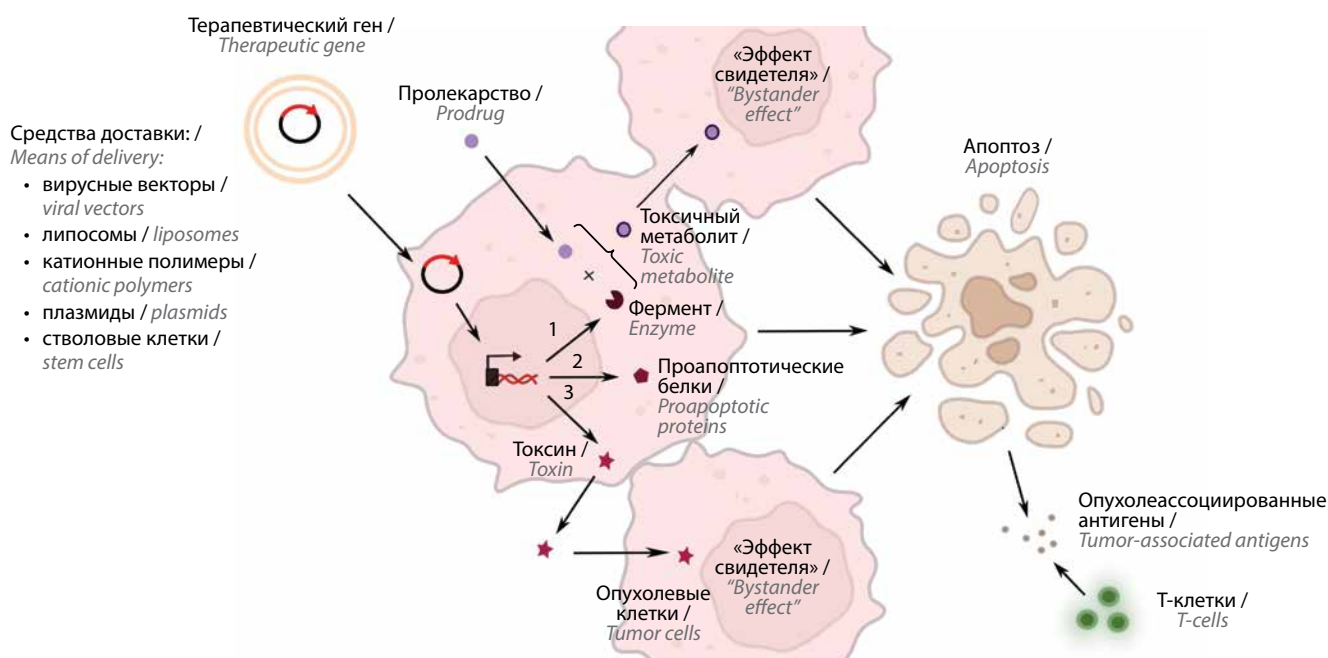


Рис. 1. Стратегии суицидальной генотерапии онкологических заболеваний. 1 — системы фермент/пролекарство; 2 — системы на основе проапоптотических генов; 3 — системы на основе токсинов

Fig. 1. Strategies of suicidal gene therapy of oncological diseases. 1 — enzyme/prodrug systems; 2 — systems based on proapoptotic genes; 3 — systems based on toxins

использованы в качестве целевых генов в случаях, когда уровни экспрессии этих ферментов в клетках-мишенях значительно ниже, чем в здоровых клетках. Так, пониженная экспрессия в опухолевых клетках наблюдается у генов, кодирующих ферменты β -глюкуронидазу, карбоксипептидазу А, цитохром Р450 и дезоксицитидинкиназу [8].

На сегодняшний день наиболее известной системой фермент/пролекарство является комбинация гена фермента тимидинкиназы вируса простого герпеса 1-го типа и пролекарства 9-([2-гидрокси-1-(гидроксиметил)этокси]метил)гуанина — ганцикловира (HSVtk/GCV). Ген тимидинкиназы в составе генетической конструкции доставляют в клетки-мишени, которые затем обрабатывают пролекарством — ганцикловиром (GCV), который не может фосфорилироваться тимидинкиназой млекопитающих. Экспрессия вирусной тимидинкиназы приводит к фосфорилированию GCV в ганцикловирмонофосфат, который под действием клеточных тимидинкиназ метаболизируется до ганцикловирдифосфата и трифосфата. На уровне трифосфата GCV может конкурировать с эндогенным 2'-дезоксигуанозин-5'-трифосфатом за включение в растущую цепь ДНК, что приводит к обрыву цепи, ингибированию синтеза ДНК и запуску апоптоза в опухолевых клетках [9].

Несмотря на многообещающие результаты, разрабатываются все новые подходы к модификации системы HSVtk/GCV с целью усиления цитотоксических свойств. Одним из таких подходов является использование системы совместной экспрессии. Так, например, ген моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1), экспрессируемый совместно с геном тимидинкиназы, продемонстрировал превосходный противоопухолевый эффект, обусловленный MCP-1-опосредованным рекрутированием макрофагов моноцитарного происхождения и приводящий к активации противоопухолевого иммунитета [10]. В России разработан генотерапевтический препарат антионкоРАН-М, представляющий собой плазмиду, несущую гены цитотоксичной тимидинкиназы и цитокина — гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора. Экспрессия гена тимидинкиназы способствует превращению пролекарства в противоопухолевый агент, а накопление цитокина гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора приводит к привлечению и активации клеток иммунной системы и запуску противоопухолевого иммунитета [11]. Комбинированная терапия тремя суицидальными генами (тимидинкиназа-р53-нитроредуктаза (ТК-р53-NTR)) и терапевтическими микроРНК miR-100, anti-miR-21 и anti-miR-10b) в присутствии пролекарств GCV и CB1954 показала эффективность *in vivo* в лечении метастазов в легких на моделях мышей после интраназального введения с использованием нетоксичных наночастиц золота [12].

Еще одним примером суицидальной генотерапии типа фермент/пролекарство является система на осно-

ве гена цитозиндезаминазы, превращающей 5-фторцитозин (5-FC) в цитотоксический 5-фторурацил (5-FU) (CD/5-FC). В качестве целевого гена используют фермент бактерий или дрожжей, экспрессия которого в клетках-мишенях приводит к конверсии пролекарства и обеспечивает прямое уничтожение опухолевых клеток за счет локальной продукции 5-FU [13].

Пролекарство 5-FC представляет собой пероральный противогрибковый препарат, одобренный Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA), относительно нетоксичный и способный эффективно преодолевать гематоэнцефалический барьер. Цитотоксический метаболит 5-FU является одним из наиболее часто используемых при лечении ЗНО желудочно-кишечного тракта, молочной железы, головы и шеи химиотерапевтических препаратов [14], однако он обладает рядом недостатков, обусловленных коротким периодом полураспада, отсутствием селективности в отношении опухолевых клеток и появлением у них лекарственной устойчивости [15].

