

КОМБИНИРОВАННАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ/ГЕНОТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ НА ОСНОВЕ АКТИВАЦИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ КОНСТРУКЦИЯМИ ЦИТОХРОМОВ СЕМЕЙСТВА P450

Н.Н.СОКОЛОВ, А.Н.ЯЦЕНКО, М.В.ПОКРОВСКАЯ

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии РАМН, 119832,
Москва, Погодинская ул., д.10; Телефон/факс (095) 248-40-08 / (095) 245-08-57;
Эл почта: sokolov@medic.ibmh.msk.su

В обзоре в общем плане обсуждается принципиально новый двухэтапный подход к лечению опухолей, связанный с локальной метаболической активацией противоопухолевых препаратов, получивший название **GDEPT** (gene directed enzyme prodrug therapy), который приводит к мощному повышению чувствительности опухолевых клеток к химиотерапевтическим средствам. Детально суммирован пока еще немногочисленный экспериментальный материал, касающийся разработки способа лечения злокачественных новообразований с помощью сочетанной химиотерапии оксазафосфоринами и генотерапии содержащими ген цитохрома P450 конструкциями.

Ключевые слова: цитохромы P450, циклофосфамид, ифосфамид, "гены самоубийства", химиотерапия, генотерапия.

ВВЕДЕНИЕ. В последние несколько лет в литературе описано достаточно много альтернативных генотерапевтических подходов к лечению злокачественных новообразований различной этиологии. Среди таких подходов следует отметить перечисленные в обзоре Зеленина и соавт. [1] применение иммуномодуляторов, в том числе цитокинов (интерлейкины 1, 2, 4, 6, γ -интерферон, фактор некроза опухолей, фактор, стимулирующий рост колоний макрофагов и гранулоцитов) с целью повышения иммуногенности опухолей [2,3], усиление противоопухолевой активности иммунокомпетентных клеток путем их генетической модификации [4,5], подавление антисмысловыми конструкциями или внутриклеточными антителами экспрессии онкогенов [6], введение в опухолевые клетки генов супрессоров опухолевого роста [7,8], а также так называемых "генов самоубийства", кодирующих ферменты, которые активируют или превращают терапевтически инертные химические соединения в мощные цитотоксические агенты [9,10]. Такой принципиально новый двухэтапный подход к лечению опухолей, получивший название **GDEPT** (gene

directed enzyme prodrug therapy), приводит к мощному повышению чувствительности опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам.

Локальная метаболическая активация противоопухолевых препаратов. Известно, что эффективность химиотерапии солидных опухолей определяется доступностью опухоли, чувствительностью опухолевых клеток к тому или иному цитостатику, а также локальной или общей токсичностью химиотерапевтического препарата [11]. Несмотря на недавние успехи в химиотерапии опухолей с использованием цисплатины, 5-фторурацила, таксола, генцитабина и других препаратов [12,13], их использование ограничивается значительной системной токсичностью для организма при введении высоких доз препаратов с целью создания их высокой локальной концентрации в опухолевой ткани [13,14]. Эта проблема может быть решена путем локальной активации противоопухолевых препаратов.

К числу наиболее хорошо изученных и разрабатываемых в настоящее время ферментов, кодируемых "генами самоубийства" [15], следует отнести тимидинкиназу вируса простого герпеса (HSVtk), фосфорилирующую аналоги нуклеозидов противовирусные препараты ацикловир или ганцикловир до соответствующих трифосфатных производных, которые ингибируют активность ДНК-полимеразы и тем самым блокируют синтез ДНК [16,17], цитозиндезаминазу *E.coli*, превращающую относительно нетоксичный 5-фторцитозин в токсический для клеток метаболит 5-фторурацил [18], нитроредуктазу *E.coli*, активирующую малоактивное монофункциональное алкилирующее соединение 5-(азиридин-1-ил)-2,4-динитробензамид (СВ1954) до мощного алкилирующего бифункционального агента, образующего поперечные сшивки ДНК [19], пуриннуклеозидфосфорилазу *E.coli*, метаболизирующую относительно инертное соединение 6-метилпурин-2'-дезоксирибозид до высокотоксичного 6-метилпурина [20], бактериальный фермент карбоксипептидазу G2, активирующую 4-[2-хлорэтил](2-мезилоксиэтил) (амино)бензоил-L-глутаминовой кислоты] до мощных цитотоксических агентов [21].

