

Bioactivación del quimioterapéutico ciclofosfamida mediada por citocromos P450 con fines de uso en terapia génica de cáncer**Bioactivation of the chemotherapeutic cyclophosphamide mediated by cytochrome P450 for use in cancer gene therapy**

<http://doi.org/10.53358/ideas.v7i1.1115>

Saskya E. Carrera-Pacheco, Johana Zúñiga-Miranda

Centro de Investigación Biomédica (CENBIO), Facultad de Ciencias de la Salud Eugenio Espejo,
Universidad UTE, C.P. 170527, Quito, Ecuador
saskyacarrera@gmail.com

Fecha de envío, mayo 22/2024 - Fecha de aceptación, agosto 6/2024 - Fecha de publicación, enero 30/2025

Resumen: Esta revisión examina el papel de las enzimas del citocromo P450 en la bioactivación del agente quimioterapéutico ciclofosfamida (CPA) para uso en la terapia génica del cáncer. El estudio explora enzimas específicas del citocromo P450, como CYP2B6, CYP2C9 y CYP3A4, encargadas de metabolizar la CPA en su forma activa, destacando su potencial en la terapia del gen suicida o GDEPT. La revisión también analiza las modificaciones genéticas realizadas para mejorar la eficiencia catalítica de estas enzimas y aborda los desafíos y las direcciones futuras de la integración de GDEPT con otras terapias contra el cáncer para mejorar la especificidad y eficacia del tratamiento.

Palabras Clave: GDEPT, Ciclofosfamida, Terapia Génica, Citocromos P450, Quimioterapia, Bioactivación, Modificación Genética.

Abstract: This review examines the role of cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of the chemotherapeutic agent cyclophosphamide (CPA) for use in cancer gene therapy. The study explores specific cytochrome P450 enzymes, such as CYP2B6, CYP2C9, and CYP3A4, responsible for metabolizing CPA into its active form, highlighting its potential in suicide gene therapy or GDEPT. The review also discusses genetic modifications made to improve the catalytic efficiency of these enzymes and addresses the challenges and future directions of integrating GDEPT with other cancer therapies to improve treatment specificity and efficacy.

Keywords: GDEPT, Cyclophosphamide, Gene Therapy, Cytochromes P450, Chemotherapy, Bioactivation, Genetic Modification.

Autor de correspondencia:

Saskya Carrera Pacheco, saskyacarrera@gmail.com



Introducción

El cáncer es uno de los problemas de salud más relevantes a nivel mundial y afecta a millones de personas de todas las edades y géneros. El cáncer se da como el resultado de interacciones entre factores genéticos propios y agentes externos, lo que causa alteraciones anormales en las células pudiendo llegar a la formación de tumores con el paso del tiempo [1]. A medida que la población global incrementa su expectativa de vida, también incrementa la incidencia de cáncer, lo que conlleva a un mayor reporte de muertes por esta causa al año. En el 2020, cerca de 10 millones de muertes fueron causadas por el cáncer a escala global, y se espera que llegue a los 16 millones para el 2040 [2]. Este problema también acarrea una gran afectación económica, por ejemplo, el gasto global en oncología incluyendo cuidados fue estimado en 206 billones de dólares americanos para el 2022; esto equivalió a un incremento de 147 billones de dólares en tan sólo diez años [2].

En consecuencia, es importante, a parte de la detección temprana, el desarrollo de terapias eficientes y dirigidas a combatir dicha enfermedad incluso en estadios tardíos y con costos accesibles, para ofrecer una oportunidad de recuperación a esta gran parte de la población. Sin embargo, cabe recalcar que independientemente del estadio del cáncer, los tratamientos son sumamente invasivos y afectan significativamente la calidad de vida de las personas afectadas. Todas estas variables deben considerarse en el desarrollo de una nueva alternativa de tratamiento.

Las formas más comunes de tratamiento en el caso de cáncer son 1) cirugía, 2) radioterapia, 3) terapia sistémica, siendo la cirugía la más invasiva mientras que las otras acarrearán efectos secundarios no deseados. Usualmente varios de estos tratamientos son combinados para incrementar la eficiencia anticáncer o prevenir la reaparición del tumor, lo que puede potenciar los daños colaterales [3]. En el caso de la cirugía esta es una opción en estadios tempranos del cáncer, cuando este aún no se ha diseminado. Por otro lado, la radioterapia, aunque ha avanzado mucho en los últimos años, causa problemas superficiales o inflamación en la zona donde se aplicó la radiación. En el caso de la terapia sistémica, esta abarca la terapia hormonal, la quimioterapia, la inmunoterapia y la terapia dirigida [4]. Todas estas tienen en común la administración de un medicamento con efecto terapéutico, y sus efectos secundarios varían considerablemente dependiendo del medicamento y el paciente [3]. Algo que considerar, es que uno de los agentes quimioterapéuticos más empleados en cáncer de mama, endometrio, varios linfomas y leucemia, es la ciclofosfamida (CPA), lo cual la convierte en un blanco importante para terapia génica del cáncer [5], [6], [7].