После первичной конверсии клеточные ферменты метаболизируют 5-FU до цитотоксических антиметаболитов, ингибирующих синтез нуклеиновых кислот в клетке. Токсичный 5-FU через фторуридин преобразуется либо в рибонуклеотид 5-фторурацилтрифосфат, либо в 5-фтор-2-дезоксигуанидин-5-монофосфат. В то время как первый включается в РНК и препятствует ее процессингу, второй необратимо ингибирует тимидилатсинтазу и препятствует синтезу ДНК в клетке [16].

К преимуществам системы CD/5-FC относят ее радиосенсибилизирующую способность: накопление 5-FU повышает эффективность лучевой терапии [17]; при этом показано, что 5-FC и 5-FU способны проникать в большинство участков тела, включая стекловидное тело, спинномозговую и перитонеальную жидкость [18].

На основе системы CD/5-FC разработан генотерапевтический препарат ТОСА-511 [19]. Он показал высокую эффективность на ранних стадиях клинических исследований, однако результаты III фазы испытаний были отрицательными: медиана общей выживаемости после обработки ТОСА-511 составила 11,1 мес по сравнению с 12,2 мес при стандартном лечении [20]. Кроме того, в ряде клинических исследований сообщалось о негативном воздействии 5-FC на организм пациентов, включающем как незначительные побочные эффекты (тошнота, рвота и диарея), так и серьезные осложнения, (гепатотоксичность и апластическую анемию) [18]. Предполагают, что токсичность 5-FC связана с дополнительной продукцией 5-FU кишечной флорой [21].

С целью улучшения эффективности использования системы CD/5-FC в клинической практике в настоящее время проводят поиск новых и модификацию ранее разработанных систем. Так, получены мутантные формы бактериальных цитозиндезаминаз с улучшенными фармакокинетическими свойствами, включая высокое сродство и более низкую концентрацию

полумаксимального ингибирования (IC_{50}) к 5-FC [22]. В результате скрининга метагеномных библиотек окружающей среды идентифицирована новая изоцитозиндезаминаза, специфически превращающая 5-фторизоцитозин (5-FIC) в 5-FU [23]. Предполагается, что кишечная флора не будет метаболизировать 5-FIC так активно, как в случае с 5-FC, что позволит снизить риск возникновения побочных эффектов. Обнаружена способность фермента урацилфосфорибозилтрансферазы конвертировать 5-FU сразу в фторуридинмонофосфат, что может повысить чувствительность пролекарства почти в 100 раз [24].

Механизм действия суицидальных систем фермент/пролекарство носит комплексный характер (см. таблицу). Во-первых, они напрямую уничтожают опухолевые клетки-мишени за счет конверсии пролекарства в цитотокси-

ческий метаболит, при этом гибель опухолевых клеток происходит по Bcl-2- контролируемому митохондриальному пути апоптоза [16]. Помимо антипролиферативной активности системы фермент/пролекарство способны подавлять миграцию опухолевых клеток. При этом GCV демонстрирует более заметный антимиграционный эффект по сравнению с 5-FC и менее выраженные побочные свойства [25]. Во-вторых, системы фермент/пролекарство способны опосредованно уничтожать опухолевые клетки, не экспрессирующие суицидальный ген, благодаря «эффекту свидетеля» [26]. Этот эффект обусловлен высвобождением растворимых форм токсичных метаболитов, их проникновением в соседние клетки через щелевые контакты или путем пассивного транспорта, стимуляцией местного микроокружения и эндоцитозом апоптотических везикул (см. рис. 1). Наиболее

Преимущества и ограничения современных подходов к суицидальной генотерапии злокачественных новообразований

Advantages and limitations of modern approaches in suicidal gene therapy of malignant neoplasms

Суицидальная система The suicidal system	Преимущества Advantages	Ограничения Limitations	Источник Source
Системы фермент/ пролекарство Enzyme/prodrug systems	Способность проникать в различные ткани, «эффект свидетеля», индукция противоопухолевого иммунитета, радиосенсибилизирующая способность The ability to penetrate into various tissues, the "bystander effect", induction of antitumor immunity, radiosensitizing ability	Необходимость использования пролекарств, зависимость от жизненного цикла, высокая иммуногенность, короткий период полураспада, возникновение лекарственной устойчивости, побочные эффекты The need to use prodrugs, dependence on the life cycle, high immunogenicity, short half-life, the emergence of drug resistance, side effects	[7–29]
Системы на основе токсинов Toxin-based systems	Независимость от клеточного цикла, «эффект свидетеля» Independence from the cell cycle, "the bystander effect"	Отсутствие избирательности, ограниченное проникновение и слабое распределение в солидных опухолях, возникновение лекарственной устойчивости, токсичность, иммуногенность Lack of selectivity, limited penetration and poor distribution in solid tumors, the emergence of drug resistance, toxicity, immunogenicity	[30–44]
Системы на основе проапоптотических генов Systems based on proapoptotic genes	Отсутствие иммуногенности, активность в гетерогенных тканях, независимость от жизненного цикла, немедленная индукция апоптоза Lack of immunogenicity, activity in heterogeneous tissues, independence from the life cycle, immediate induction of apoptosis	Отсутствие избирательности Lack of selectivity	[45–52]
Перспективная система на основе гена цитотоксического фермента биназы A promising system based on the gene of the cytotoxic enzyme binase	Мультитаргетность действия, отсутствие пролекарства, отсутствие лекарственной устойчивости, высокая избирательность действия, низкая иммуногенность, высокая проникающая способность, «эффект свидетеля» Multitargeting action, lack of prodrug, lack of drug resistance, high selectivity of action, low immunogenicity, high penetrating ability, "the bystander effect"	Возможность возникновения побочных эффектов The possibility of side effects	[65–76]

сильный «эффект свидетеля» демонстрирует система CD/5-FU за счет эффективной диффузии 5-FU через клеточные мембраны опухолевых клеток [27]. Токсичный метаболит GCV заряжен отрицательно и поэтому не может легко проходить через клеточные мембраны, но способен диффундировать в соседние клетки посредством щелевых контактов [28].

Помимо диффузии противоопухолевого агента «эффект свидетеля» индуцирует противоопухолевый иммунитет, привлекая цитотоксические Т-клетки в зону опухолевого роста (см. рис. 1). Погибающие под действием цитотоксического агента опухолевые клетки выделяют в среду некротические материалы и опухолевые антигены, что вызывает активацию иммунной системы пациента и в некоторых случаях приводит к уничтожению даже отдаленных метастазов [13]. У пациентов, получавших генную терапию, выявлено достоверное повышение уровня интерлейкина-12 и интерферона γ по сравнению с контрольной группой, что связано с активацией иммунной системы в ответ на опухолевые антигены, высвобождаемые в кровь после некроза опухолевых клеток [29].

СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ТОКСИНОВ

Гены токсинов представляют собой перспективные инструменты суицидальной генотерапии (см. таблицу). Продукты этих генов способны необратимо вмешиваться в процессы биосинтеза белка или нарушать целостность цитоплазматической мембраны, что приводит к непосредственной гибели клеток без необходимости добавления пролекарств (см. рис. 1). Они могут действовать независимо от клеточного цикла, в отличие от цитотоксичных агентов, нацеленных на синтез ДНК, и тем самым способны уничтожать как покоящиеся (опухолевые стволовые клетки), так и быстро делящиеся опухолевые клетки. В качестве суицидальных генов используют гены, кодирующие растительные рибосом-инактивирующие белки (РИБ) (рицин, сапонин, диантин и др.) [30], а также домены бактериальных токсинов (экзотоксин А псевдомонад, дифтерийный токсин, стрептолизин О и др.) [8].

Энтеротоксин *Clostridium perfringens* и стрептолизин О *Streptococcus pyogenes* обладают селективной цитотоксичностью, обусловленной взаимодействием с трансмембранными белками клаудином-3 и клаудином-4, экспрессия которых сильно повышена при онкологических заболеваниях человека, включая рак молочной, поджелудочной, предстательной желез, яичников и толстой кишки [31]. Модификация энтеротоксинов позволяет расширить спектр чувствительных к ним опухолей за счет приобретения способности связываться с клаудинами других типов, сверхэкспрессированных при раке щитовидной железы и немелкоклеточном раке легкого [32]. Связывание токсинов с клаудинами запускает образование пор в мембране, что приводит к быстрому и эффективному уничтожению опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* [31, 33].

Высокая концентрация токсина способствует массовому образованию пор, что вызывает некротическую гибель клеток, в то время как низкая концентрация токсина — к апоптозу. Противоопухолевое действие токсинов усиливается за счет «эффекта свидетеля», опосредованного их высвобождением из трансфицированных клеток в составе экзосом с последующим проникновением в близлежащие клетки [33].

Рибосом-инактивирующие белки способны удалять специфический аденин из петли GAGA в 23S/25/28S рибосомных РНК (рРНК), необратимо блокируя процессы трансляции, а также вызывать фрагментацию ДНК [34]. Рицин из *Ricinus communis* и сапорин из *Saponaria officinalis* показали высокую эффективность против опухолевых клеток в исследованиях *in vitro* и *in vivo* [35, 36]. Рицин, как и другие РИБ 1-го типа, благодаря наличию дополнительной цепи, обладающей свойствами лектина, способен лучше проникать в клетки и является более цитотоксичным, чем сапонин и другие РИБ 2-го типа.

Бактериальные токсины, такие как экзотоксин А псевдомонад и дифтерийный токсин, катализируют перенос от НАД⁺-АДФ-рибозы к фактору элонгации EF2, вызывая необратимую остановку синтеза белка вследствие ингибирования связывания EF2 с рибосомой [8]. Генотерапевтические конструкции на основе активных доменов, полученных из токсинов *Corynebacterium diphtheriae* или *Pseudomonas aeruginosa*, эффективно элиминируют опухолевые клетки из организма, значительно снижая размер опухоли. Однако их использование и широкое внедрение в клиническую медицину ограничены в связи с отсутствием избирательности действия данных белков. Для повышения специфичности и снижения риска побочных эффектов фрагменты токсинов сшивают со специфическими молекулами, например антителами против опухолеспецифичных антигенов, создавая иммунотоксины [37], несмотря на вероятность снижения их противоопухолевой активности. Еще одним подходом является контроль экспрессии аттенуированных форм токсинов с помощью опухолеспецифичных промоторов [38].

К данному моменту FDA одобрены 3 генотерапевтических препарата на основе доменов бактериальных токсинов. Первый препарат — денилейкин дифтитокс, или ONTAK, — в настоящее время отозванный с рынка, представляет собой рекомбинантный интерлейкин-2 человека, слитый с фрагментами дифтерийного токсина А и В. Он предназначался для лечения гематологических ЗНО, несущих CD25-высокоаффинную α -субъединицу рецептора интерлейкина-2 [39]. Второе лекарственное средство — таграксифусп (IL3-DT) — генотерапевтический препарат того же типа, созданный на основе рекомбинантного интерлейкина-3 человека, сшитого с фрагментом дифтерийного токсина, для лечения гематологических CD123⁺ опухолей [40]. Третий препарат — моксетумаб пасудотокс — содержит Fv-фрагмент рекомбинантного мышинного моно-

клонального антитела против CD22, сшитого с фрагментом PE38 экзотоксина А синегнойной палочки (анти-CD22-ETA) и предназначен для лечения взрослых с рецидивирующим или рефрактерным волосатоклеточным лейкозом [41].

Иммунотоксины из-за своих размеров характеризуются ограниченным проникновением и слабым распределением в солидных опухолях (см. таблицу). Опухолевые клетки способны вырабатывать резистентность к иммунотоксинам за счет снижения презентации антигена на клеточной поверхности, нарушения процесса токсина или его расщепления в лизосоме [42, 43]. Некоторые иммунотоксины могут связывать нормальные клетки и повреждать эндотелий сосудов. Для преодоления этих недостатков предложен способ внутриклеточного синтеза каталитически активного домена III экзотоксина А синегнойной палочки с модифицированной мРНК, упакованной в липидные наночастицы [44]. Такой подход показал свою эффективность как *in vitro*, так и *in vivo* на мышинной модели меланомы B16. Терапия не только подавляла рост опухоли, но и повышала показатели общей выживаемости мышей.

СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ПРОАПОПТОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ

Использование в качестве целевых генов в суицидальной генотерапии ферментов, филогенетически отдаленных от млекопитающих, несмотря на положительные результаты исследований, всегда ограничено риском возникновения иммунных реакций при введении их в организм пациента. В связи с этим в настоящее время разработаны системы на основе проапоптотических генов человека, экспрессия которых приводит к немедленному запуску апоптоза в клетках-мишенях и их гибели (см. рис. 1).

Наиболее известными генами-убийцами, используемыми в данной стратегии, являются гены, кодирующие ферменты семейства каспаз [45, 46] и члены семейства Bcl-2, такие как BimS, Bax и редуцированный Bid [47, 48]. Транслокация tBid, образованного путем расщепления проапоптотического белка Bid, в митохондрии приводит к высвобождению цитохрома С и активации каспаз, индуцирующих апоптоз в различных клеточных линиях [47].

