

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

EXPERIMENTAL RESEARCH

Рибонуклеазы с антипролиферативной активностью: молекулярно-биологические и биохимические свойства

В.С. Покровский¹, Е.М. Трещалина¹, Н.В. Андропова¹, С.М. Деев²

¹ ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

² ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемьякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, Москва, Российская Федерация, 117997

Ribonucleases with Antiproliferative Properties: Molecular Biological and Biochemical Characteristics

VS Pokrovskii¹, EM Treshchalina¹, NV Andronova¹, SM Deev²

¹ N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

² M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 16/10 Miklukho-Maklaya str., Moscow, Russian Federation, 117997

РЕФЕРАТ

Статья посвящена рибонуклеазам (РНКазы), цитотоксический эффект которых определяется ферментативной активностью, т. е. способностью катализировать расщепление фосфодиэфирных связей РНК. Представлены известные и собственные данные о РНКазах с противоопухолевыми свойствами различного происхождения, проведен поиск параллелей между механизмами цитотоксичности, биохимическими и молекулярно-биологическими свойствами. Анализ данных литературы дает возможность считать, что все перечисленные свойства вносят свой вклад в антипролиферативное действие РНКаз. Основной проблемой для этого ряда ферментов остается достижение селективной биодоступности. Это решается путем создания конъюгатов, как это показано для ранпирназы и барназы. По основным фармакологическим характеристикам активные противоопухолевые РНКазы перспективны не только в онкогематологии, но и при терапии солидных опухолей.

Ключевые слова: рибонуклеаза, ранпирназа, амфиназа, бианаза, барназа, фармакологические характеристики.

Получено: 4 января 2016 г.

Принято в печать: 7 января 2016 г.

Для переписки: Вадим Сергеевич Покровский, канд. мед. наук, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478; тел.: +7(499)324-14-09; e-mail: vadimpokrovsky@yandex.ru

Для цитирования: Покровский В.С., Трещалина Е.М., Андропова Н.В., Деев С.М. Рибонуклеазы с антипролиферативной активностью: молекулярно-биологические и биохимические свойства. Клиническая онкогематология. 2016;9(2):130–7.

DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-2-130-137

ABSTRACT

The article dwells on ribonucleases (RNAses) whose cytotoxic activity depends on the enzymatic activity, i.e. the ability to catalyze the cleavage of phosphodiester bonds of RNA. It presents both well-known information and our own data on RNAses of different origins with antitumor properties; it investigates the relation between the mechanism of cytotoxicity and biochemical and molecular biological characteristics. The analysis of published data demonstrates that all above characteristics contribute to the antiproliferative activity of RNAses. The major challenge for this group of enzymes is the achieving of selective bioavailability. This problem can be solved by creating conjugates as in case with ranpirnase and barnase. Based on their major pharmacological properties, active antitumor RNAses have great perspectives for treatment of not only oncohematological, but also solid malignancies.

Keywords: ribonucleases, ranpirnase, amphinase, binase, barnase, pharmacological properties.

Received: January 4, 2016

Accepted: January 7, 2016

For correspondence: Vadim Sergeevich Pokrovskii, PhD, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478; Tel.: +7(499)324-14-09; e-mail: vadimpokrovsky@yandex.ru

For citation: Pokrovskii VS, Treshchalina EM, Andronova NV, Deev SM. Ribonucleases with Antiproliferative Properties: Molecular Biological and Biochemical Characteristics. Clinical oncohematology. 2016;9(2):130–7 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-2-130-137

ВВЕДЕНИЕ

Рибонуклеазы (РНКазы) — важнейшие ферменты метаболизма РНК, функции которых заключаются в расщеплении мРНК, превращении предшественников РНК в зрелые формы, продукции малых регуляторных РНК, деградации определенных типов РНК. Клетка содержит много различных РНКаз, которые могут входить в состав надмолекулярных комплексов и проявлять высокую специфичность к определенным нуклеотидным последовательностям [1]. В последние годы особое внимание уделяется таким биологическим эффектам РНКаз, как контроль роста кровеносных сосудов, токсичность по отношению к клеткам опухолей, противовирусная активность. Современные представления о роли и функциях РНКаз в клетках позволяют рассматривать эти ферменты как перспективную альтернативу традиционным средствам химиотерапии злокачественных новообразований [2].

Антипролиферативные свойства РНКаз впервые были описаны в начале 1950-х годов, когда *in vitro* и *in vivo* был выявлен противоопухолевый эффект РНКазы А. В частности, панкреатическая РНКаза при внутрибрюшинном введении на 30–50 % увеличивала жизнь мышей с асцитной карциномой Эрлиха или саркомой Уокера 256 [3]. Однако первые результаты изучения РНКаз *in vivo* на опухолевых моделях оказались малоутешительными: ингибирующий эффект этих ферментов проявлялся лишь при внутриопухолевом введении в относительно высоких дозах. В конце прошлого века появились сообщения о значительной цитотоксичности некоторых РНКаз в культурах опухолевых клеток, что возродило интерес онкологов к этой группе ферментов и способствовало интенсификации поиска агентов с антипролиферативными свойствами.

К настоящему времени активные РНКазы обнаружены среди представителей известных суперсемейств — РНКазы А и РНКазы Т1. Ранее других описаны РНКазы, выделенные из семенников быка, онконаза и ранпирназа, а также другие РНКазы земноводных. Затем появились публикации о биназе, барназе и других ферментах. Различные РНКазы и конъюгаты (иммуноРНКазы) на их основе охарактеризованы в ряде обзорных работ в качестве потенциальных противоопухолевых агентов [4–6].

Антипролиферативное действие РНКаз связывают с регуляцией РНК-зависимых механизмов клеточной пролиферации и апоптоза, а также функции Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов [7]. Существует предположение, что цитотоксичность РНКаз напрямую связана с уровнем экспрессии онкогенов *ras* [8].

Разноречивые проявления антипролиферативной активности отдельных РНКаз, и особенно возобновление поиска в этом ряду оригинальных противоопухолевых агентов, побудили авторов настоящей статьи обсудить опубликованные и собственные данные об особенностях действия наиболее хорошо изученных РНКаз *in vitro/in vivo* в фокусе клинической перспективы.

РАНПИРНАЗА (ОНКОНАЗА)

Изучение ранпирназы как противоопухолевого фермента началось после 1980 г. с выделения из ооцитов леопардовой лягушки *Rana pipiens* белка Р-30 с цитостатиче-

скими свойствами [9]. Позднее было установлено, что этот белок обладает РНКазной активностью и принадлежит к суперсемейству РНКаз панкреатического типа (РНКазы А), активных в отношении высокомолекулярной РНК, в т. ч. мРНК, играющей важную роль в экспрессии генов [10].