Los avances en la terapia génica del cáncer han revolucionado el panorama del tratamiento del cáncer [8], [9]. Un enfoque prometedor de la terapia génica contra el cáncer consiste en introducir genes que codifican enzimas metabolizadoras de profármacos contra el cáncer, como las enzimas del citocromo P450 (CYP), que ayudan a la eliminación de las células cancerosas [10], [11]. Este enfoque se denomina terapia del gen suicida o GDEPT por sus siglas en inglés (Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy) [12]. Cabe recalcar que, los citocromos P450 humanos, principalmente CYP2B6, CYP2C9 y CYP3A4, son responsables de la activación metabólica del profármaco CPA a su forma quimioterapéutica. Existen un número importante de sistemas GDEPT probados *in vivo* e *in vitro*, además varios de estos han llegado a etapas de ensayos preclínicos y clínicos lo cual resalta el avance de esta tecnología en los últimos años y su potencial a futuro.

En esta revisión abordaremos como el uso de enzimas del citocromo P450 específicas han sido empleadas para la activación del quimioterapéutico ciclofosfamida y las mejoras genéticas realizadas para potenciar el uso de esas enzimas en terapia génica del cáncer.

Finalmente, las limitaciones y perspectivas futuras serán también analizadas.

Mecanismos de Acción de la Ciclofosfamida

La ciclofosfamida como un agente alquilante de ADN y su uso en el tratamiento contra el cáncer

La ciclofosfamida (CPA) y su isómero estructural, la ifosfamida (IFA), son profármacos quimioterapéuticos, usados también como agentes inmunosupresores, que pertenece a la familia de las oxazafosforinas [13]. Son conocidos por su capacidad como agentes alquilantes del ADN. Actúan principalmente a través de su metabolito citotóxico, la mostaza de fosforamida, que se forma cuando la CPA o IFA son metabolizadas en el hígado por enzimas CYP [14]. Este metabolito interacciona con el ADN al formar enlaces covalentes con los grupos alquilo en las guaninas de las cadenas de ADN, lo que conduce a la formación de puentes entre las cadenas de ADN y, en última instancia, a la ruptura de la doble hélice del ADN. Esta acción interfiere con la replicación y la transcripción del ADN, lo que interrumpe el funcionamiento normal de las células cancerosas [15]. Dado su amplio uso y eficacia en el tratamiento de diversos cánceres, incluidos el de mama, endometrio y ciertos linfomas y leucemias, la ciclofosfamida es una piedra angular en la quimioterapia [13]. Sin embargo, dichos profármacos poseen un bajo índice terapéutico, es decir, las dosis terapéuticas pueden ocasionar toxicidad lo que puede provocar efectos secundarios significativos, como leucopenia, náusea y alopecia, y toxicidades en órganos específicos como los riñones y la vejiga, debido a su impacto en las células de división rápida no solo en el tumor, sino también en células del cuerpo [14], [16]. Además, el uso continuado de ciclofosfamida puede llevar al desarrollo de resistencia a la terapia, lo que complica aún más su uso a largo plazo en la terapia anticáncer [17]. Por lo tanto, es crucial mejorar y optimizar la activación de estos profármacos mediante enzimas CYP. Este enfoque podría permitir una reducción en las dosis administradas y, consecuentemente, disminuir los efectos secundarios adversos.

Relación entre la bioactivación y la eficacia terapéutica

La relación entre la bioactivación de la CPA y su eficacia terapéutica es crucial para el tratamiento del cáncer. Es indispensable que la CPA o IFA sean convertidas a su compuesto terapéutico mostaza de fosforamida [14]. Por tanto, la eficacia terapéutica de la ciclofosfamida depende significativamente de la eficiencia con la que estas enzimas catalizan su conversión. Factores genéticos que afectan la expresión o la actividad de estas enzimas pueden alterar los niveles de bioactivación, influenciando así la eficacia y seguridad del tratamiento. Por ejemplo, variaciones en los genes que codifican para las enzimas P450 pueden resultar en diferencias en la tasa de bioactivación entre pacientes, afectando tanto la efectividad del tratamiento como el perfil de toxicidad (ver mas adelante la sección: Los citocromos P450 y su papel en el metabolismo de fármacos) [19]. Además, esta relación destaca la importancia de ajustar las dosis de ciclofosfamida y monitorear cuidadosamente los efectos terapéuticos y adversos para optimizar los resultados en los pacientes tratados.

Función de los citocromos P450 en la bioactivación de la ciclofosfamida

Los citocromos P450 y su papel en el metabolismo de fármacos

Las enzimas CYP son cruciales para estudiar las interacciones entre fármacos debido a su promiscuidad de sustratos. Estas desempeñan un papel importante en la primera fase del metabolismo de los fármacos, donde participan en el 96% de las reacciones [23]. Los citocromos P450 de mamíferos son principalmente expresados en el hígado y en niveles bajos en otros tejidos o tumores [20]. Catalizan la incorporación de un átomo de oxígeno molecular en un sustrato, mientras que el otro es reducido a una molécula de agua (ver Fig. 1). Estas pueden catalizar una gran variedad de reacciones de oxidación, incluyendo hidroxilaciones, epoxidaciones, oxidaciones de heteroátomos, dealquilaciones de heteroátomos, transferencia de grupos oxidativos, corte de ésteres y deshidrogenaciones [14].