Сочетанная химио/генотерапия на основе использования генетических конструкций цитохромов P450. Цитохромы семейства P450, осуществляют метаболическую деградацию и активацию в клетках фармакологически и токсически инертных противоопухолевых алкилирующих препаратов циклофосамида и его изомера ифосфамида с образованием цитотоксических метаболитов 4-гидрокси-ЦФА и горчичного фосфорамида. В настоящем обзоре литературы суммирован пока еще немногочисленный экспериментальный материал, касающийся разработки нового подхода к лечению злокачественных новообразований с помощью сочетанной химиотерапии оксазафосфоринами и генотерапии содержащими ген цитохрома P450 конструкциями [22].

Как уже упоминалось, оксазафосфорины (ЦФА и ИФА) являются терапевтически неактивными противоопухолевыми препаратами, которые должны быть активированы микросомальными печеночными цитохромами P450 до фармакологически активных метаболитов горчичного фосфорамида и акролеина, алкилирующих соответственно ДНК и белки (рис.).

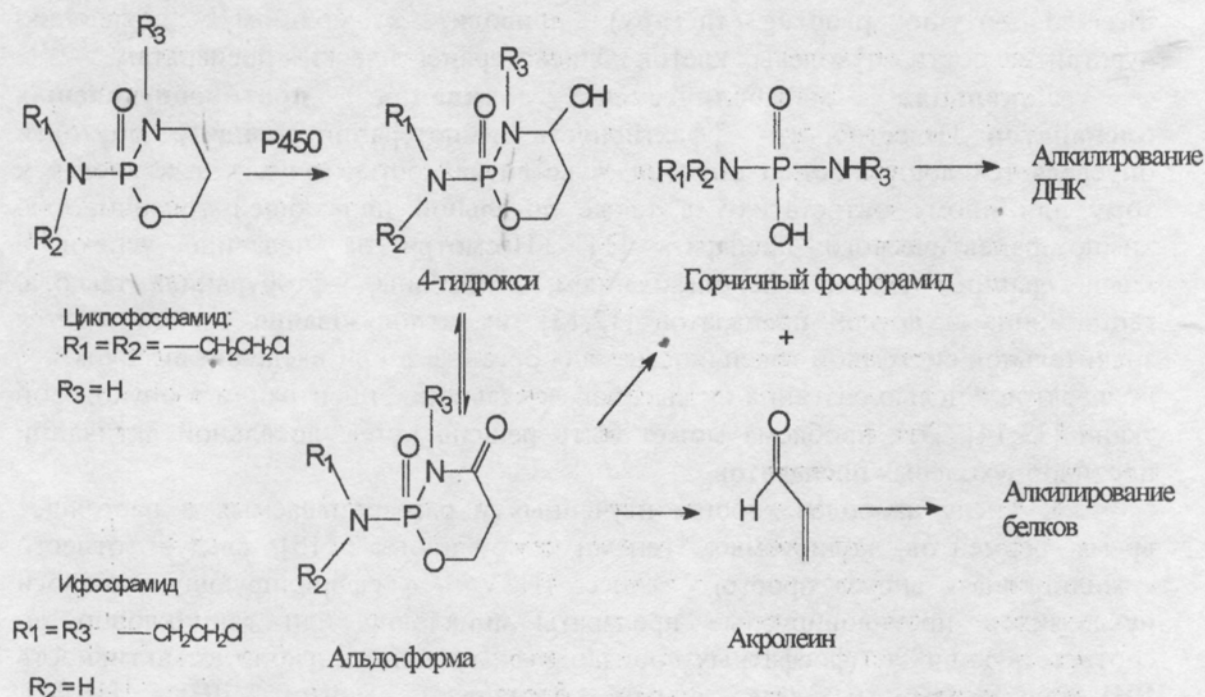


Рисунок.