К настоящему времени ранпирназа является наиболее хорошо изученной РНКазой с доказанными противоопухолевыми свойствами в эксперименте и клинике. Аминокислотная последовательность ранпирназы состоит из 104 аминокислотных остатков, что делает ее самым маленьким ферментом из суперсемейства. Как и у других РНКаз А, активный центр ранпирназы представлен каталитической триадой His10, Lys31 и His97. Ранпирназа катализирует расщепление связи Р–O5' со стороны 3'-пиримидинового основания цепи РНК [11]. Расщепление РНК под действием ранпирназы приводит к угнетению синтеза циклина D3 и стимуляции p27^{KIP1}, p16^{INKA} и p21^{WAF1/CIP1}, что препятствует фосфорилированию pRb в фазе G0/G1 и обуславливает остановку клеточного цикла в сверочной точке, контролируемой циклином D и циклинзависимыми киназами Cdk4/6 [12]. Существуют также данные о том, что фермент потенцирует действие на опухолевые клетки фактора некроза опухолей α и вызывает апоптоз [13].

На клетках Т-лимфобластного лейкоза Jurkat показано выраженное угнетение пролиферации через 72 и 96 ч после инкубации, сопровождающееся выраженным снижением экспрессии Rb [14]. Для реализации противоопухолевого эффекта ранпирназа должна проникнуть в опухолевую клетку. Считается, что это происходит путем связывания с поверхностью клетки и последующего эндоцитоза [15]. Наличие рецепторов на поверхности опухолевых клеток, способных связываться с ранпирназой, остается спорным [15]. Возможным вспомогательным механизмом связывания с поверхностью клетки является электростатическое взаимодействие. Ранпирназа обладает высоким положительным зарядом (pI > 9,5), в то время как поверхность опухолевых клеток, особенно при онкогематологических заболеваниях, заряжена резко отрицательно [15, 16]. Последующий эндоцитоз ранпирназы проходит с участием AP-2/клатрина [15]. Важным свойством ранпирназы является ее устойчивость к действию внутриклеточных ингибиторов РНКаз [17].

На молекулярном уровне изначально предполагалось, что антипролиферативное действие ранпирназы связано с расщеплением рРНК 28S и 18S [18]. Впоследствии возможной мишенью ранпирназы была названа тРНК [19], расщепление которой происходит по связям GG и UG [20]. Разрушение как тРНК, так и рРНК приводит к угнетению трансляции в опухолевых клетках, однако ряд наблюдений специфической активности онконазы опровергает это предположение. В частности, наблюдаемые внутриклеточные изменения после коинкубации с ранпирназой отличаются от характерных для других ингибиторов трансляции, таких как циклогексимид [21].

В то время как классические ингибиторы трансляции неспецифически останавливают клеточный цикл, онконаза изначально останавливает цикл в фазе G1, а апоптоз происходит с задержкой в 24–48 ч [12]. Кроме того, ряд генов, кодирующих белки, которые регулируют клеточный цикл, активируется под действием онконазы [12]. Эти данные ставят под сомнение тот факт, что опре-

деляющим фактором в механизме противоопухолевой активности ранпирназы является расщепление тРНК, мРНК или рРНК, которое приводило бы к неизбирательному подавлению синтеза белка.

Альтернативный механизм действия онконазы связан с расщеплением некодирующих РНК (микроРНК), которые регулируют экспрессию генов путем РНК-интерференции [22]. В частности, показано, что инактивация гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы под действием коротких интерферирующих siРНК в клетках А549 может быть предотвращена введением онконазы [23]. Предполагается, что именно способность расщеплять микроРНК определяет более высокую избирательность РНКаз по отношению к опухолевым клеткам. Общеизвестно, что микроРНК играют важную роль в патогенезе лейкозов, лимфом и ряда солидных опухолей путем контроля экспрессии генов-супрессоров опухолевого роста и онкогенов [24].

Еще одной возможной мишенью онконазы можно считать двухцепочечную dsРНК-зависимую протеинкиназу R, которая фосфорилирует IκB и таким образом активирует убиквитин-опосредованную транскрипцию NF-κB [25]. Среди ряда генов, активируемых NF-κB, присутствуют гены «выживания», регулирующие клеточный цикл и защищающие клетки от апоптоза. Показано, что при остановке клеточного цикла в клетках лейкоза Jurkat под действием ранпирназы активность NF-κB подавляется [14].

В 1990 г. была установлена противоопухолевая активность ранпирназы *in vivo* на ксенографтах рака поджелудочной железы человека ASPC-1 и немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) А549 у бестимусных (*nude*) мышей [26, 27]. На ксенографтах рака толстой кишки человека показано потенцирующее действие комбинации винкристин + ранпирназа [28]. Среди моделей опухолей системы крови к ранпирназе оказались чувствительными клетки промиелоцитарного лейкоза HL-60, гистиоцитарной лимфомы U937 и множественной миеломы RPMI-8228 [29]. Показана высокая чувствительность к ранпирназе *in vitro* и *in vivo* моделей хронического лимфолейкоза и В-клеточных лимфом. Клетки острого лимфобластного лейкоза или множественной миеломы оказались менее чувствительными [30]. В культуре клеток диффузной В-крупноклеточной лимфомы Toledo показано, что добавление ранпирназы к сочетанию ритуксимаба, мафосфамида, винкристина, доксорубина и дексаметазона вызывает более выраженную цитотоксичность, чем стандартная комбинация R-СНОР [31].

В 2002 г. были опубликованы результаты II фазы клинического изучения ранпирназы у 105 пациентов с мезотелиомой плевры, практически нечувствительной к химиотерапии. У 77 % пациентов был зарегистрирован объективный эффект, прогностически значимый для выживаемости. В III фазе испытания показано, что комбинация доксорубин + ранпирназа превосходит результаты монохимиотерапии каждым из препаратов в отдельности [32]. Положительные эффекты были отмечены также при раке молочной железы, почки и НМРЛ [33, 34]. Применение ранпирназы при солидных новообразованиях не сопровождается гематологической, кардио- или гепатотоксичностью, а также мукозитами. Наиболее частым побочным действием ранпирназы является нефротоксичность, которая выражается обратимой

протеинурией с азотемией или без таковой, периферическими отеками [33, 35].

АМФИНАЗА

Амфиназа выделена из ооцитов *Rana pipiens* исследователями ранпирназы, гомологична последней на 38,2–40,0 % (в зависимости от подтипа). Как и ранпирназа, амфиназа обладает относительно невысокой РНКазной активностью, не ингибируется рекомбинантным ингибитором РНКаз человека RI и обладает идентичным механизмом действия как на молекулярном уровне, так и на уровне регуляции клеточного цикла. Однако амфиназа существенно отличается от ранпирназы по каталитической эффективности, субстратной специфичности и профилю гликозилирования [36].