Для создания суицидальной конструкции на основе генов каспаз цитотоксичный синтетический аналог каспазы 9 (iCasp9) сшивают с модифицированным человеческим FK506-связывающим белком, обеспечивающим димеризацию каспазы в клетках, обработанных синтетическим препаратом AP20187. Димеризация вызывает активацию каспазы 3 и других компонентов внутреннего апоптотического пути, что приводит к эффективному уничтожению опухолевых клеток, экспрессирующих трансген, независимо от их пролиферативного статуса и гетерогенного микроокружения [49]. При этом iCasp9 одинаково эффективно действует в условиях как монослоя, так и трехмерного культивирования

клеток, в отличие от эндокринной терапии, опосредованной тамоксифеном, которая в 3D-культуре демонстрировала более низкую эффективность по сравнению с 2D-культурой [50]. В системе *in vivo* iCasp9 приводила к уменьшению объема опухоли молочной железы у мышей [46].

Несмотря на это, экспрессия каспазы требует жесткого контроля в связи с отсутствием селективности ее апоптотического действия [51, 52]. Однако для полного удаления опухоли монотерапии iCasp9 недостаточно, требуется дальнейшее ее усиление с помощью химиотерапевтических или иммунотерапевтических препаратов [46]. Так, было показано, что сочетание iCasp9 с бортезомибом — ингибитором деградации каспаз, благодаря синергизму обладало более эффективным и длительным цитотоксическим действием, чем только iC9 [50].

Основным преимуществом суицидальных систем на основе проапоптотических белков человека является отсутствие у них иммуногенности (см. таблицу). Кроме того, они активны в гетерогенных тканях и функционируют независимо от жизненного цикла клетки. Экспрессия генов проапоптотических белков приводит к немедленному запуску апоптоза в клетках-мишенях и их гибели в течение нескольких минут после введения препарата, тогда как другие известные методы суицидальной генотерапии требуют длительного применения и удаляют меньшую часть клеток, содержащих генотерапевтическую конструкцию. На животных моделях терапевтический эффект проапоптотических генов замечен уже через 1 нед, в то время как эффект системы фермент/пролекарство проявлялся лишь через 30 дней [46].

ОГРАНИЧЕНИЯ СУИЦИДАЛЬНОЙ ГЕНОТЕРАПИИ

Основным недостатком суицидальной генотерапии онкологических заболеваний, ограничивающим их широкое применение в клинической практике, является низкая селективность, обусловленная неэффективной целевой доставкой, неконтролируемой экспрессией цитотоксичного трансгена и «эффектом свидетеля», обеспечивающим свободную диффузию токсичных метаболитов внутри разнородной клеточной популяции.

Одной из ключевых стратегий, разработанных для решения этих проблем, является использование опухолеспецифичных промоторов, способных запускать экспрессию трансгена только в опухолевых клетках [53]. Такой подход позволяет избежать токсичной экспрессии суицидных генов в нормальных клетках организма при попадании в них генотерапевтической конструкции, а также минимизировать риск возникновения побочных эффектов, вызванных системной токсичностью противоопухолевых препаратов. Для усиления селективности суицидальной системы были изучены промоторы миогенина человека, рецептора фактора роста эндотелия сосудов, сурвивина и др. [53]. Селективный противо-

опухолевый эффект системы HSVtk/GCV достигнут с использованием промотора hTERT как в чувствительных к цисплатину, так и в устойчивых к нему клетках [54]. Прямое введение гена бактериального токсина А синегнойной палочки под контролем химерного модифицированного энхансера/промотора гена простатического специфического антигена человека в простату мышей приводило к резкому уменьшению размера железы [55].

Безопасная и эффективная доставка генов является фундаментальной основой для проведения успешной генотерапии. Идеальная система доставки терапевтического гена должна иметь большую емкость, высокую эффективность трансфекции, обеспечивать устойчивую экспрессию трансгена и его таргетную доставку, а также быть легкодоступной и безопасной для организма [56].

Доставку трансгена в опухолевые клетки проводят как вирусным, так и невирусным способами. Благодаря более высокой эффективности трансдукции и долговременной экспрессии генов вирусные векторы являются более предпочтительными [57]. При этом процент клеток, экспрессирующих трансген, составляет около 10 % [58]. Несмотря на это, трансдукция опухолей *in vivo* приводит к значительной задержке роста опухоли у животных с ее полной регрессией в некоторых случаях, обусловленной впечатляющим действием «эффекта свидетеля» в системе *in vivo* [59]. К недостаткам вирусных систем относят риск инсерционного мутагенеза в случае интеграции вирусов в геном клетки-мишени и развития иммунного ответа. Кроме того, вирусные векторы характеризуются ограниченной нагрузочной способностью и сложностью получения в промышленных масштабах [60].

Синтетические наноносители, полученные из липидных и/или полимерных соединений, были разработаны в качестве альтернативы для обхода недостатков вирусных векторов. Среди них в суицидальной генотерапии наиболее востребованными оказались полиэтиленмин и его производные. К основным преимуществам катионных полимеров по сравнению с вирусными векторами относят более низкие затраты и простоту производства, более высокую универсальность, меньшую иммуногенность/отсутствие системной токсичности, способность конденсировать ДНК более крупного размера, а также возможность вставки пептидов/аптамеров или определенных доменов для таргетной доставки трансгена в клетки-мишени. Показано, что у ксенотрансплантированных мышей, которым с помощью полиэтиленмина вводили рекомбинантную плазмиду, кодирующую ген тимидинкиназы, значительно уменьшался объем опухоли *in vivo*, вплоть до 80 % [61].

Однако при использовании невирусных носителей важно учитывать нестабильность полиплексов в крови и других биологических жидкостях, а также их более низкие специфичность и эффективность доставки трансгена по сравнению с вирусными векторами.

В настоящее время одним из наиболее многообещающих способов доставки нуклеиновых кислот в клетки является использование стволовых клеток. Показано, что некоторые их типы обладают тропностью к опухолевым клеткам [26]. Опухолево-трофическую миграцию стволовых клеток связывают с воспалительными и ангиогенными факторами, секретируемыми астроцитами и микроглиальными клетками опухоли, а также фактором 1 стромальных клеток, хемокиновым лигандом CXCL12, рецептором фактора роста эндотелия сосудов, фактором роста гепатоцитов, фактором 1 α , индуцируемым гипоксией, и активатором плазминогена урокиназного типа [61]. Результаты ряда исследований продемонстрировали способность мезенхимальных стволовых клеток доставлять гены к различным моделям опухолей, таким как глиобластома, мелко-клеточный рак легкого и рак молочной железы [62]. В ходе проведенного впервые с участием пациентов с рецидивирующей мультиформной глиобластомой клинического исследования I фазы выявлено, что суицидальная генная терапия с использованием аллогенных мезенхимальных стволовых клеток в качестве носителей гена тимидинкиназы вируса простого герпеса безопасна [63]. Кроме того, показано, что стволовые клетки секретируют цитотоксические метаболиты, способные элиминировать опухолевые клетки [64]. Однако иммуносупрессивное действие мезенхимальных стволовых клеток может приводить к злокачественной трансформации, росту опухоли и усилению метастазирования, что указывает на необходимость проведения дополнительных исследований их безопасности и эффективности.