Пути обмена циклофосфамида и ифосфамида, катализируемого цитохромами P450 (по Chen and Waxman [35] с изменениями).

Следует отметить, что за цитотоксический противоопухолевый эффект ЦФА ответственен горчи́чный фосфора́мид, в то время как акролеин, образующийся в эквимольных количествах с горчи́чным фосфора́мидом при химическом превращении 4-гидроксифосфамид/альдофосфамида, оказывает сильное токсическое действие на сердечную и скелетную мускулатуру, почки и костный мозг [23]. При окислении боковой цепи ЦФА (N-деалкилирование) происходит образование неалкилирующего метаболита дехлорэтил-ЦФА и хлорацетальдегида, ответственного за сильный нейротоксический эффект при химиотерапии высокими дозами ЦФА, причем превращение ЦФА до этих соединений осуществляется преимущественно цитохромами P450 2C9 и 3A4 [24,25]. Прямое введение цитотоксических метаболитов оксазофосфоринов не оказывает существенного эффекта вследствие очень короткого времени их полувыведения (~30 мин) [26]. Таким образом, локальная генотерапия цитохромом P450, сочетанная в системным введением ЦФА или ИФА, позволяет создать высокую концентрацию активных цитотоксических метаболитов в опухоли и уменьшить их общий токсический эффект на организм. Целесообразность рассматриваемого генотерапевтического подхода к лечению опухолей подтверждается и данными о том, что циклофосфамид при введении крысам снижает уровень экспрессии и активность микросомальных печеночных цитохромов P450 [27,28], что в итоге приводит к уменьшению образования терапевтически активных метаболитов этого цитостатика. Кроме того, общий уровень цитохромов P450 в опухолевых клетках ниже, чем в здоровой ткани, что снижает биотрансформацию оксазофосфоринов [29]. Цитохромы P450,

осуществляющие активацию ЦФА и ИФА, идентифицированы в печени крысы [30,31] и человека [32]. В печени взрослых крыс биотрансформацию ЦФА катализируют три изоформы цитохрома P450: индуцируемый фенобарбиталом цитохром P450 2B1 и конститутивно экспрессируемые цитохромы P450 2C6 и 2C11 [30]. Изоформа цитохрома P450 3A4 печени крысы активна в активации ИФА [31]. В печени человека за биотрансформацию ЦФА и ИФА ответственны изоформы цитохрома P450 2B6 и 3A4 [32]. Среди цитохромов семейства P450 печени крысы наиболее активным в метаболизме оксазафосфоринов является цитохром P450 2B1, в то время как в печени человека - изоформа 2B6 [33].

Первые указания на метаболическую активацию противоопухолевых препаратов ЦФА и ИФА при введении генов цитохромов P450 были получены Chang et al. [32], которые исследовали *in vitro* активацию оксазафосфоринов В-лимфобластными клетками (не содержат цитохрома P450), стабильно трансформированными ДНК, ответственными за синтез различных изоформ цитохромов P450. Было установлено, что цитохромы P450 2A6, 2B6, 2C8, 2C9 и 3A4 являются наиболее активными в биоактивации ЦФА и ИФА. В то же время, цитохромы P450 1A1, 1A2, 2D6 и 2E1 были не активны в этом отношении. Показано, что микросомальные цитохромы P450 2B и 3A печени человека предпочтительно катализируют биоактивацию соответственно ЦФА и ИФА. Тем не менее, не было ясно, будет ли происходить усиление биodeградации оксазафосфоринов и повышение образования цитотоксических метаболитов в случае введения генов цитохромов P450 в опухолевые клетки.