Антипролиферативная активность показана на культурах клеток HL-60, Jurkat и U-937, причем по сравнению с ранпирназой при эквивалентных концентрациях амфиназа оказалась более активной [37]. Показана высокая чувствительность к амфиназе моделей хронического лимфолейкоза и В-клеточных лимфом *in vitro* и *in vivo*. Клетки острого лимфобластного лейкоза или множественной миеломы оказались менее чувствительными [30].

На культурах клеток HL-60, U-937 и Jurkat антипролиферативный эффект различных изоформ амфиназы проявляется остановкой клеточного цикла в фазе G1, а также уменьшением количества клеток в фазах S и G2 [37]. Цитотоксический эффект амфиназы проявляется классическими признаками апоптоза, включая морфологические показатели уменьшения размера клеток, конденсации хроматина и фрагментации ядра, а также активацию каспаз, сериновых протеаз и тканевой трансглутаминазы.

Следует отметить, что для реализации эффекта амфиназы *in vitro* важно наличие РНКазной активности. Ферментативно неактивная алкилированная форма амфиназы, обладающая аналогичной конформационной структурой, цитотоксическим эффектом не характеризуется [37]. Помимо внутриклеточной РНК возможной мишенью амфиназы являются микроРНК, ответственные за экспрессию генов путем РНК-интерференции [22].

БИНАЗА

Биназа — секретлируемая *Bacillus intermedius* микробная РНКаз, принадлежит к семейству РНКаз N1/T1 и обладает эндонуклеазной активностью в отношении гидролиза РНК и динуклеозидфосфатов. По механизму действия и структуре биназа принципиально отличается от РНКаз А и относится к гуанин-специфичным РНКазам. Гуанинсвязывающий сайт биназы, идентифицированный методом кристаллографии, включает Lys26, Glu72, Arg82, Arg86 и His101, при этом за непосредственное связывание с субстратом отвечают Glu72 и His101 [38]. Существенная часть экспериментальных данных о структурных особенностях, ферментативной активности и антипролиферативном эффекте биназы была получена в России под руководством А.А. Макарова и О.Н. Ильинской и описана в ряде обзорных работ [39–41].

Биназа оказывает цитотоксическое действие на фибробласты, трансформированные онкогенами *ras*, *fms*, *src*, *AML* и *AML/ETO*, что позволяет предполагать

участие этих онкогенов в реализации ее противоопухолевой активности [7, 42]. Экспрессия онкогенов *KIT* и *AML1-ETO* также может служить возможным маркером прогноза чувствительности клеток опухолей системы крови к биназе [43].

В культуре клеток острого миелобластного лейкоза Kasumi-1 также продемонстрирован выраженный цитотоксический эффект биназы, сопровождающийся усилением экспрессии целого ряда проапоптотических генов [44]. Установлено, что биназа оказывает избирательное цитотоксическое действие на kit-трансформированные предшественники миелоидных клеток, при этом в цитозоле апоптотических клеток наблюдали дозозависимое уменьшение содержания ионов Ca^{2+} [45]. Как и в случае с РНКазой А, снижение ферментативной активности приводит к потере противоопухолевого эффекта биназы. С использованием мутантных РНКаз показано, что снижение уровня каталитической активности до 2,5 % от активности фермента дикого типа приводит к потере апоптогенных свойств [46].

В культурах клеток эритромиелолейкоза K562 и рака легкого A549 установлена избирательная индукция апоптоза под действием биназы. В клетках, обработанных биназой, зафиксировано появление ранних маркеров апоптоза — низкомолекулярных олигонуклеосомных фрагментов ДНК размером менее 50 т.п.н. Антипролиферативное и апоптогенное действие биназы на лимфоциты крови здоровых доноров в терапевтических концентрациях отсутствует [46].

Для подтверждения противоопухолевого эффекта биназы *in vivo* в наших исследованиях использовалась модель меланомы мышей В16, а также подкожные ксенографты опухолей человека [47] на мышах Balb/c nude [48] — меланома MeWo и рак легкого РЛ4 (А549). Биназу в изотоническом растворе натрия хлорида (концентрация 0,5–4,0 мкг/мл) вводили в/в 5-кратно 1 раз в сутки с интервалом 48 ч во 2, 4, 6, 8 и 10-й дни после трансплантации опухолей. Разовые дозы составили 5, 10 и 50 мкг/кг, суммарные — 25, 50 и 250 мкг/кг соответственно. Контрольным препаратом служила РНКазы А, которую вводили в/в по аналогичной схеме. О противоопухолевом эффекте судили по стандартному показателю торможения роста опухоли (ТРО) в процентах и увеличению продолжительности жизни мышей (УПЖ) по отношению к контролю без лечения, минимальный критерий $ТРО \leq 50\%$ [49].

Показано, что РНКазы А на 10-й и 18-й дни роста меланомы В16 при средних объемах опухолей без лечения 1644 и 6857 мм³ практически неэффективна, ТРОтах 22–29 % ($p > 0,05$). Биназа же в минимальной разовой дозе 5 мкг/кг (суммарно 25 мкг/кг) дала значимое и достоверное кратковременное ТРО 62 % ($p < 0,05$) только сразу после окончания лечения, т. е. на 10-й день роста меланомы без значимого УПЖ (табл. 1).

Переносимость всех видов терапии РНКазой и биназой в использованных схемах была удовлетворительной. Состояние и поведение мышей — без особенностей, гибели от токсичности не отмечали, масса селезенки статистически значимо не отличалась от контрольной группы.

Сравнительная оценка эффективности биназы и РНКазы А проведена на подкожных ксенографтах меланомы человека MeWo и НМРЛ человека РЛ4 (из линии клеток А549) у мышей Balb/c nude. Лечение начинали через 48 ч после трансплантации опухоли, биназу вводили

Таблица 1. Сравнительная эффективность биназы и РНКазы А на модели мышинной меланомы В16 ($n = 10$)

Группа	Доза, мкг/кг		ТРО, %			УПЖ, %
	Разовая	Суммарная*	День после окончания лечения			
			1-й	4-й	8-й	
РНКаза А	5	25	19	22	20	11
	10	50	24	16	29	0
	50	250	24	10	8	7
Биназа	5	25	62**	33	13	1
	10	50	23	28	15	0
	50	250	20	17	7	9

ТРО — торможение роста опухоли; УПЖ — увеличение продолжительности жизни.

* Внутривенно во 2, 4, 6, 8 и 10-й дни после трансплантации опухоли; в группе контроля соответственно срокам измерения $V_{ср} = 1644 \text{ мм}^3$, $V_{ср} = 2835 \text{ мм}^3$ и $V_{ср} = 6857 \text{ мм}^3$.

** $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

в эффективном для меланомы В16 режиме: 5-кратно в разовой дозе 5 мкг/кг (суммарно 25 мкг/кг) с интервалом 48 ч. РНКазы А вводили в аналогичном временном и дозовом режимах. Результаты показали, что обе РНКазы не вызывают значимого эффекта на MeWo до конца наблюдения (21-й день), ТРОтах 20 % для биназы и 22 % для РНКазы А. На РЛ4 биназа дала кратковременное статистически незначимое ТРО 54 % ($p > 0,05$), в то время как РНКазы А была практически неактивна (ТРО 33 %). Переносимость терапии была удовлетворительной, гибели мышей от токсичности не наблюдали.