Несмотря на вышеизложенные пути преодоления существующих недостатков суицидальной генотерапии, использование контролируемой системы экспрессии, как и таргетная доставка токсичных генов, не решает проблему неспецифической токсичности суицидальных систем, обусловленной механизмом «эффекта свидетеля». В связи с этим поиск и разработка новых суицидальных генов представляют особый интерес для развития современных подходов к противоопухолевой терапии.

БИНАЗА КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ АГЕНТ СУИЦИДАЛЬНОЙ ГЕНОТЕРАПИИ

Среди генов цитотоксических белков, способных уничтожать опухолевые клетки, особое внимание заслуживают ферменты рибонуклеазы (РНКаза), осуществляющие гидролиз и процессинг РНК. Известен широкий спектр РНКаз, обладающих избирательным апоптоз-индуцирующим действием в отношении опухолевых клеток различного происхождения [65].

Среди них одним из наиболее перспективных противоопухолевых агентов является микробная РНКаз *Bacillus pumilus* 7P — биназа [66]. Изучение физико-химических и структурно-функциональных свойств этого белка указывает на возможность создания

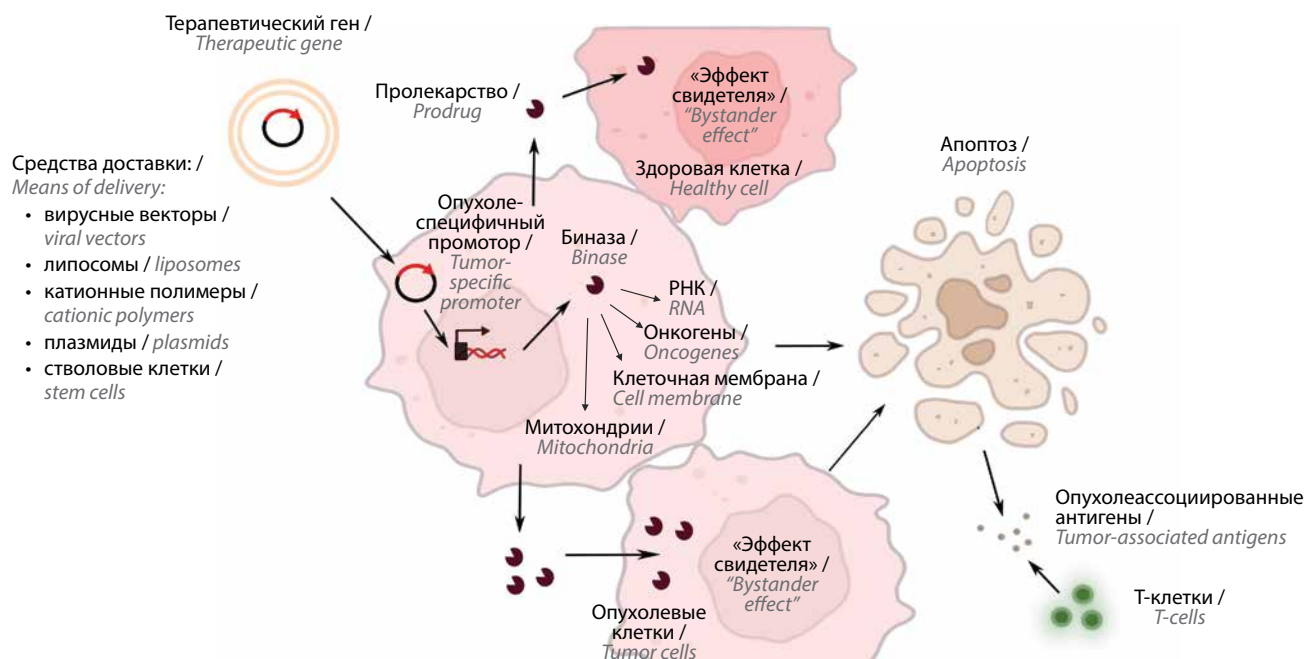


Рис. 2. Стратегия суицидальной генотерапии онкологических заболеваний на основе перспективного гена-кандидата цитотоксичной биназы
Fig. 2. Strategy of suicidal gene therapy of oncological diseases based on a promising candidate gene of cytotoxic binase

генотерапевтической суицидальной конструкции на его основе (рис. 2). Противоопухолевая активность биназы доказана в отношении клеток аденокарциномы легкого, рака яичников, шейки матки, молочной железы, хронической миелогенной лейкемии и других малигнизированных клеток, экспрессирующих онкогены *RAS*, *KIT*, *AML1-ETO*, *FLT3*, *E6* и *E7*, но не *fms* и *src* [67–69]. Продемонстрирована способность биназы снижать рост первичной опухоли и метастазов у животных с индуцированными опухолями карциномы легкого Льюиса, лимфосаркомы RLS40 и меланомы B-16 [70].

Главным преимуществом биназы как потенциального противоопухолевого агента является мультитаргетность ее действия (см. таблицу). Цитотоксический потенциал биназы не связан с какой-то одной молекулярной мишенью, а включает в себя ряд возможных событий, тем или иным образом приводящих к запуску апоптоза в опухолевых клетках. Такая особенность исключает возникновение лекарственной устойчивости опухолевых клеток и делает этот белок уникальным противоопухолевым агентом. По своей природе фермент представляет собой сильный поликатион, способный избирательно взаимодействовать и проникать в опухолевые клетки. Взаимодействие биназы с клеточными белками приводит к модуляции сигнальных путей в клетке и интернализации фермента. Так, было показано, что биназа взаимодействует с онкогенами *EGFR* и *RAS*, что приводит к ингибированию сигнального каскада MAPK и запуску апоптоза в трансформированных клетках [69, 71]. Внутри клеток биназа гидролизует одно- и двухцепочечную РНК

с образованием сигнальных микроРНК, участвующих в активации экспрессии проапоптотических генов [72]. Она индуцирует как митохондриальный, так и лиганд-зависимый пути апоптоза [70]. Вклад в индукцию апоптоза РНКазой также может вносить образующийся после каталитического расщепления РНК интермедиат 2',3'-цГМФ (цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат) [73]. Показано, что проникновение в митохондрии интермедиата 2',3'-цАМФ вызывало увеличение проницаемости мембраны и ее разрушение [74]. Так, образование пор в митохондриях приводило к развитию апоптоза в клетках лейкоза Касуми-1, обработанных биназой [68]. При этом особо стоит отметить, что она проникает не только в опухолевые клетки, но и в нормальные, не оказывая при этом на них значимого токсического влияния [75].

Еще одним преимуществом биназы является ее низкая иммуногенность; она не индуцирует поликлональный Т-клеточный ответ [76]. Этот фермент нечувствителен к блокирующему действию цитозольного ингибитора РНКазы млекопитающих [66]. Кроме того, показано, что биназа запускает регенеративные процессы в печени мышей с карциномой легкого Льюиса и не оказывает общетоксического действия на организм здоровых мышей [70].