Además, los canales de acceso al ligando en estas enzimas pueden influir en la selectividad del sustrato. Ciertos residuos dentro de estos canales determinan la afinidad de las enzimas por tipos específicos de moléculas, lo que les permite catalizar diversas reacciones [21], [22].

También intervienen en la bioactivación de los profármacos, los cuales necesitan ser transformados a su forma activa para ejercer su efecto terapéutico [23]. La biotransformación de los fármacos en humanos está mediada principalmente por las familias CYP 1 a 3, que son responsables de más del 80% de las reacciones metabólicas [22].

Las enzimas CYP tienen un grupo prostético compuesto de protoporfirina IX de hierro que se une, en la mayoría de casos, en su sitio activo. El ciclo catalítico de las enzimas CYP requiere de múltiples componentes para la transferencia de electrones. Estos donadores de electrones pueden ser NADPH citocromo P450 reductasa (CPR) o el citocromo b5 [24]. Por ejemplo, los electrones son transferidos desde el NADPH al P450 mediante los cofactores mononucleótido de flavina (FMN) y dinucleótido de flavina adenina (FAD) del CPR (ver Fig. 1) [25].

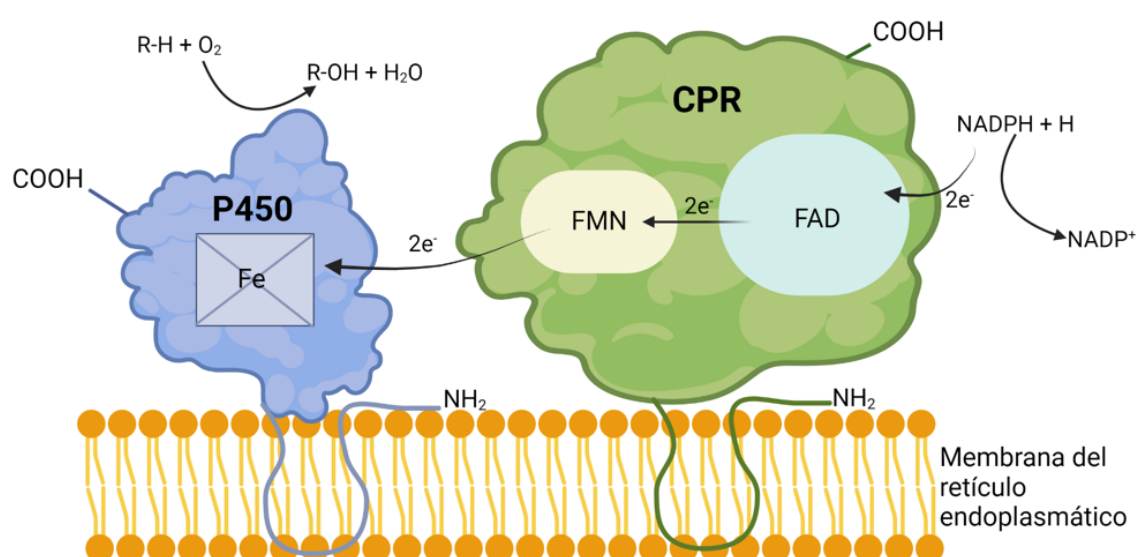


Fig. 1. Ilustración de la donación de electrones provenientes del NADPH por parte de la reductasa del citocromo P450 (CPR) al citocromo P450. Diseñado con Biorender.com.

Algo que resaltar es que las enzimas CYP cumplen un papel importante en el metabolismo de carcinógenos (1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2A13, 2E1 y 3A4) y en la activación de antineoplásicos [26]. En consecuencia, estas enzimas son usualmente usadas en terapias de gen suicida (GDEPT) contra el cáncer. Algunos de los antineoplásicos metabolizados por enzimas CYP se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Profármacos activados por citocromos P450. Adaptado de [25,27].

Profármaco	Fármaco anticáncer	Farmacología
4-ipomeanol	Epóxido de furán	Alquilación del ADN
Ciclofosfamida	Mostaza de fosforamida	Alquilación del ADN
Dacarbacina	HHMTIC	Alquilación del ADN
Doxorubicina	Doxorubicinol	Agente intercalante
Ftorafur (Tegafur)	5-FU	Inhibidor de la timidilato sintasa/ incorporado en el ADN y ARN
Ifosfamida	Mostaza de isofosfamida	Alquilación del ADN
Irinotecan	SN-38	Inhibidor de la topoisomerasa I
Tamoxifeno	Endoxifeno	Antiestrogénico
Tiotepa	No definido	Alquilación del ADN
Trofosfamida	Mostaza de trofosfamida	Alquilación del ADN

La bioactivación mediada por enzimas puede tener diversos resultados, como la transformación de un profármaco en su forma activa, cambios en los niveles de actividad y potencial toxicidad [28]. Además, la presencia de polimorfismos genéticos pueden dar lugar a diferencias en la actividad enzimática y en la afinidad por el mismo sustrato, por lo cual es necesario considerarlos para asegurar la efectividad de las terapias [29]. Las interacciones de los polimorfismos de la enzima CYP y varios fármacos han sido documentadas en la página del Consorcio de variación farmacogénica (<https://www.pharmvar.org/genes>).