Таким образом, пилотные эксперименты на мышах с подкожными ксенографтами опухолей человека показали результаты ниже или на уровне минимального критерия эффективности. Биназа, продемонстрировавшая некоторую активность, была отобрана для продолжения изучения в качестве потенциального модификатора биологических реакций при цитотоксической химиотерапии.

БАРНАЗА

Барназа, выделенная из *Bacillus amyloliquefaciens*, относится к РНКазам бактериального происхождения. По своим физико-химическим характеристикам и особенностям механизма действия барназа аналогична биназе. Принципиальным отличием барназы является высокое сродство к внутриклеточному ингибитору барстару [50]. Способность барназы формировать высокоаффинный комплекс с барстаром является классическим примером белок-белкового взаимодействия с очень высоким сродством субстратов [51, 52]. Это позволяет использовать барназу или барстар в качестве метки (или вектора) для конъюгации с другими белками и пептидами по типу «молекулярного конструктора» для достижения разных целей, а также облегчения очистки фермента [53].

Показано, что барназа способна ингибировать клеточную пролиферацию при ряде лейкозов и солидных опухолей человека [4]. Из клеточных линий опухолей системы крови к терапии барназой оказались чувствительными U-937, HL-60, K562.

ПРОЧИЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ

Практически все РНКазы с доказанным противоопухолевым эффектом, изучаемые в последние годы, были вы-

делены из двух типов источников: ооцитов или гамет земноводных (РНКазы А), а также бактерий (РНКазы N1/T1). Охарактеризованные и известные ранее панкреатические РНКазы в настоящее время используются главным образом как препараты сравнения. В качестве перспективных противоопухолевых агентов эти ферменты не рассматриваются. Среди РНКаза А земноводных помимо ранпирназы и амфиназы цитотоксическая активность обнаружена у РНКаза, выделенных из ооцитов лягушек *Rana japonica* и *Rana catesbeiana* [54, 55]. В редких работах описана цитотоксичность РНКаза из других источников, в частности, показана цитотоксичность РНКаза гриба *Hohenbuehelia serotina* в культурах клеток мышинных лимфолейкоза L1210 и лимфомы MBL2 [56].

В последние годы возрос интерес к лектинам, обладающим РНКазной и противоопухолевой активностью. В одной из обзорных работ Т. Tatsuta и соавт. [57] приведены сведения о лектине из ооцитов *R. catesbeiana*, связывающем сиаловую кислоту (SBL, sialic acid-binding lectin). Подробно описаны РНКазная активность SBL и антипролиферативный эффект *in vivo* и *in vitro* на моделях мышинных лимфолейкозов P388, L1210 и на широкой панели лейкозов человека [58, 59].

ХИМЕРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ НА ОСНОВЕ РИБОНУКЛЕАЗ

Одним из наиболее актуальных направлений разработки противоопухолевых препаратов на основе РНКаза является конъюгация их с другими биологически активными молекулами (белками, пептидами или даже наночастицами) с целью повысить избирательность действия на опухолевые клетки. Чаще всего используются антитела или их фрагменты. Рациональность этого подхода определяется тем, что противоопухолевый эффект РНКаза реализуется после проникновения внутрь клетки [60].

Опубликованы результаты изучения *in vitro* и *in vivo* конъюгата ранпирназы с иммунотоксином 2L-RaphLL1-γ4P, состоящим из двух молекул ранпирназы, конъюгированных с N-концом легкой цепи hLL1, антитела к CD74. Применение конъюгата у мышей с подкожными ксенографтами лимфомы Беркитта CD74⁺, Raji и Daudi продемонстрировало возможность получения полной ремиссии у большинства животных [61].

Другим успешным примером конъюгирования РНКаза с антителами может служить конъюгат ранпирназы с антителами к CD22, нацеленный на терапию неходжкинских лимфом [62]. По сравнению с ранпирназой полученный химерный белок оказался более цитотоксичным *in vitro* на моделях неходжкинских лимфом (IC₅₀ на 4 порядка меньше). Он увеличивает *in vivo* жизнь мышей с в/в трансплантированной лимфомой Daudi (моделирование генерализации процесса) на 135 % [63]. При этом данный белок был менее токсичным для мышей, т. е. проявлял большую избирательность действия.

Результативность конъюгирования с антителами против белков, гиперэкспрессирующихся на поверхности опухолевых клеток, оценена на примере конъюгата 4D5 scFv-дибарназы — иммуноРНКаза, состоящей из мини-антител (антигенсвязывающих одноцепочечных переменных фрагментов антител, scFv) и РНКаза *Bacillus amyloliquefaciens* — барназы. Методами генной инженерии были получены рекомбинантные мини-антитела к антигену HER2/неу, который относится к

наиболее специфичным маркерам злокачественных опухолей, прежде всего рака молочной железы и яичников [64, 65]. Были созданы анти-HER2/неу-мини-антитела (4D5 scFv), слитые с двумя молекулами барназы. Доказано, что созданный химерный белок способен проникать внутрь клеток, экспрессирующих HER2/неу, показана его цитотоксическая активность [60, 66, 67]. Попадая внутрь клетки в составе химерного белка анти-HER2/неу-мини-антитело-дибарназа (4D5 scFv-дибарназа), барназа реализует антипролиферативное действие как РНКаза [60].

Цитотоксический эффект scFv 4D5-дибарназы в отношении HER2-позитивных клеток рака яичников человека SKOV-3 оказался в 1000 раз выше, чем эффект барназы [4]. Мини-антитела не только обеспечивают избирательное связывание иммуноРНКаза с поверхностью опухолевой клетки, но и облегчают ее проникновение внутрь клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза [68].

Выявление вклада РНКазной активности в противоопухолевый эффект *in vivo* химерной молекулы-конъюгата 4D5 scFv с двумя молекулами барназы (4D5 scFv-дибарназа) проведено в сравнении с мини-антителами (4D5 scFv) и смесью барназы и 4D5 scFv. В опытах использованы подкожные ксенографты рака молочной железы человека SKBR-3 HER2⁺ у мышей-самок Balb/c nude. Опухоль имплантировали по 6×10^6 или $1,5 \times 10^6$ клеток. Агенты вводили парентерально в диапазоне разовых доз от 0,25 до 1 мг/кг многократно, 10–13-кратно с интервалом 24–72 ч. Лечение начинали на следующий день после имплантации опухоли.

В результате показано, что неконъюгированные антитела 4D5 scFv и простая смесь 4D5 scFv и барназы во всем диапазоне примененных доз малоактивны (ТРО 41 и 13 % соответственно). Конъюгат 4D5 scFv-дибарназа, примененный против опухоли, полученной трансплантацией 6×10^6 клеток, тоже был малоактивен (ТРО 35 %).