Принимая во внимание особенности противоопухолевого действия биназы, можно утверждать, что создание на ее основе генотерапевтической конструкции позволит селективно уничтожать опухолевые клетки за счет не только внутриклеточной экспрессии гена цитотоксичной биназы, но и «эффекта свидетеля», обусловленного легкостью проникновения катионной

биназы в клетки. При этом данный фермент не будет вызывать побочных эффектов, связанных с его возможным попаданием в нормальные клетки, и индуцировать иммунный ответ, что снизит риск возникновения нежелательных реакций терапии до минимума.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени достигнуты многообещающие результаты в области суицидальной генотерапии ЗНО, которые уже сегодня могут быть использованы в клинической практике. Ключевыми направлениями

дальнейшего развития такого метода лечения являются поиск и модификация цитотоксичных генов, а также разработка систем доставки и обеспечения их селективной экспрессии в опухолевых клетках. Одним из перспективных кандидатов для создания новой суицидальной генетической конструкции может стать ген бактериального фермента — рибонуклеазы биназы, обладающей селективной противоопухолевой активностью, в основе которой лежит многоуровневый механизм цитотоксического действия, не требующий внесения пролекарств и приводящий в конечном счете к апоптозу.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Pottier C., Fresnais M., Gilon M. et al. Tyrosine kinase inhibitors in cancer: breakthrough and challenges of targeted therapy. *Cancers (Basel)* 2020;12(3):731. DOI: 10.3390/cancers12030731
- Zinn S., Vazquez-Lombardi R., Zimmermann C. et al. Advances in antibody-based therapy in oncology. *Nat Cancer* 2023;4(2):165–80. DOI: 10.1038/s43018-023-00516-z
- Weiss F., Lauffenburger D., Friedl P. Towards targeting of shared mechanisms of cancer metastasis and therapy resistance. *Nat Rev Cancer* 2022;22(3):157–73. DOI:10.1038/s41568-021-00427-0
- Sun W., Shi Q., Zhang H. et al. Advances in the techniques and methodologies of cancer gene therapy. *Discov Med* 2019;27(146):45–55.
- Cesur-Ergün B., Demir-Dora D. Gene therapy in cancer. *J Gene Med* 2023;25(11):e3550. DOI: 10.1002/jgm.3550
- Navarro S.A., Carrillo E., Grinán-Lison C. et al. Cancer suicide gene therapy: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 2016;26:1095–104. DOI: 10.1080/13543776.2016.1211640
- Sheikh S., Ernst D., Keating A. Prodrugs and prodrug-activated systems in gene therapy. *Mol Ther* 2021;29(5):1716–28. DOI: 10.1016/j.ymthe.2021.04.006
- Ardini M., Vago R., Fabbrini M.S., Ippoliti R. From immunotoxins to suicide toxin delivery approaches: is there a clinical opportunity? *Toxins (Basel)* 2022;14(9):579. DOI: 10.3390/toxins14090579
- Tamura R., Miyoshi H., Yoshida K. et al. Recent progress in the research of suicide gene therapy for malignant glioma. *Neurosurg Rev* 2021;44(1):29–49. DOI: 10.1007/s10143-019-01203-3
- Hong S., Zhang P., Zhang H. et al. Enforced effect of tk-MCP-1 fusion gene in ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2012;31(1):74. DOI: 10.1186/1756-9966-31-74
- Alekseenko I.V., Snezhkov E.V., Chernov I.P. et al. Therapeutic properties of a vector carrying the HSV thymidine kinase and GM-CSF genes and delivered as a complex with a cationic copolymer. *J Transl Med* 2015;13:78. DOI: 10.1186/s12967-015-0433-0
- Liu Y., Sukumar U.K., Jugniot N. et al. Inhaled gold nano-star carriers for targeted delivery of triple suicide gene therapy and therapeutic microRNAs to lung metastases: development and validation in a small animal model. *Adv Ther (Weinh)* 2022;5(8):2200018. DOI: 10.1002/adtp.202200018
- Ding Y., Fan J., Deng L. et al. Antitumor efficacy of cytosine deaminase-armed vaccinia virus plus 5-fluorocytosine in colorectal cancers. *Cancer Cell Int* 2020;20:243. DOI: 10.1186/s12935-020-01340-6
- Emamian M., Abbaspour A., Shahani T et al. Non-viral suicide gene therapy: cytosine deaminase gene directed by VEGF promoter and 5-fluorocytosine as a gene directed enzyme/prodrug system in breast cancer model. *Drug Res (Stuttg)* 2021;71(7):395–406. DOI: 10.1055/a-1488-6054
- Takahashi M., Valdes G., Hiraoka K. et al. Radiosensitization of gliomas by intracellular generation of 5-fluorouracil potentiates prodrug activator gene therapy with a retroviral replicating vector. *Cancer Gene Ther* 2014;21(10):405–10. DOI: 10.1038/cgt.2014.38
- El-Sayed A.S.A., Mohamed N.Z., Yassin M.A. et al. Microbial cytosine deaminase is a programmable anticancer prodrug mediating enzyme: antibody, and gene directed enzyme prodrug therapy. *Heliyon* 2022;8(9):e10660. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e10660
- Ostertag D., Amundson K.K., Lopez Espinoza F. et al. Brain tumor eradication and prolonged survival from intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil using a nonlytic retroviral replicating vector. *Neuro Oncol* 2012;14(2):145–59. DOI: 10.1093/neuonc/nor199
- Vermes A., Guchelaar H.J., Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother* 2000;46(2):171–9. DOI: 10.1093/jac/46.2.171
- Mitchell L.A., Lopez Espinoza F., Mendoza D. et al. Toca 511 gene transfer and treatment with the prodrug, 5-fluorocytosine, promotes durable antitumor immunity in a mouse glioma model. *Neuro Oncol* 2017;19(7):930–9. DOI: 10.1093/neuonc/nox037
- Cloughesy T.F., Petrecca K., Walbert T. et al. Effect of vocimagene amiretrorepvec in combination with flucytosine vs standard of care on survival following tumor resection in patients with recurrent high-grade glioma: a randomized clinical trial. *JAMA Oncol* 2020;6(12):1939–46. DOI: 10.1001/jamaoncol.2020.3161
- Kazlauskas A., Darinskas A., Meškys R. et al. Isocytosine deaminase Vcz as a novel tool for the prodrug cancer therapy. *BMC Cancer* 2019;19(1):197. DOI: 10.1186/s12885-019-5409-7
- Vosough P., Vafadar A., Naderi S. et al. Escherichia coli cytosine deaminase: structural and biotechnological aspects. *Biotechnol Appl Biochem* 2024;71(1):5–16. DOI: 10.1002/bab.2516
- Aučynaitė A., Rutkienė R., Tauraitė D. et al. Discovery of bacterial deaminases that convert 5-fluoroisocytosine into 5-fluorouracil. *Front Microbiol* 2018;9:2375. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02375
- Ho Y.K., Woo J.Y., Tu G.X.E. et al. A highly efficient non-viral process for programming mesenchymal stem cells for gene directed enzyme prodrug cancer therapy. *Sci Rep* 2020;10(1):14257. DOI: 10.1038/s41598-020-71224-2
- Xu N., Tian H., Po Fung C. et al. Inhibition of human oral squamous cell carcinoma proliferation and migration by prodrug-activating suicide gene therapies. *Exp Ther Med* 2023;25(2):92. DOI: 10.3892/etm.2023.11790
- Horikawa M., Koizumi S., Oishi T. et al. Potent bystander effect and tumor tropism in suicide gene therapy using stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Cancer Gene Ther* 2023;30(1):85–95. DOI: 10.1038/s41417-022-00527-5
- Tanaka T., Duflot-Dancer A., Tirabyl M. et al. Bystander effect from cytosine deaminase and uracil phosphoribosyl transferase genes *in vitro*: a partial contribution of gap junctions. *Cancer Lett* 2009;282(1):43–7. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.02.050