Mecanismos de activación de la ciclofosfamida por los citocromos P450 y sus constantes cinéticas

La activación de la CPA o IFA a su compuesto terapéutico requiere de un paso de 4-hidroxilación mediado por enzimas CYP [18]. Se conocen varios tipos de P450 humanos (hepáticos) involucrados en la reacción de 4-hidroxilación de estos agentes, como el CYP2B6 (45% de la bioactivación total de la CPA), CYP3A4 (25%), CYP2C9 (12%) y otros (18%) [30], [31]. Otras enzimas CYP no humanas también han sido identificadas como activadoras de la CPA (Tabla 2). En esta reacción, tanto CPA como IFA pueden ser hidroxilados y producir mostaza de fosforamida (agente terapéutico) y acroleína como subproducto. Sin embargo, CPA e IFA presentan una ruta alterna, no ideal, de producción de dicloroetil-CPA/IFA (no terapéutico) y cloroacetaldehído (ver Fig. 2); siendo este último neurotóxico y nefrotóxico [32].

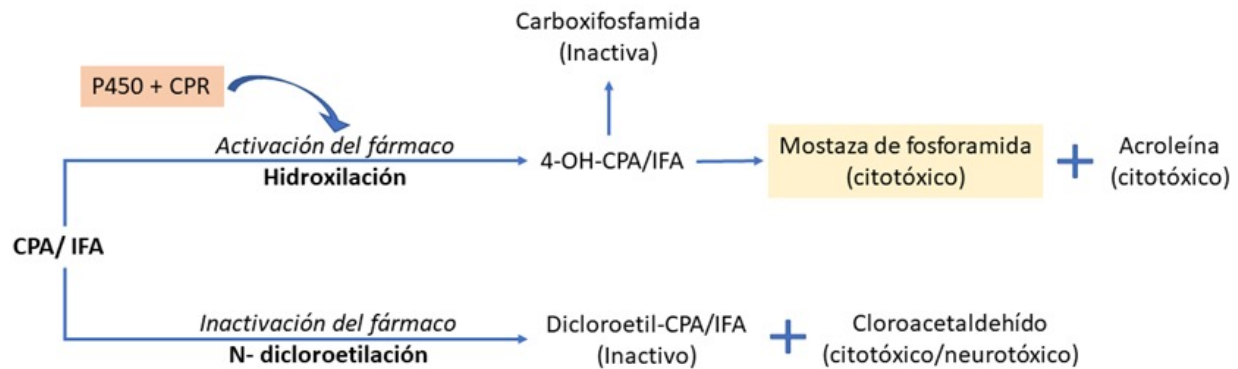


Fig. 2. Ruta de activación de la ciclofosfamida (CPA) y la ifosfamida (IFA) mediante citocromos P450 y su reductasa (CPR). El cuadro en amarillo muestra la producción de la mostaza de fosforamida, agente citotóxico de efecto quimioterapéutico.

Tabla 2. Lista de enzimas CYP involucradas en la activación de la CPA por la ruta de 4-hidroxilación y sus valores cinéticos.

Enzima CYP (Silvestre)	Organismo	Km (mM)	Vmax (mol/min/mol)	Vmax/Km (mol/min/mol P450/ mM)	Ref.
2B1	Rata	1.45	35.9	24.9	[33]
2B4	Conejo	5.28	13.5	2.6	[33]
2B5	Conejo	4.17	2.8	0.7	[33]
2B11	Canino	0.16	28.2	174.7	[33], [34]
2B6	Humano	4.9	62.5	12.8	[35]
		1.89	100.4	53.1	[31]
2C8	Humano	2.4	5	2.1	[36]
2C9 (Ile359)	Humano	0.5	1.5	3	
2C9*	Humano	2.9	27.8	9.6	[37]
2C19*	Humano	5.85	32.7	5.6	
2C19	Humano	0.3	0.25	0.8	[36]
2C18 (Thr385)	Humano	2.8	33	11.8	
3A4	Humano	1.46	25.5	17.5	[31]
3A5	Humano	-	-	-	[38]
1A1	Humano	-	-	-	[30]
1A2	Humano	-	-	-	[30], [39]
2A6	Humano	-	-	-	[30]
2E1	Humano	-	-	-	[30]
2J2	Humano	3.7-6.6	2.9-10.3	0.5-2.3	[40]

*2C9.1 y 2C19.1 variantes alélicas

Pese a que los citocromos humanos CYP2B6, CYP3A4 y CYP2C9 catalizan esta reacción en mayor proporción, el citocromo P450 de rata CYP2B1 y el de perro CYP2B11 presentan actividad de 4-hidroxilación de la CPA superior a las otras formas (ver Tabla 2, Km) [33], [41]. Los valores de Km (afinidad de los P450 por CPA) son menores a 1.5 mM para CYP2B1 y CYP2B11 y entre 1.89 a 4.9 mM para CYP2B6 (ver Tabla 2) [31], [41]. Con los valores actuales de Km (>0.16 -5 mM) altas dosis del profármaco son requeridas para una activación eficiente del agente anticancerígeno, y por consiguiente limitan la utilidad del GDEPT basado en enzimas CYP. Es indispensable, entonces, trabajar en mejoras sobre la enzima P450 para favorecer la activación de la CPA. Es importante mejorar las características de la enzima como su eficiencia catalítica (V_{max}/K_m) hacia la 4-hidroxilación de la CPA y reducir su Km (<0.16 mM) para así prevenir la N-dicloroetilación (ver Fig. 2) [33].