При уменьшении размеров опухолевого узла в 4 раза к началу лечения и снижении суммарной дозы конъюгата в 2–2,5 раза замедление темпов роста опухоли через 5 дней после окончания лечения (23-й день опыта) достигло значимой величины — ТРО 62–67 % ($p < 0,05$). Полученный эффект оказался дозозависимым, т. к. уменьшение разовой дозы и длительности курса с двукратным уменьшением суммарной дозы привело к почти двукратному снижению ниже порогового уровня ТРО 45 % (табл. 2).

Таблица 2. Сравнительная эффективность иммуноРНКаза (конъюгат 4D5 scFv-дибарназы) на ксенографтах рака молочной железы человека SKBR-3 HER2⁺ после подкожной трансплантации $1,5 \times 10^6$ клеток

Группа	ТРО, %				
	Доза, мкг/кг		День после трансплантации опухоли		
	Разовая	Суммарная	14-й	28-й	37-й
Конъюгат 4D5 scFv-дибарназы (n = 10)	0,7	7,0**	71	38*	33*
	0,25	2,25***	45	36	Измерение не проводили

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

** Внутривенно в 5, 7, 9, 10, 12, 14, 16, 19, 21 и 23-й дни после трансплантации опухоли.

*** Внутривенно в 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 и 17-й дни после трансплантации опухоли.

Переносимость всех видов лечения была удовлетворительной, побочных эффектов или гибели животных от токсичности не наблюдали. Изучение токсичности на здоровых мышах-самках BDF₁ показало, что при однократном в/в введении в дозе 7 мг/кг (10-кратная разовая терапевтическая доза) 4D5 scFv-дибарназа нетоксична и не влияет на физиологические, биологические и биохимические показатели.

Полученные нами результаты свидетельствуют о перспективности создания химерных молекул-конъюгатов с РНКазной активностью. Они согласуются с данными, полученными с иммунотоксином, включающим панкреатическую РНКазу А [69, 70].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ биохимических свойств и основных фармакологических эффектов демонстрирует ряд особенностей РНКаз с антипролиферативной активностью [71, 72]. В отличие от других ферментов с противоопухолевой активностью, в частности разрушающих аминокислоты, механизм действия РНКаз предполагает наличие внутриклеточных мишеней и, соответственно, требует проникновения фермента через клеточную мембрану. Общими свойствами для РНКаз с доказанным противоопухолевым эффектом являются:

- нечувствительность к действию ингибитора РНКаз клеток млекопитающих RI;
- наличие выраженного положительного заряда молекулы (pI > 9,0);
- высокая конформационная стабильность.

Очевидно, что противоопухолевый эффект РНКаз напрямую связан с их ферментативной активностью. Так, на примере биназы и ранпирназы с использованием точечных замен показано, что снижение ферментативной активности приводит к потере биназой противоопухолевых и апоптогенных свойств. Выявленная нами более высокая активность конъюгата 4D5 scFv-дибарназы по сравнению с мини-антителами 4D5 scFv и простой смесью белков также свидетельствует о наличии существенного вклада ферментативной активности в реализацию противоопухолевого эффекта. В зависимости от особенностей генетического аппарата опухолевых клеток антипролиферативное действие РНКаз может быть связано с разрушением рРНК, тРНК или микроРНК [18–21]. Следовательно, чувствительность опухолевых клеток к РНКазам существенно варьирует в зависимости от содержания конкретной РНК, а также ее значения для выживания клетки.

Механизмы проникновения РНКаз внутрь клетки остаются не до конца выясненными. Потенциальными акцепторами РНКаз на клеточной поверхности могут быть кислые липиды и гликопротеиды, содержащие гепарансульфат протеогликаны, актин и ассоциированные с РНК белки. Клеточные мембраны нормальных и злокачественных клеток отличаются по составу этих компонентов, что во многом определяет избирательность действия РНКаз и может быть научной основой для поиска специфических мишеней и маркеров предполагаемой чувствительности клеток опухолей системы крови к РНКазам.

Известные к настоящему времени ключевые звенья регуляции клеточного цикла — мишени для РНКаз,

включают NF-κB-зависимый сигнальный путь, различные каспазы и онкогены. Чувствительность клеток к действию РНКаз связана с экспрессией онкогенов *ras*, *KIT*, *AML1-ETO*, определение которых будет полезным для прогнозирования ответа на лечение с использованием РНКаз. Повышенная экспрессия как *KIT*, так и *AML1-ETO* характерна для острого миелобластного лейкоза [73, 74].

Принципиально важной особенностью активных в отношении опухолевых клеток РНКаз является наличие резко положительного заряда молекулы. Учитывая тот факт, что подавляющее большинство клеток опухолей системы крови имеет на поверхности выраженный отрицательный заряд, цитотоксические эффекты РНКаз определяются не только расщеплением доступной РНК и действием продуктов ее гидролиза, но и некаталитическим электростатическим взаимодействием с компонентами клетки [41].

Следует отметить также способность РНКаз повышать чувствительность опухолевых клеток к цитотоксическим агентам с другим механизмом действия [28, 31]. Эта способность открывает возможность рассматривать их в качестве модификаторов биологических реакций, повышающих эффективность стандартной лекарственной терапии злокачественных опухолей. Для РНКаз с антипролиферативными свойствами целесообразен поиск комбинаций с различными цитостатическими агентами под контролем эффективности и переносимости лечения.

Данные литературы и результаты наших опытов по эффективности конъюгатов с антителами к специфическим рецепторам на поверхности опухолевых клеток позволяют считать их перспективными для таргетной терапии опухолей с гиперэкспрессией соответствующих антигенов. Кроме того, несомненным является и то, что необходимость поиска и изучения новых препаратов РНКаз во многом определяется разработкой соответствующих систем доставки. При этом для действующего вещества основным критерием результативности конъюгирования является незначительная потеря ферментативной активности, а для антител — иммунологической [32].