28. Oishi T., Ito M., Koizumi S. et al. Efficacy of HSV-TK/GCV system suicide gene therapy using SHED expressing modified HSV-TK against lung cancer brain metastases. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2022;26:253–65. DOI: 10.1016/j.omtm.2022.07.001
29. Rainov N.G. A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther* 2000;11(17):2389–401. DOI: 10.1089/104303400750038499
30. Fabbri M.S., Katayama M., Nakase I., Vago R. Plant ribosome-inactivating proteins: progresses, challenges and biotechnological applications (and a few digressions). *Toxins (Basel)* 2017;9(10):314. DOI: 10.3390/toxins9100314
31. Pahle J., Menzel L., Niesler N. et al. Rapid eradication of colon carcinoma by *Clostridium perfringens* enterotoxin suicidal gene therapy. *BMC Cancer* 2017;17(1):129. DOI: 10.1186/s12885-017-3123-x
32. Piontek A., Eichner M., Zwanziger D. et al. Targeting claudin-overexpressing thyroid and lung cancer by modified *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Mol Oncol* 2020;14(2):261–76. DOI: 10.1002/1878-0261.12615
33. Pahle J., Kobelt D., Aumann J. et al. Effective oncolytic treatment of pancreatic cancer by claudin-targeted suicide gene therapy with *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE). *Cancers (Basel)* 2021;13(17):4393. DOI: 10.3390/cancers13174393
34. Bagga S., Seth D., Batra J.K. The cytotoxic activity of ribosome-inactivating protein saporin-6 is attributed to its rRNA N-glycosidase and internucleosomal DNA fragmentation activities. *J Biol Chem* 2003;278(7):4813–20. DOI: 10.1074/jbc.M207389200
35. Sama S., Woith E., Walther W. et al. Targeted suicide gene transfections reveal promising results in nu/nu mice with aggressive neuroblastoma. *J Control Release* 2018;275:208–16. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.02.031
36. Herawati I.E., Lesmana R., Levita J., Subarnas A. Cytotoxicity, apoptosis, migration inhibition, and autophagy-induced by crude ricin from ricinus communis seeds in a549 lung cancer cell lines. *Med Sci Monit Basic Res* 2022;28:e936683. DOI: 10.12659/MSMBR.936683
37. Morgan R.N., Saleh S.E., Farrag H.A., Aboshanab K.M. New insights on *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A-based immunotoxins in targeted cancer therapeutic delivery. *Ther Deliv* 2023;14(1):31–60. DOI: 10.4155/tde-2022-0055
38. Dai L., Yu X., Huang S. et al. The therapeutic potential of attenuated diphtheria toxin delivered by an adenovirus vector with survivin promoter on human lung cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2021;22(1):79–87. DOI: 10.1080/15384047.2020.1859870
39. Zinser E., Rössner S., Littmann L. et al. The IL-2 diphtheria toxin fusion protein denileukin diftotox modulates the onset of diabetes in female nonobese diabetic animals in a time-dependent manner and breaks tolerance in male nonobese diabetic animals. *J Immunol* 2012;189(3):1173–81. DOI: 10.4049/jimmunol.1102691
40. Pemmaraju N., Konopleva M. Approval of tagraxofusp-erzs for blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Blood Adv* 2020;4(16):4020–7. DOI: 10.1182/bloodadvances.2019000173
41. Dhillon S. Moxetumomab pasudotox: first global approval. *Drugs* 2018;78(16):1763–7. DOI: 10.1007/s40265-018-1000-9
42. Dieffenbach M., Pastan I. Mechanisms of resistance to immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin A in cancer therapy. *Biomolecules* 2020;10(7):979. DOI: 10.3390/biom10070979
43. Cerise A., Bera T.K., Liu X. et al. Anti-mesothelin recombinant immunotoxin therapy for colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2019;18(3):192–9. DOI: 10.1016/j.clcc.2019.06.006
44. Granot-Matok Y., Ezra A., Ramishetti S. et al. Lipid nanoparticles-loaded with toxin mRNA represents a new strategy for the treatment of solid tumors. *Theranostics* 2023;13(11):3497–508. DOI: 10.7150/thno.82228
45. Nakashima I., Saito S., Akahoshi E. et al. Non-viral inducible caspase 9 mRNA delivery using lipid nanoparticles against breast cancer: an *in vitro* study. *Biochem Biophys Res Commun* 2022;635:144–53. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.09.105
46. Pathak S., Singh V., Kumar N., Jayandharan G.R. Inducible caspase 9-mediated suicide gene therapy using AAV6 vectors in a murine model of breast cancer. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2023;31:101166. DOI: 10.1016/j.omtm.2023.101166
47. Long Q., Yang R., Lu W. et al. Adenovirus-mediated truncated Bid overexpression induced by the Cre/LoxP system promotes the cell apoptosis of CD133+ ovarian cancer stem cells. *Oncol Rep* 2017;37(1):155–62. DOI: 10.3892/or.2016.5263
48. Garg H., Salcedo R., Trinchieri G., Blumenthal R. Improved nonviral cancer suicide gene therapy using survivin promoter-driven mutant Bax. *Cancer Gene Ther* 2010;17(3):155–63. DOI: 10.1038/cgt.2009.63
49. Rossignoli F., Grisendi G., Spano C. et al. Inducible Caspase9-mediated suicide gene for MSC-based cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2019;26(1–2):11–6. DOI: 10.1038/s41417-018-0034-1
50. Moradi-Mehr S., Khademy M., Akbari-Birgani S. et al. Comparative evaluation of the therapeutic strategies using a minimal model of luminal-A breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2023;666:107–14. DOI: 10.1016/j.bbrc.2023.05.028
51. Shariat S.F., Desai S., Song W. et al. Adenovirus-mediated transfer of inducible caspases: a novel “death switch” gene therapeutic approach to prostate cancer. *Cancer Res* 2001;61(6):2562–71.
52. Kemper K., Rodermond H., Colak S. et al. Targeting colorectal cancer stem cells with inducible caspase-9. *Apoptosis* 2012;17(5):528–37. DOI: 10.1007/s10495-011-0692-z
53. Montañó-Samaniego M., Bravo-Estupiñán D.M., Méndez-Guerrero O. et al. Strategies for targeting gene therapy in cancer cells with tumor-specific promoters. *Front Oncol* 2020;10:605380. DOI: 10.3389/fonc.2020.605380
54. Ji X., Zhang J., Cheng L. et al. Oncolytic adenovirus delivering herpes simplex virus thymidine kinase suicide gene reduces the growth of human retinoblastoma in an *in vivo* mouse model. *Exp Eye Res* 2009;89(2):193–9. DOI: 10.1016/j.exer.2009.03.007
55. Peng W., Chen J., Huang Y.H., Sawicki J.A. Tightly-regulated suicide gene expression kills PSA-expressing prostate tumor cells. *Gene Ther* 2005;12(21):1573–80. DOI: 10.1038/sj.gt.3302580
56. Yahya E.B., Alqadhi A.M. Recent trends in cancer therapy: a review on the current state of gene delivery. *Life Sci* 2021;269:119087. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119087
57. Li X., Le Y., Zhang Z. et al. Viral vector-based gene therapy. *Int J Mol Sci* 2023;24(9):7736. DOI: 10.3390/ijms24097736
58. Greig J.A., Martins K.M., Breton C. et al. Integrated vector genomes may contribute to long-term expression in primate liver after AAV administration. *Nat Biotechnol* 2023. DOI: 10.1038/s41587-023-01974-7
59. Zweiri J., Christmas S.E. Demonstration of anti-tumour bystander killing with prodrug-preloaded suicide gene-engineered tumour cells: a potential improvement for cancer therapeutics. *Cancer Cell Int* 2020;20:26. DOI: 10.1186/s12935-020-1115-4
60. Srivastava A., Mallela K.M.G., Deorkar N., Brophy G. Manufacturing challenges and rational formulation development for AAV viral vectors. *J Pharm Sci* 2021;110(7):2609–24. DOI: 10.1016/j.xphs.2021.03.024
61. Nguyen Q.M., Dupré P.F., Haute T. et al. Suicide gene strategies applied in ovarian cancer studies. *Cancer Gene Ther* 2023;30(6):812–21. DOI: 10.1038/s41417-023-00590-6
62. Ghasempour E., Hesami S., Movahed E. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy in the brain tumors. *Stem Cell Res Ther* 2022;13(1):527. DOI: 10.1186/s13287-022-03212-4
63. Oraee-Yazdani S., Tavaneai R., Rostami F. et al. Suicide gene therapy using allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cell gene delivery vehicles in recurrent glioblastoma multiforme: a first-in-human, dose-escalation, phase I clinical trial. *J Transl Med* 2023;21(1):350. DOI: 10.1186/s12967-023-04213-4