Por años las alternativas para mejorar las características de la enzima se basaron en el uso del diseño racional partiendo de estructuras obtenidas por rayos-x y sustituciones de residuos presentes en el sitio activo de la enzima [42] o el empleo de P450 de organismos alternativos. Un ejemplo ha sido el uso del CYP2B11 canino, el cual mejoró el Km hasta 30 veces en comparación con el del CYP2B6 (humano) y 9 veces en comparación del CYP2B1 (rata) [13] (ver Tabla 2). Sin embargo, en la actualidad, estas enzimas pueden beneficiarse ampliamente de nuevas estrategias para mejorar sus valores cinéticos.

Potencial de uso de citocromos P450 y CPA en terapia génica de cáncer

En general, los agentes quimioterapéuticos como la CPA han incrementado significativamente la expectativa de vida en pacientes que padecen de diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, dado que su forma de acción es generar un efecto citotóxico en las células de división rápida para combatir el tumor, también causan una variedad de efectos secundarios debido a su efecto tóxico sobre otras células del cuerpo (no tumorales) de división rápida [14], [16]. En algunos pacientes estos efectos secundarios son insostenibles por lo que requieren una reducción en la dosis, cambio a un régimen menos efectivo de quimioterapia o incluso terminación del tratamiento, lo que en últimas instancias reduce su expectativa de vida e incrementan la morbilidad [43].

Los mayores problemas del uso de agentes quimioterapéuticos son: i) daño a las células y órganos normales, ii) su estrecho índice terapéutico, iii) su pobre selectividad por células neoplásicas (de multiplicación anormal) y iv) desarrollo de multirresistencias después de un periodo prolongado de tratamiento debido a sobrerregulación de las bombas de eflujo, incremento en la expresión de glutatión S-transferasa e incremento en el reparamiento del ADN [44].

Una estrategia potencial para sobrellevar estas limitaciones es el uso de profármacos en conjunto con terapia génica. El uso del profármaco CPA es beneficioso ya que tiene eficiencia comprobada, es ampliamente utilizado en tratamientos tradicionales de quimioterapia y elimina la necesidad de buscar y probar un nuevo compuesto [33]. En la quimioterapia tradicional, la CPA es convertida a su forma activa y citotóxica en el hígado por enzimas CYP y mediante el torrente sanguíneo esta molécula activa es transportada al tumor, sin embargo, puede también interactuar con células no tumorales provocando efectos no deseados (ver Fig. 3) [14].

Afortunadamente, estos problemas pueden ser solucionados mediante el uso de terapia génica (específicamente GDEPT) basada en enzimas P450, en donde la secuencia codificante para la enzima CYP es introducida mediante un vector o vehículo a la zona del tumor y ahí realiza la activación del profármaco (CPA) para que cumpla su función quimioterapéutica

[33]. Además, esta estrategia permite la eliminación de las células tumorales a dosis más bajas de las que se usarían si el agente es aplicado de forma tradicional [33]. Esto debido al efecto "bystander", el cual permite que células vecinas a las células transfectadas también se vean afectadas por la citotoxina (ver Fig. 3) [13].

En términos generales el uso de GDEPT es atractivo ya que complementa a la quimioterapia clínica actual, además sólo una pequeña parte de células tienen que ser modificadas genéticamente para poder lograr la destrucción del tumor. Esto ya que se toma ventaja del efecto "bystander" en el cual el agente citotóxico es transferido a las células vecinas. Este efecto es crítico para el éxito de GDEPT, por lo cual hay que considerarlo durante el desarrollo de la terapia [45]. Un reciente artículo de Carrera-Pacheco et al. (2024), resalta el uso de las enzimas CYP en terapia génica del cáncer [46].