Несмотря на наличие массива экспериментальных данных, демонстрирующих эффективность РНКаз на моделях опухолей системы крови *in vitro* и *in vivo* и хорошую переносимость, перспективы их востребованности, в частности, в клинической онкогематологии пока остаются неочевидными. Однако приведенные в обзоре сведения позволяют заключить, что среди огромного разнообразия РНКаз существуют практически неисчерпаемые ресурсы в создании новых оригинальных РНКаз. Детализация механизмов цитотоксических эффектов РНКаз на злокачественных клетках послужит основой для поиска новых относительно безопасных средств направленной (таргетной) противоопухолевой терапии.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФ № 14-24-00106.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: В.С. Покровский, С.М. Деев.
Сбор и обработка данных: В.С. Покровский, Н.В. Андропова.
Предоставление материалов исследования: В.С. Покровский, Е.М. Трещалина.
Анализ и интерпретация данных: В.С. Покровский, Е.М. Трещалина.
Подготовка рукописи: В.С. Покровский.
Окончательное одобрение рукописи: Е.М. Трещалина, С.М. Деев.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Deutscher MP, Li Z. Exoribonucleases and their multiple roles in RNA metabolism. *Prog Nucl Acid Res Mol Biol.* 2001;66:67–105. doi: 10.1016/s0079-6603(00)66027-0.
- Зеленихин П.В., Мамедзаде К.Р., Ильинская О.Н. Цитофлуориметрическая характеристика влияния РНКаз на клетки про- и эукариот. *Гены и клетки.* 2012;3(7):62–5.
[Zelenikhin PV, Mamedzade KR, Ilinskaya ON. The cytofluorimetric characteristics of RNase influence towards pro- and eucariotic cells. *Geny i kletki.* 2012;3(7):62–5. (In Russ)]
- Ledoux L. Action of ribonuclease on two solid tumours in vivo. *Nature.* 1955;176(4470):36–7. doi: 10.1038/176036a0.
- Edelweiss E, Balandin TG, Ivanova JL, et al. Barnase as a new therapeutic agent triggering apoptosis in human cancer cells. *PLoS ONE.* 2008;3(6):e2434. doi: 10.1371/journal.pone.0002434.
- Глинка Е.М., Эдельвейс Э.Ф., Деев С.М. Эукариотические экспрессирующие векторы и иммуноконъюгаты для терапии рака. *Биохимия.* 2006;71:597–60.
[Glinka EM, Edelweis EF, Deev SM. Eukaryotic expressing vectors and immunoconjugates for treatment of cancer. *Biokhimiya.* 2006;71:597–60. (In Russ)]
- Deyev SM, Lebedenko EN, Petrovskaya LE, et al. Man-made antibodies and immunoconjugates with desired properties: function optimization using structure engineering. *Russ Chem Rev.* 2015;84(1):1–26. doi: 10.1070/RCR4459.
- Mitkevich VA, Tchurikov NA, Zelenikhin PV, 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.
- Кабрера Фуентес Э.А., Зеленихин П.В., Колпаков А.И. и др. Сравнительная цитотоксичность биназы по отношению к опухолевым и нормальным клеткам. Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. 2010;152(3):143–8.
[Caberra Fuentes HA, Zelenikhin PV, Kolpakov AI, et al. Comparative Toxicity of Binase towards Tumor and Normal Cells. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya: Estestvennyye nauki.* 2010;152(3):143–8. (In Russ)]
- Darzynkiewicz Z, Carter SP, Mikulski SM, et al. Cytostatic and cytotoxic effects of Pannon (P-30 Protein), a novel anticancer agent. *Cell Tissue Kinet.* 1988;21(3):169–82. doi: 10.1111/j.1365-2184.1988.tb00855.x.
- Ardelt W, Mikulski SM, Shogen K. Amino acid sequence of an anti-tumor protein from *Rana pipiens* oocytes and early embryos. Homology to pancreatic ribonucleases. *Biol Chem.* 1991;266(1):245–51.
- Raines RT. Active site of ribonuclease A. In: Zenkova MA, ed. *Artificial Nucleases.* Heidelberg: Springer Verlag; 2004. pp. 19–32.
- Juan G, Ardelt B, Mikulski SM, et al. G1 arrest of U-937 cells by onconase is associated with suppression of cyclin D3 expression, induction of p16INK4A, p21WAF1/CIP1 and p27KIP and decreased pRb phosphorylation. *Leukemia.* 1998;12(8):1241–8. doi: 10.1038/sj.leu.2401100.
- Deptala A, Halicka HD, Ardelt B, et al. Potentiation of tumor necrosis factor induced apoptosis by onconase. *Int J Oncol.* 1998;13(1):11–6. doi: 10.3892/ijo.13.1.11.
- Tsai SY, Ardelt B, Hsieh TC, et al. Treatment of Jurkat acute T-lymphocytic leukemia cells by onconase (Ranpirnase) is accompanied by an altered nucleocytoplasmic distribution and reduced expression of transcription factor NF-kappaB. *Int J Oncol.* 2004;25(6):1745–52. doi: 10.3892/ijo.25.6.1745.
- Rodriguez M, Torrent G, Bosch M, et al. Intracellular pathway of Onconase that enables its delivery to the cytosol. *J Cell Sci.* 2007;120(8):1405–11. doi: 10.1242/jcs.03427.
- Marquez M, Nilsson S, Lennartsson L, et al. Charge dependent targeting: Results in six tumor cell lines. *Anticancer Res.* 2004;24:1347–51.
- Leland PA, Raines RT. Cancer chemotherapy: ribonucleases to the rescue. *Chem Biol.* 2001;8(5):405–13. doi: 10.1016/s1074-5521(01)00030-8.
- Wu Y, Mikulski SM, Ardelt W, et al. A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity. *J Biol Chem.* 1993;268(14):10686–93.
- Saxena SK, Sirdeshmukh R, Ardelt W, et al. Entry into cells and selective degradation of tRNAs by a cytotoxic member of the RNase A family. *J Biol Chem.* 2002;277(17):15142–6. doi: 10.1074/jbc.m10811520020.
- Suhasini AN, Sirdeshmukh R. Transfer RNA cleavages by onconase reveal unusual cleavage sites. *J Biol Chem.* 2006;281(18):12201–9. doi: 10.1074/jbc.m504488200.