64. Hendijani F., Javanmard S.H., Sadeghi-aliabadi H. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cell secretome display antiproliferative effect on leukemia cell line and produce additive cytotoxic effect in combination with doxorubicin. *Tissue Cell* 2015;47(3):229–34. DOI: 10.1016/j.tice.2015.01.005
65. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents. *Bioessays* 2008;30(8):781–90. DOI: 10.1002/bies.20789
66. Dudkina E.V., Ulyanova V.V., Ilinskaya O.N. Supramolecular organization as a factor of ribonuclease cytotoxicity. *Acta Naturae* 2020;12(3):24–33. DOI: 10.32607/actanaturae.11000
67. Mitkevich V.A., Burnysheva K.M., Petrushanko I.Y. et al. Binase treatment increases interferon sensitivity and apoptosis in SiHa cervical carcinoma cells by downregulating E6 and E7 human papilloma virus oncoproteins. *Oncotarget* 2017;8(42):72666–75. DOI: 10.18632/oncotarget.20199
68. Mitkevich V.A., Kretova O.V., Petrushanko I.Y. et al. Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic Kasumi-1 cells. *Biochimie* 2013;95(6):1344–9. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.02.016
69. Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E. et al. Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase). *Biochim Biophys Acta* 2016;1863(7 Pt. A):1559–67. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.005
70. Mironova N.L., Petrushanko I.Y., Patutina O.A. et al. Ribonuclease binase inhibits primary tumor growth and metastases via apoptosis induction in tumor cells. *Cell Cycle* 2013;12(13):2120–31. DOI: 10.4161/cc.25164
71. Dudkina E., Ulyanova V., Asmandiyarova V. et al. Two main cancer biomarkers as molecular targets of binase antitumor activity. *Biomed Res Int* 2024;2024:8159893. DOI: 10.1155/2024/8159893
72. Mitkevich V.A., Tchurikov N.A., Zelenikhin P.V. et al. Binase cleaves cellular noncoding RNAs and affects coding mRNAs. *FEBS J* 2010;277(1):186–96. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07471.x
73. Sokurenko J.V., Zelenikhin P.V., Ulyanova V.V. et al. Identification of 2',3'-cGMP as an intermediate of RNA catalytic cleavage by binase and evaluation of its biological action. *Bioorg Khim* 2015;41(1):37–43. DOI: 10.1134/s1068162015010136
74. Azarashvili T., Krestinina O., Galvita A. et al. Ca²⁺-dependent permeability transition regulation in rat brain mitochondria by 2',3'-cyclic nucleotides and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296(6):C1428–39. DOI: 10.1152/ajpcell.00006.2009
75. Cabrera Fuentes H.A., Kalacheva N.V., Mukhametshina R.T. et al. Binase penetration into alveolar epithelial cells does not induce cell death. *Biomed Khim* 2012;58(3):272–80. DOI: 10.18097/pbmc20125803272
76. Ilinskaya O.N., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Y. et al. Binase induces apoptosis of transformed myeloid cells and does not induce T-cell immune response. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361(4):1000–5. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.07.143

Вклад авторов

Е.В. Дудкина, В.В. Ульянова, О.Н. Ильинская: сбор, анализ и интерпретация данных литературы, написание текста статьи, научное редактирование.

Authors' contributions

E.V. Dudkina, V.V. Ulyanova, O.N. Ilinskaya: collection, analysis and interpretation of literature data, article writing, scientific editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.В. Дудкина / E.V. Dudkina: <https://orcid.org/0000-0002-2817-1384>

В.В. Ульянова / V.V. Ulyanova: <https://orcid.org/0000-0003-1768-3314>

О.Н. Ильинская / O.N. Ilinskaya: <https://orcid.org/0000-0001-6936-2032>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-10036) в рамках Программы стратегического академического лидерства ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» («Приоритет-2030»).

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 21-74-10036) within the framework of the Strategic Academic Leadership Program of the Kazan (Volga Region) Federal University ("Priority-2030").