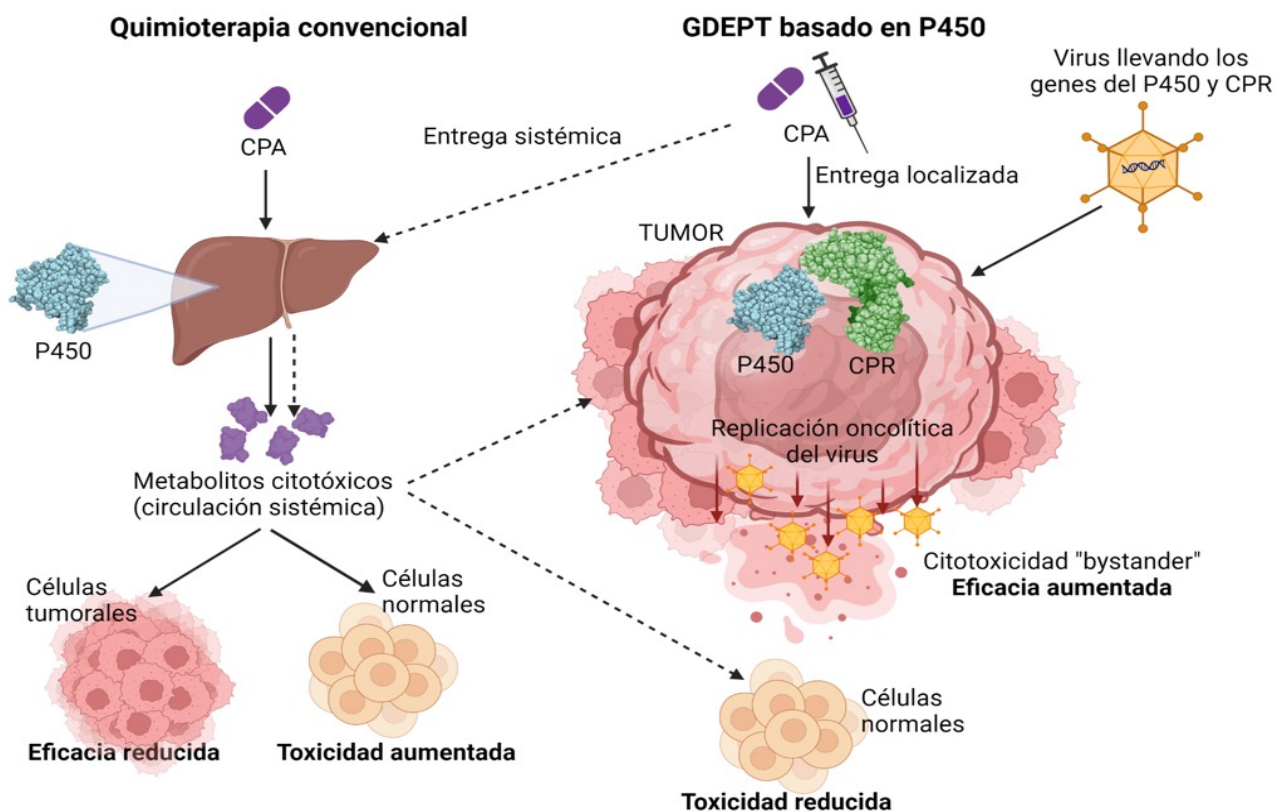


Fig. 3. Comparación entre la quimioterapia convencional y la terapia génica basada en citocromos P450. Diseñado con Biorender.com.

Evidencia *in vitro*, preclínica y clínica

Estudios *in vitro* sobre la bioactivación de la ciclofosfamida mediada por los citocromos P450 y mejoras genéticas realizadas

Tradicionalmente, el diseño racional ha sido empleado para mejorar genéticamente enzimas como los citocromos P450. Sin embargo, en los últimos años, la atención se ha volcado hacia el uso de la evolución dirigida y la reconstrucción ancestral de secuencias (ASR). Estas estrategias han demostrado ser exitosas en la obtención de enzimas altamente eficientes, con mejor expresión, mayor termoestabilidad, robustez y mejores características cinéticas [47]–[49]. Se espera que estas estrategias sean cada vez más utilizadas en el diseño de enzimas CYP para terapia génica. A continuación se describen estudios sobre la bioactivación de la ciclofosfamida mediada por enzimas CYP, silvestres (ver Tabla 2) y mutantes.

CYP2B1:

Comparaciones entre la enzima CYP2B1 de rata con la CYP2B4 o 2B5 de conejo demostraron una eficiencia catalítica de 10 a 35 veces superior para catalizar la hidroxilación de la CPA en el caso de la CYP2B1. Posteriormente, mediante la sustitución de un residuo en CYP2B1 (I114V), se mejoró aún más la eficacia de la hidroxilación de la CPA (K_m 0.4 mM) [33].

En otro estudio se creó un mutante doble con su extremo amino-terminal modificado (2B1dH L209A/S334P). Este mutante demostró una mayor eficiencia catalítica en la activación de la CPA. Estas mejoras se tradujeron en una reducción de 6 veces en el valor K_m (0.2 mM) para la 4-hidroxilación del CPA en comparación con el CYP2B1 original [50].

CYP2B11:

El CYP2B11 canino demostró una actividad de 4-hidroxilación del CPA de 9 veces mayor (K_m 0.16 mM) que el CYP2B1 [33]. En otro estudio, se utilizó el CYP2B11 en ratones con gliosarcomas, en los que se inyectó CPA directamente en el tumor y se ralentizó su liberación en el torrente sanguíneo mediante un biopolímero. El resultado fue un aumento total de 3,9 veces en la actividad intratumoral y antitumoral [51]. Posteriormente, el CYP2B11 fue rediseñado para mejorar el metabolismo de la CPA mediante la introducción de seis mutaciones en el extremo amino-terminal (P450 2B11dH), mejorando la eficiencia catalítica para la CPA (K_m 0.06 mM) [34].