Первые работы по переносу генов цитохромов P450 в опухолевые клетки, с целью изучения возможности повышения эффективности химиотерапии оксазафосфоридами были выполнены на культуре клеток глиосаркомы L9 крысы *in vitro* и на имплантированных крысам линии Fisher 344 подкожно или интракраниально глиосаркоматозных клетках. Выбор 9L глиосаркомы в качестве модели объясняется несколькими причинами, включая локализованный характер опухоли, хорошо разработанные методы доставки вирусных векторов в опухолевую ткань путем стереотактических инъекций, относительно низкой иммунной реакцией ЦНС в ответ на введение вирусных векторов или продуктов экспрессии гетерологичных генов, а также слабым транспортом активируемых в печени метаболитов оксазафосфоринов через гематоэнцефалический барьер [34]. Кроме того, клетки 9L глиосаркомы экспрессируют цитохром P450 редуктазу, являющуюся белком-партнером всех P450-зависимых ферментативных реакций, но обладают низкой активностью эндогенных цитохромов P450, что делает клетки этой линии удобной моделью в экспериментах по переносу генов цитохромов [29].

Chen and Waxman [35] показали, что клетки 9L глиосаркомы, стабильно трансфицированные геном цитохрома P450 2B1 печени крысы в составе экспрессионной плазмиды pMT-CYP 2B1, приобретают высокую чувствительность к цитостатическому действию ЦФА и ИФА, в отличие от интактных 9L клеток или 9L клеток, трансфицированных плазмидой pMSCV- β -gal.Neo, содержащей репортерный ген галактозидазы *E.coli*. Аналогичные результаты были получены Wei et al. [36], установившими, что трансфекция клеток глиомы C6 крысы приводит к повышению их чувствительности к цитотоксическому действию ЦФА. Метирапон, селективный ингибитор

цитохрома Р450 2В1, блокировал вызываемое введением гена Р450 2В1 повышение цитотоксического эффекта оксазафосфоринов на глиосаркоматозные клетки [35].

При интратуморальном введении в 9L глиосаркому генов цитохромов Р450 2В6, 2С8, 2С9, 2С18, 2С19 или 3А4 в составе ретровируса цитотоксическое действие ЦФА наиболее сильно возрастало при экспрессии Р450 2В6 [37]. В случае же использования в качестве цитостатика ИФА наибольший цитотоксический эффект наблюдался при трансфекции клеток геном цитохрома Р450 3А4.

В этой же работе было доказано, что при обработке ЦФА или ИФА совместно культивируемых и взятых в равном количестве интактных и трансфицированных геном цитохрома Р450 2В1 опухолевых клеток происходит гибель более 80% клеток. Такой результат объясняется "эффектом присутствия" (bystander effect), характерным для механизма действия многих "суицидных генов". Для проявления этого эффекта необходим функционально активный цитохром Р450 2В1, поскольку метирапон блокирует его развитие. Считается, что "эффект присутствия" связан с внутриклеточным переносом легко диффундирующего через клеточные мембраны цитотоксического метаболита даже в отсутствии межклеточных контактов, в результате чего создается высокая локальная концентрация 4-гидрокси-ЦФА, и, возможно, продуктов его деградации горчичного фосфорамид и акролеина, оказывающих цитотоксическое действие на не содержащие гена цитохрома Р450 опухолевые клетки [38]. Интересно, что бистандерный эффект наблюдается даже в том случае, если лишь 10% клеток глиосаркомы С6 содержат генетическую конструкцию цитохрома Р450 2В1 причем среда, в которой культивируются клетки, способна вызывать их гибель [39]. Отсутствие потребности в межклеточных контактах отличает механизм цитотоксического действия цитохрома Р450 2В1/ЦФА от такового системы "суицидного" гена HSV-tk/ганцикловир [40,41] и является важным преимуществом генотерапии цитохромами семейства Р450, обеспечивающей более обширное распределение активных метаболитов в опухолевой ткани. В принципе, благодаря эффекту присутствия регрессия злокачественной опухоли может быть достигнута, если лишь небольшая часть опухолевых клеток эффективно экспрессирует цитохром Р450. Не исключается участие и другого механизма, связанного с переносом апоптотического сигнала от погибших трансфицированных цитохромом Р450 клеток к интактным. Дальнейшие исследования должны выяснить детальный механизм гибели клеток при генотерапии цитохромом Р450.