- Gong J, Li X, Darzynkiewicz Z. Different patterns of apoptosis of HL-60 cells induced by cycloheximide and camptothecin. *J Cell Physiol.* 1993;157(2):263–70. doi: 10.1002/jcp.1041570208.
- Ardelt B, Ardelt W, Darzynkiewicz Z. Cytotoxic ribonucleases and RNA interference (RNAi). *Cell Cycle.* 2003;2(1):22–4. doi: 10.4161/cc.2.1.232.
- Zhao H, Ardelt B, Ardelt W, et al. The cytotoxic ribonuclease Onconase targets RNA interference (siRNA). *Cell Cycle.* 2008;7(20):3258–61. doi: 10.4161/cc.7.20.6855.
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNAs expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(7):2257–61. doi: 10.1073/pnas.0510565103.
- Basseres DS, Baldwin AS. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene.* 2006;30(25):6817–30. doi: 10.1038/sj.onc.1209942.
- Lee I, Kalota A, Gewirtz AM, Shogen K. Antitumor efficacy of the cytotoxic RNase, ranpirnase, on A549 human lung cancer xenografts of nude mice. *Anticancer Res.* 2007;27(1A):299–307.
- Lee I, Lee YH, Mikulski SM, Shogen K. Effect of onconase +/- tamoxifen on ASPC-1 human pancreatic tumors in nude mice. *Adv Exp Med Biol.* 2003;530:187–96. doi: 10.1007/978-1-4615-0075-9_18
- Rybak SM, Pearson JW, Fogler WE, et al. Enhancement of vincristine cytotoxicity in drug-resistant cells by simultaneous treatment with onconase, an antitumor ribonuclease. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(11):747–53. doi: 10.1093/jnci/88.11.747.
- Ita M, Halicka HD, Tanaka T, et al. Remarkable enhancement of cytotoxicity of onconase and cepharanthine when used in combination on various tumor cell lines. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(7):1104–8. doi: 10.4161/cbt.7.7.6172.
- Smolewski P, Witkowska M, Zwolinska M, et al. Cytotoxic activity of the amphibian ribonucleases onconase and r-amphinase on tumor cells from B cell lymphoproliferative disorders. *Int J Oncol.* 2014;45(1):419–25. doi: 10.3892/ijo.2014.2405.
- Majchrzak A, Witkowska M, Medra A, et al. In vitro cytotoxicity of ranpirnase (onconase) in combination with components of R-CHOP regimen against diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) cell line. *Postepy Hig Med Dosw.* 2013;67:1166–72. doi: 10.5604/17322693.107838632.
- Porta C, Paglino C, Mutti L. Ranpirnase and its potential for the treatment of unresectable malignant mesothelioma. *Biologics.* 2008;2(4):601–9. doi: 10.2147/btt.s2383.
- Costanzi J, Sidransky D, Navon A, et al. Ribonucleases as a novel pro-apoptotic anticancer strategy: review of the preclinical and clinical data for ranpirnase. *Cancer Invest.* 2005;23(7):643–50. doi: 10.1080/07357900500283143.
- Mikulski SM, Costanzi JJ, Vogelzang NJ, et al. Phase II trial of a single weekly intravenous dose of ranpirnase in patients with unresectable malignant mesothelioma. *J Clin Oncol.* 2002;20(1):274–81. doi: 10.1200/jco.20.1.274.
- Vasandani VM, Burris JA, Sung C. Reversible nephrotoxicity of onconase and effect of lysine pH on renal onconase uptake. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999;44(2):164–9. doi: 10.1007/s002800050962.
- Singh UP, Ardelt W, Saxena SK, et al. Enzymatic and Structural Characterization of Amphinase, a Novel Cytotoxic Ribonuclease from *Rana pipiens* Oocytes. *J Mol Biol.* 2007;371(1):93–111. doi: 10.1016/j.jmb.2007.04.071.
- Ardelt B, Ardelt W, Pozarowski P, et al. Cytostatic and cytotoxic properties of Amphinase: a novel cytotoxic ribonuclease from *Rana pipiens* oocytes. *Cell Cycle.* 2007;6(24):3097–102. doi: 10.4161/cc.6.24.5045.
- Sevcik J, Sanishili RG, Pavlovsky AG, Polyakov KM. Comparison of active sites of some microbial ribonucleases: structural basis for guanylic specificity. *Trends Biochem Sci.* 1990;15(4):158–62. doi: 10.1016/0968-0004(90)90217-y.
- Makarov AA, Ilinskaya ON. Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets. *FEBS Lett.* 2003;540(1–3):15–20. doi: 10.1016/s0014-5793(03)00225-4.
- Makarov AA, Kolchinski A, Ilinskaya ON. Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents. *BioEssays.* 2008;30(8):789–90. doi: 10.1002/bies.20789.
- Ильинская О.Н., Макаров А.А. Почему рибонуклеазы вызывают гибель раковых клеток. Молекулярная биология. 2005;39(1):3–13.
[Ilinskaya ON, Makarov AA. Why ribonucleases cause tumor cell death. *Molekulyarnaya biologiya.* 2005;39(1):3–13. (In Russ)]
- Ильинская О.Н., Зеленихин П.В., Колпаков А.И. и др. Избирательная цитотоксичность биназы в отношении фибробластов, экспрессирующих онкогены ras и AML/ETO. Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. 2008;150(4):268–73.
[Ilinskaya ON, Zelenikhin PV, Kolpakov AI, et al. Selective Cytotoxicity of Binase towards Fibroblasts with Expression of the ras- and AML/ETO Oncogenes. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya: Estestvennyye nauki.* 2008;150(4):268–73. (In Russ)]
- Mitkevich VA, Petrushanko IY, Spirin PV, et al. Sensitivity of acute myeloid leukemia Kasumi-1 cells to binase toxic action depends on the expression of KIT and AML1-ETO oncogenes. *Cell Cycle.* 2011;10(23):4090–7. doi: 10.4161/cc.10.23.18210.
- Mitkevich VA, Kretova OV, Petrushanko IY, 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.