CYP2B6:

CYP2B6 ha demostrado una actividad de 4-hidroxilación del CPA de entre 1.89-4.9 mM [31], [35], [35]. Varios estudios y mejoras fueron realizados con CYP2B6, por ejemplo, una proteína de fusión CYP2B6-NADPH citocromo P450 reductasa (RED) demostró ser eficaz para potenciar la citotoxicidad del CPA en líneas celulares tumorales de pulmón con bajos niveles de RED endógena tras la infección y durante el tratamiento [52]. Otra enzima obtenida a partir de un mutante triple de CYP2B6 y RED (CYP2B6TM-RED, K_m 1.05 mM) fue introducida en líneas celulares pulmonares humanas (A549) y murinas (TC1) resistentes y las transformó en líneas celulares susceptibles a la CPA [53].

En otro estudio, se sustituyeron residuos del CYP2B6 por aminoácidos específicos que se encuentran en las secuencias de reconocimiento de sustrato del CYP2B11. Como resultado, un mutante doble (I114V/ V477W) mostró una reducción de 4.5 veces en el K_m (1.1 mM) y convirtió una línea celular humana de cáncer de cabeza y cuello resistente en una línea celular sensible al CPA [35]. En una investigación sobre el glioblastoma multiforme (GBM), un tumor cerebral muy agresivo, se exploró el uso de la terapia génica CYP2B6 en combinación con células madre/progenitoras neurales. Los resultados revelaron una reducción significativa del crecimiento tumoral tras la administración de CPA [54]. En 2016, Lautier y sus colegas crearon quince quimeras entre CYP2B6 y CYP2B11 para mejorar la afinidad por el CPA. Entre ellas, las quimeras K y O mostraron los valores K_m más bajos (K_m de 0.07 y 0.02 mM, respectivamente), proporcionando una mejor comprensión de los elementos estructurales que controlan la especificidad del CPA en estas enzimas [55].

CYP2C8, 2C9, 2C18 y 2C19:

Tanto CYP2C9 como CYP2C19 mostraron bioactivación de la CPA *in vitro*, sin embargo las variantes polimórficas CYP2C9.2 y CYP2C9.3 presentaron una actividad de 4-hidroxilación tres veces menor que CYP2C9.1. Además, CYP2C9 no parece contribuir sustancialmente a la 4-hidroxilación total de CPA y CYP2C19 contribuye en menor medida [37]. En otro estudio 2C19 mostró el Km más bajo (0.3 mM), seguido de 2C9, 2C18 y 2C8 (Tabla 2) para el metabolismo de la CPA [36]. No se tiene reportes de mejoras sobre estas enzimas CYP para uso en terapia del cáncer.

CYP3A4:

CYP3A4 mostró un Km 3.4 veces menor que el CYP2B6 para la 4-hidroxilación de la CPA. Sin embargo, presenta una mayor actividad de N-dicloroetilación hacia la CPA y no es un catalizador enzimático importante de la 4-hidroxilación de la CPA como lo es CYP2B6 [31]. No se tiene reportes de mejoras sobre estas enzimas CYP para uso en terapia del cáncer.

CYP2J2:

Se demostró que CYP2J2 es igual de importante que el CYP2B6 en el metabolismo de la CPA. Su Km (3.7-6.6 mM) es relativamente similar al del CYP2B6 (Km 1.89-4.9 mM) [40]. No se tiene reportes de mejoras sobre estas enzimas CYP para uso en terapia del cáncer.

En general muchos estudios se han enfocado en la investigación del efecto de los polimorfismos presentes en las enzimas CYP sobre la activación de la CPA, los cuales son importantes al momento de desarrollar la GDEPT [56], [57]. Sin embargo, en base a nuestra búsqueda bibliográfica, no se han realizado modificaciones genéticas sobre las isoformas CYP1A1, 1A2, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 3A4, 3A5, 2E1 y 2J2.

Resultados de ensayos clínicos que respaldan el uso de citocromos P450 en la terapia con ciclofosfamida

Los estudios preclínicos y clínicos han explorado el potencial de la terapia del gen suicida (GDEPT), que involucra enzimas del citocromo P450. Un estudio preclínico realizado por McErlane et al. (2005) demostró la eficacia de la enzima CYP2B6 combinada con radiación y los profármacos banoxantrona (AQ4N) y CPA, para inducir daño en el ADN de células RIF-1 y reducir el tamaño del tumor en un modelo murino. El estudio destacó la funcionalidad de la enzima tanto en condiciones ricas en oxígeno como en condiciones hipóxicas [58]. En ensayos clínicos, un estudio de fase I-II de Löhr et al. (2003) incluyeron a 14 pacientes con adenocarcinoma de páncreas inoperable los cuales recibieron células CYP2B1 microencapsuladas de forma intraarterial seguidas de ifosfamida. El tratamiento no mostró toxicidad significativa, con enfermedad estable en la mayoría de los pacientes y respuesta parcial en dos de ellos [59]. A pesar de estos desafíos, el potencial para integrar GDEPT con otras terapias contra el cáncer sigue siendo prometedor y justifica más investigación y desarrollo.