Другое важное преимущество генотерапии рака, основанной на введении генов цитохромов Р450, по сравнению с системой HSV-tk/ганцикловир, состоит в том, что образование цитотоксических метаболитов оксазафосфоринов не связано с синтезом ДНК. Если противоопухолевый эффект трифосфатных производных ацикловира и ганцикловира связан с фазой клеточного цикла, то система цитохром Р450/оксазафосфорины функционирует постоянно, цитотоксический горчичный фосфорамид алкилирует ДНК независимо от фазы роста, в которой находится опухолевая клетка.

Еще одним важным достоинством генотерапии опухолей с использованием цитохромов Р450 является возможность усиления локального

противоопухолевого действия оксазафосфоринов путем избирательного угнетения ингибиторами, такими как 21,21-дихлоропрогестерон или 3,5-дикарбэтокси-2,6-диметил-4-этил-1,4-дигидропиридин [42,43], активности в печени изоформ цитохромов P450, участвующих в системной активации противоопухолевых препаратов. В случае достижения такого селективного подавления активности печеночных цитохромов P450, осуществляющих биоактивацию оксазафосфоринов у человека [32], можно свести к минимуму общее системное токсическое действие на организм цитотоксических метаболитов ЦФА и ИФА, характерное для обычной химиотерапии этими препаратами.

Помимо 9 L глиосаркомы в качестве модели для разработки подходов к сочетанной химиотерапии оксазафосфоридами/генотерапии цитохромами P450 был использован рак молочной железы человека MCF-7 [44]. В опытах *in vivo* показано, что трансфецированные геном цитохрома P450 2B1 крысы клетки MCF-7 значительно более чувствительны к цитотоксическому действию ЦФА и ИФА, по сравнению с интактными клетками. При интратуморальном введении гена цитохрома P450 мышам с перевивной опухолью MCF-7 цитотоксический эффект ЦФА усиливался в 15-20 раз, при этом не отмечалось возрастания общего токсического действия ЦФА на организм.

Другим объектом для изучения эффективности рассматриваемого подхода к лечению злокачественных новообразований явилась аденокарцинома PaCa-44 поджелудочной железы человека, одна из самых злокачественных и быстрорастущих опухолей. Если во всех без исключения работах гены цитохрома P450 вводили в составе адено- или ретровирусных векторов, то Lohr et al., [45] в качестве средства доставки гена цитохрома P450 2B1 выбрали плазмиду pcDNA3 ("Invitrogen"), которая была трансфецирована в клетки почки кошки, инкапсулированные в целлюлозофосфат. Плазида pcDNA3 несет ген неомизинфосфотрансферазы, определяющий устойчивость к аналогу неомизина G418, что необходимо для селекции клонов бактериальных клеток, экспрессирующих цитохром P450, а также промоторы T7, Sp6 и SV40 и полилинкерную последовательность для 11 рестриктаз. Ген цитохрома находится под контролем раннего CMV промотора. При инъекции таких генетически модифицированных клеток (20-40 капсул однократно) мышам в трансплантированную подкожно аденокарциному поджелудочной железы и последующем в/б введении ИФА (каждые 3 дня 100 мг/кг; 2 недели) у 20% животных наблюдалось полное исчезновение опухоли, а у остальных мышей отмечалось значительное уменьшение ее размеров. Инкапсулированные клетки сохраняют жизнеспособность и энзиматическую активность P450 в клеточной культуре, по меньшей мере, в течение 4 недель. Локальное использование таких капсул для лечения аденокарциномы поджелудочной железы представляется тем более оправданным, и перспективным, поскольку введение в проток поджелудочной железы аденовирусных конструкций вызывает развитие панкреатита [46].

Те же авторы в аналогичных исследованиях использовали эмбриональные эпителиальные клетки человека, генетически модифицированные цитохромом P450 и инкапсулированные в целлюлозоацетат [47]. При обкалывании такими клетками аденокарциномы поджелудочной железы (клеточная линия PaCa-44),

перевитой иммунокомпетентным мышам, и последующем в/б введении низких доз ИФА наблюдалось частичное или даже полное исчезновение опухоли. Несомненно, что такая стратегия химиотерапии *in situ* с использованием генетически модифицированных клеток может найти применение для лечения солидных опухолей у человека.