45. Петрушанко И.Ю., Зеленихин П.В., Митькевич В.А. и др. Биназа обладает избирательным цитотоксическим действием на kit-трансформированные предшественники миелоидных клеток. *Биофизика*. 2007;52(5):876–81.
[Petrushanko IYu, Zelenikhin PV, Mit'kevich VA, et al. Binasin produces selective cytotoxic effect on kit-transformed myeloid cell precursors. *Biofizika*. 2007;52(5):876–81. (In Russ)]
46. Зеленихин П.В., Колпаков А.И., Черепнев Г.В., Ильинская О.Н. Индукция апоптоза опухолевых клеток биназой. *Молекулярная биология*. 2005;39(3):457–63.
[Zelenikhin PV, Kolpakov AI, Cherepnev GV, Il'inskaya ON. Induction of tumor cell apoptosis by binasin. *Molekulyarnaya biologiya*. 2005;39(3):457–63. (In Russ)]
47. Трещалина Е.М. Коллекция опухолевых штаммов человека. М.: Практическая медицина, 2009. 70 с.
[Treshchalina EM. Kolleksiya opukholevykh shtammov cheloveka. (Collection of human tumor strains.) Moscow: Prakticheskaya Meditsina Publ.; 2009. 70 p. (In Russ)]
48. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши разведения РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Возможности использования. М.: Издательская группа РОИЦ, 2010. 16 с.
[Treshchalina EM. Immunodefitsitnyye myshi razvedeniya RONTs im. N.N. Blokhina RAMN. Vozmozhnosti ispol'zovaniya. (Mice with immune deficiency bred in NN Blokhin Russian Cancer Research Center. Opportunities for use.) Moscow: Izdatel'skaya gruppa RONTs Publ.; 2010. 16 p. (In Russ)]
49. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. С. 642–57.
[Treshchalina EM, Zhukova OS, Gerasimova GK, et al. Guidelines for pre-clinical studies of antitumor activity of drugs. In: *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv*. (Guidelines for pre-clinical studies of medicinal agents.) Part 1. Moscow: Grif i K Publ.; 2012. pp. 642–57. (In Russ)]
50. Ulyanova V, Vershinina V, Ilinskaya O. Barnase and binase: twins with distinct fates. *FEBS J*. 2011;8(19):3633–43. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08294.x.
51. Hoefling M, Gottschalk KE. Barnase–barstar: from first encounter to final complex. *J Struct Biol*. 2010;171(1):52–63. doi: 10.1016/j.jsb.2010.03.001.
52. Deyev SM, Yazynin SA, Kuznetsov DA, et al. Ribonuclease-charged vector for facile direct cloning with positive selection. *Mol Gen Genet*. 1998;259(4):379–82. doi: 10.1007/s004380050825.
53. Semenyuk EG, Stremovskiy OA, Edelweiss EF, et al. Expression of single-chain antibody–barstar fusion in plants. *Biochimie*. 2007;89(1):31–8. doi: 10.1016/j.biochi.2006.07.012.
54. Liao YD, Huang HC, Chan HJ, Kuo SJ. Large-scale preparation of a ribonuclease from *Rana catesbeiana* (bullfrog) oocytes and characterization of its specific cytotoxic activity against tumor cells. *Prot Express Purif*. 1996;7(2):194–202. doi: 10.1006/prep.1996.0027.
55. Tatsuta T, Sugawara S, Takahashi K, et al. Cancer-selective induction of apoptosis by lecyzime. *Front Oncol*. 2014;4:139. doi: 10.3389/fonc.2014.00139.
56. Zhang R, Zhao L, Wang H, Ng TB. A novel ribonuclease with antiproliferative activity toward leukemia and lymphoma cells and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom, *Hohenbuehelia serotina*. *Int J Mol Med*. 2014;33(1):209–14.
57. Tatsuta T, Sugawara S, Takahashi K, et al. Leczyme: A New Candidate Drug for Cancer Therapy. *BioMed Re Intern*. 2014. doi: 10.1155/2014/421415.
58. Nitta K, Ozaki K, Ishikawa M, et al. Inhibition of cell proliferation by *Rana catesbeiana* and *Rana japonica* lectins belonging to the ribonuclease superfamily. *Cancer Res*. 1994;54(4):920–7.
59. Tatsuta T, Hosono M, Sugawara S, et al. Sialic acid-binding lectin (lecyzime) induces caspase-dependent apoptosis-mediated mitochondrial perturbation in Jurkat cells. *Intern J Oncol*. 2013;43(5):1402–12. doi: 10.3892/ijo.2013.2092.
60. Glinka EM, Edelweiss EF, Sapozhnikov AM, Deyev SM. A new vector for controllable expression of an anti-HER2/neu mini-antibody–barnase fusion protein in HEK 293T cells. *Gene*. 2006;366(1):97–103. doi: 10.1016/j.gene.2005.06.042.
61. Chang CH, Sapra P, Vanama SS, et al. Effective therapy of human lymphoma xenografts with a novel recombinant ribonuclease/anti-CD74 humanized IgG4 antibody immunotoxin. *Blood*. 2005;106(13):4308–14. doi: 10.1182/blood-2005-03-1033.
62. Newton DL, Stockwin LH, Rybak SM. Anti-CD22 Onconase: preparation and characterization. *Meth Mol Biol*. 2009;525:425–43. doi: 10.1007/978-1-59745-554-1_22.
63. Newton DL, Hansen HJ, Mikulski SM, et al. Potent and specific antitumor effects of an anti-CD22-targeted cytotoxic ribonuclease: potential for the treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2001;97(2):528–35. doi: 10.1182/blood.v97.2.528.
64. Глинка Е.М., Эдельвейс Э.Ф., Деев С.М. Эукариотические экспрессирующие векторы и иммуноконъюгаты для терапии рака. *Биохимия*. 2006;71(6):742–53.
[Glinka EM, Edel'veis EF, Deev SM. Eukaryotic expressing vectors and immunocjugates for treatment of cancer. *Biokhimiya*. 2006;71(6):742–53. (In Russ)]
65. Deyev SM, Lebedenko EN. Modern technologies for creating synthetic antibodies for clinical application. *Acta Naturae*. 2009;1(1):32–50.
66. Эдельвейс Э.Ф. Иммунобарназные конъюгаты для диагностики и терапии рака: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2010. 24 с.
[Edel'veis EF. Immunobarnaznye kon'yugaty dlya diagnostiki i terapii raka. (Immunobarnase conjugates for diagnosis and treatment of cancer.) [dissertation] Moscow; 2010. 24 p. (In Russ)]
67. Эдельвейс Э.Ф., Баландин Т.Г., Стрёмовский О.А. и др. Иммуноконъюгат анти-EGFR-мини-антитело–барназа высокотоксичен для опухолевых клеток человека. *Доклады Академии наук*. 2010;434(4):558–61.
[Edel'veis EF, Balandin TG, Stremovskii OA, et al. Anti-anti-EGFR–barnase immunoconjugate is highly toxic for human tumor cells. *Doklady Akademii nauk*. 2010;434(4):558–61. (In Russ)]
68. Schirrmann T, Krauss J, Arndt MA, et al. Targeted therapeutic RNases (ImmunoRNases). *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9:79–95. doi: 10.1517/14712590802631862.
69. De Lorenzo C, Arciello A, Cozzolino R, et al. A fully human antitumor immunoRNase selective for ErbB-2-positive carcinomas. *Cancer Res*. 2004;64(14):4870–4. doi: 10.1158/0008-5472.can-03-3717.
70. De Lorenzo C, Tedesco A, Terrazzano G, et al. A human, compact, fully functional anti-ErbB2 antibody as a novel antitumor agent. *Br J Cancer*. 2004;91(6):1200–4. doi: 10.1038/sj.bjc.6602110.
71. Покровский В.С., Трещалина Е.М. Ферментальные препараты в онкогематологии: актуальные направления экспериментальных исследований и перспективы клинического применения. *Клиническая онкогематология*. 2014;7(1):28–39.
[Pokrovskii VS, Treshchalina EM. Enzymes in oncohaematology: relevant directions of experimental studies and prospects of clinical use. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2014;7(1):28–39. (In Russ)]
72. Покровский В.С., Лесная Н.А., Трещалина Е.М. и др. Перспективы разработки новых ферментных противоопухолевых препаратов. *Вопросы онкологии*. 2011;57(2):155–64.
[Pokrovskii VS, Lesnaya NA, Treshchalina EM, et al. Perspectives of development of novel enzymatic antitumor agents. *Voprosy onkologii*. 2011;57(2):155–64. (In Russ)]
73. Hatlen MA, Wang L, Nimer SD. AML1-ETO driven acute leukemia: insights into pathogenesis and potential therapeutic approaches. *Front Med*. 2012;6(3):248–62. doi: 10.1007/s11684-012-0206-6.
74. Ziai JM, Siddon AJ, et al. Pathology Consultation on Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2015;144(4):539–54. doi: 10.1309/AJCP77ZFPUGQGYWY.