Повышение эффективности сочетанной химио-/генотерапии генетическими конструкциями на основе цитохромов P450 может быть достигнуто при разработке нескольких аспектов, связанных с функционированием последних.

Во-первых, это относится к использованию тех или иных агентов, активирующих цитохромы P450. В качестве примера можно привести данные Weber и Waxman [31], показавших, что предварительное введение крысам дексаметазона примерно в 6 раз усиливает биоактивацию ИФА индуцируемым этим гормоном цитохромом P450 3A4, при этом превращение ЦФА не изменяется. Другими перспективными соединениями, стимулирующими биоактивацию оксазафосфоринов, могут служить фенobarбитал и рифампин. Так, Chang et al. [48] установили, что эти соединения повышают на 200-400% скорость реакции 4-гидроксирования ЦФА и ИФА в культурах гепатоцитов человека, при этом возрастал уровень цитохромов P450 2B6, 2C8, 2C9 и 3A4, ответственных за биоактивацию оксазафосфоринов. В плане направленной регуляции P450-зависимого метаболизма оксазафосфоринов следует упомянуть работу Brain et al. [49], в которой в опытах *in vivo* на крысах было изучено влияние ряда индукторов и ингибиторов на превращение ИФА по путям активации (образование 4-гидрокси-ИФА) или N-деалкилирования (образование нейротоксического метаболита хлорацетальдегида). Было показано, что введение крысам фенobarбитала снижает, а метирапона повышает образование 4-гидрокси-ИФА. В другой работе [50] было установлено, что специфический ингибитор цитохрома P450 3A4 триацетилолеандомицин подавляет N-деалкилирование ИФА микросомами печени человека. Таким образом, существуют реальные возможности избирательного ингибирования превращения оксазофосфоринов по нежелательному пути N-деалкилирования, приводящего к накоплению обладающего побочным токсическим действием хлорацетальдегида.

Во-вторых, учитывая то обстоятельство, что интенсивность осуществляемого цитохромами P450 превращения лекарственных препаратов прямо зависит от притока электронов, поставляемых флавопротеином NADP-P450 редуктазой, Chen et al. [51] исследовали возможность использования в комбинированной химио-/генотерапии системы коэкспрессии этих двух ферментов. Было установлено, что при суперэкспрессии редуктазы клетками глиосаркомы 9L крысы чувствительность этих клеток к ЦФА возрастает лишь в том случае, если одновременно происходит экспрессия цитохрома P450 2B1. Цитотоксическое действие ЦФА значительно снижается в присутствии хлорида дифенилгидрохлора (ингибитор редуктазы) или метирапона (ингибитор цитохрома P450), что указывает на важность обоих ферментов в этом процессе. В опытах *in vivo* на модели подкожной солидной опухоли крысы эти же авторы показали, что при одновременной экспрессии в опухолевых клетках генов цитохрома P450 и редуктазы цитотоксический эффект ЦФА возрастает в 50-100 раз. Позднее Jounaidi et al. [37] установили, что введение генетической

конструкции цитохромов P450 2B6 или 2C18 в характеризующиеся повышенным уровнем синтеза редуктазы клетки глиосаркомы 9L, п/к перевитой иммунокомпетентным мышам, резко усиливает P-450-зависимый цитотоксический эффект ЦФА.

Помимо оксазафосфоринов, цитохромы семейства P450 способны превращать и ряд других нетоксичных инертных соединений, например, 2-аминоантрацен и 4-ипомеанол, в высокотоксичные алкилирующие метаболиты, вызывающие фрагментацию ДНК и поперечные сшивки ДНК и белков. Rainov et al. [52] в опытах *in vitro* и на клетках глиосаркомы 9L грызунов и U87 человека, стабильно экспрессирующих цитохром P450 4B1 и в опытах *in vivo* на модели п/к перевитой мышам глиосаркомы 9L показали, что цитотоксический эффект 2-аминоантрацена и 4-ипомеанола значительно возрастает в случае повышенного уровня экспрессии цитохрома. Для этой системы сочетанной химио-/генотерапии также характерны низкие концентрации 2-аминоантрацена и 4-ипомеанола, необходимые для гибели опухолевых клеток, "бистандерный эффект" и способность липофильных 2-аминоантрацена и 4-ипомеанола проникать через гематоэнцефалический барьер.

Обзор написан в процессе работы по проекту 05 "Генодиагностика и генотерапия социально-значимых заболеваний человека", поддержанным Федеральной целевой научно-технической программой "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники гражданского назначения".

ЛИТЕРАТУРА

1. Зеленин А.В., Кайгородов В.А., Прасолов В.С. (1998). Молекул. биол. **32**, 219-228.
2. Dranoff G., Jaffee E., Lazenby A. et al. (1993). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **90**, 3539-3543.
3. Rosenberg S.A. (1992). J.Clin.Oncol. **10**, 180-199.
4. Rosenberg S.A., Spiess P., Lafreniere R. (1986). Science **223**, 1318-1321.
5. Griffith K.D., Read E.L., Carrasquillo J.A. et al., (1989). J.Natl.Cancer Inst. **81**, 1709-1717.
6. Alama A., Barbieri F., Cagnoli M., Schettini G. (1997). Pharmacol. Res. **36**, 171-178.
7. Freeman S.M., Ramesh R., Matrogi A.J. et al. (1994). Cancer Gene Ther. **1**, 326-332.
8. Freeman S.M., Whartenby K.A., Freeman J.L. et al. (1996). Seminars in Oncology 1996 **23**, 21-45.
9. Israel M.A. (1993). Adv.Cancer Res., **61**, 57-85.
10. Connors T.A. (1995). Gene Therapy, **2**, 702-709.
11. Chabot G.G. (1994). Anticancer Res. **14**, 2269-2272.
12. Carmichael J. et al. (1996). Br. J. Cancer. **73**: 101-105.
13. Ahlgren J.D. Cancer (1996). **78**, 654-663.
14. Kobayashi H. et al. (1993). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **90**, 3294-3298.
15. Dilber M.C., Smith C.I.E. (1997). Gene Therapy **4**, 273-274.

16. Kwong Y.L., Chen S.H., Kosai K. et al. (1996). *Cancer Gene Ther.* **3**. 339-344.
17. Al-Hendy. A., Auersperg N. (1997). *Gynecol. Obstet. Invest.* **43**. 268-275.
18. Mullen C.A., Kilstrup M., Blaese R.M. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**. 33-37.
19. Bailey S.M., Knox R.J., Hobbs S.M. et al. (1996). *Gene Therapy*, **3**. 1143-1150.
20. Parker W.B., King S.A., Alfari P.W. et al. (1997). *Hum. Gene Ther.* **8**. 1637-1644.
21. Marais R., Spooner R.A., Light Y et al. (1996). *Cancer Res.* **56**. 4735-4742.
22. Waxman D.J., Chen L., Hecht J.E., Jounaidi Y. (1999). *Drug Metab. Rev.* **31**. 503-522.
23. Friedman H.S., Colvin O.M., Aisaka K. et al. (1990). *Cancer Res.* **50**. 2455-2462.
24. Bohnenstengel F., Hoffman U., Eichelbaum M., Kroemer H.K. (1996). *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **51**. 297-301.
25. Ren S., Yang J.S., Kalthorn T.F., Slattery J.T. (1997). *Cancer Res.* **57**. 4229-4235.
26. Sladek N.E., Powers J.F., Grage G.M. (1984). *Drug Metabol. Dispos.* **12**. 553-559.
27. Kraner J.C., Morgan E.T., Poet T.S et al. (1996). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1**. 258-264.
28. Walter R., Hadasova E., Scheuch E., Siegmund W. (1996). *Pharmazie.* **51**. 498-500.
29. Кобляков В.А. (1995). *Биохимия* **11**. 1335-1345.
30. Clark L., Waxman D.J. (1989). *Cancer Res.* **49**. 2344-2350.
31. Weber G.F., Waxman D.J. (1993). *Biochem. Pharmacol.* **45**. 1685-1694.
32. Chang T.K., Weber G.F., Crespi C.L., Waxman D.J. (1993). *Cancer Res.* **53**. 5629-5637.
33. Code E.L., Crespi C.L., Penman B.W. et al. (1997). *Drug Metab. Dispos.* **25**. 985-993.
34. Genka S. et al. (1990), *Cancer Chemother. Pharmacol.* **27**. 1-7.
35. Chen L., Waxman D.J. (1995). *Cancer Res.* **55**. 581-589.
36. Wei M.X., Tamiya T., Chase M. et al. (1994). *Hum. Gene Ther.* **5**. 969-978.
37. Jounaidi Y., Hecht J.E., Waxman D.J. (1998). *Cancer Res.* **58**. 4391-4401.
38. Sladek N. E. (1988). *Pharmacol. Ther.* **37**. 301-355.
39. Wei M.X., Tamiya T., Rhee R.L. et al. (1995). *Clin. Cancer Res.* **1**. 1171-1177.
40. Ram Z., Culver K.W., Walbridge S. et al. (1993). *Cancer Res.* **53**. 83-88.
41. Bi W.L., Parysek L.M., Warnick R., Stambrook P.J. (1993). *Hum. Gene Ther.* **4**. 725-721.
42. Halpert J., Jaw., Cornfield L.J. et al. (1989). *Drug Metab. Dispos.* **17**. 26-31.
43. Correia M.A., Yao K., Wrighton S.A. et al. (1992). *Arch. Biochem. Biophys.* **294**. 493-503.
44. Chen L., Waxman D.J., Chen D., Kufe D.W. (1996). *Cancer Res.* **56**. 1331-1340.
45. Lohr M., Muller P., Karle P. et al. (1998). *Gene Therapy*. **5**, 11070-1978.
46. Raper S.E., DeMatteo R.P. (1996). *Pancreas* **12**. 401-410.

47. *Karle P., Muller P., Renz R. et al.* (1998). *Adv.Exp.Med.Biol.* **451**. 97-106.
48. *Chang T.K., Yu L., Maurel P., Waxman D.J.* (1997). *Cancer Res.* **57**. 1946-1954.
49. *Brain E.G., Yu L.J., Gustafsson K. et al.* (1998). *Br.J.Cancer* **77**. 1768-1776.
50. *Walker D, Flinois J.P., Monkman S.C. et al.* (1994). *Biochem. Pharmacol.* **47**. 1157-1163.
51. *Chen L., Yu L.J., Waxman D.J.* (1997). *Cancer Res.* **57**. 4830-4837.
52. *Rainov N.G., Dobberstein K.V., Esteves M., et al.* (1998). *Hum.Gene Ther.* **9**. 1261-1273.

Поступила 07.11.99.

**COMBINED CHEMOTHERAPY/GENE THERAPY OF TUMORS BASED ON
ACTIVATION OF ANTITUMOUR PREPARATIONS WITH GENETIC
CONSTRUCTIONS CONTAINING CYTOCHROMES P450.**

N.N. SOKOLOV, A.N. YATZENKO, M.V. POKROVSKAYA

Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya 10, Moscow, 119832,
Tel./fax (095) 240-40-08/(095) 245-08-57; e-mail sokolov@ibmh.msk.su

This article generally reviews new original two-stage approach to an effective treatment of solid cancers by killing tumour cells by the activation of a prodrug after the gene encoding for an activating enzyme has been targeted to the malignant cell. The experimental data concerning gene therapy for malignant tumours by using oxazaphosphorines and cytochrome P450 in a novel combined chemotherapy/cancer gene therapy strategy discussed.

Key Words: cytochromes P450, cyclophosphamide, ifosfamide, "suicide genes", chemotherapy, gene therapy