Desafíos y futuras direcciones

La terapia del gen suicida (GDEPT) enfrenta desafíos importantes, como superar las barreras físicas e inmunitarias para la entrega eficaz de genes a una cantidad suficiente de células tumorales. Esto es crucial para una activación exitosa del profármaco, ya que la administración o su expresión ineficaz puede provocar una actividad antitumoral reducida o una mayor resistencia al tratamiento [22]. Otro desafío en GDEPT es debido a la administración directa de vectores al sitio del tumor, si bien reduce la exposición sistémica, conlleva riesgos como sangrado, posible siembra metastásica y distribución desigual dentro del tumor, lo que limita la eficacia general de la terapia [60]. Dicha administración también está restringida a tumores accesibles, con desafíos para llegar a tumores profundamente arraigados o inoperables [60].

Además, la eficacia de GDEPT disminuye por la presencia de células tumorales que no se dividen y que son menos susceptibles a los sistemas de enzimas y profármacos diseñados principalmente para células que se dividen rápidamente. Esto podría contribuir a la resistencia y la recurrencia del cáncer [61]. La especificidad del sistema enzima-profármaco es otro obstáculo; Idealmente, la enzima expresada debería activar el profármaco solo en el sitio del tumor para evitar daños a los tejidos sanos.

El desarrollo de resistencia, la posible inmunogenicidad de los vectores o enzimas y las controversias éticas sobre la ingeniería genética en humanos son desafíos adicionales que requieren investigación continua para optimizar las estrategias de GDEPT, mejorar la especificidad y la seguridad, y abordar los requisitos reglamentarios para la aplicación clínica [17], [62].

Las direcciones futuras en la investigación de GDEPT se centran en desarrollar tratamientos específicos y eficientes utilizando enzimas diseñadas y sistemas de administración avanzados [63]. Se debe también integrar el GDEPT con otras terapias y aprovechar la inteligencia artificial para diseñar terapias contra el cáncer personalizadas y efectivas.

Conclusiones

La investigación sobre el uso de enzimas del citocromo P450 en la bioactivación de la ciclofosfamida representa un avance significativo en el tratamiento del cáncer. Estos hallazgos clave demuestran que las enzimas CYP pueden activar eficientemente la CPA en su forma terapéutica, ofreciendo una manera más dirigida y menos tóxica de combatir las células cancerosas. Esta estrategia, al minimizar los efectos secundarios y aumentar la precisión del tratamiento, tiene el potencial de transformar las prácticas clínicas actuales, ofreciendo opciones de tratamiento más seguras y eficaces para los pacientes.

Desde una perspectiva clínica, la capacidad de las enzimas CYP para activar específicamente los profármacos en el entorno tumoral sugiere un notable potencial para mejorar los resultados de los pacientes, disminuyendo la toxicidad sistémica asociada con la quimioterapia convencional. Este enfoque podría ser especialmente valioso en pacientes con cánceres avanzados o en aquellos que no responden bien a las terapias estándar, facilitando tratamientos más personalizados y efectivos.

Para aprovechar completamente estas ventajas, es necesario enfocar las futuras investigaciones en optimizar los vectores de entrega de genes para los citocromos P450, asegurando una expresión eficiente y específica en las células tumorales. Además, es crucial continuar los estudios sobre la ingeniería genética de las enzimas CYP para obtener variantes más eficientes que puedan ser empleadas en GDEPT. Es importante también, el estudio de la interacción entre diferentes isoformas de P450 y varios tipos de cáncer para identificar los enfoques más eficaces. Finalmente, es esencial la realización de ensayos clínicos más amplios y detallados que evalúen la eficacia y seguridad de estos tratamientos en diversas poblaciones de pacientes, lo que ayudará a estandarizar estos métodos en la práctica clínica y a desarrollar nuevas modalidades terapéuticas basadas en la bioactivación enzimática.

Referencias

- [1]. Cancer.Net, "Breast Cancer," Cancer.Net, 2022. [Online]. Available: <https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer>. [Accessed: 08-Jun-2022]
- [2]. Statista, "Cancer worldwide - Statistics & Facts," Statista, 2021. [Online]. Available: <https://www.statista.com/topics/8292/cancer-worldwide/>. [Accessed: 02-Jun-2022]
- [3]. American society of clinical oncology, "American society of clinical oncology," ASCO, 2022. [Online]. Available: <https://beta.asco.org/search?q=cancer>. [Accessed: 09-Jun-2022]
- [4]. Brestcancer.org, "About breast cancer," Brestcancer.org, 2022. [Online]. Available: <https://www.breastcancer.org/about-breast-cancer>. [Accessed: 08-Jun-2022]
- [5]. A. Arrospide, M. Soto-Gordoa, T. Acaiturri, G. López-Vivanco, L. C. Abecia, and J. Mar, "[Cost of breast cancer treatment by clinical stage in the Basque Country, Spain].," *Rev. Esp. Salud Publica*, vol. 89, no. 1, pp. 93–97, Feb. 2015, doi: 10.4321/S1135-57272015000100010.
- [6]. B. Balkhi et al., "Drug utilization and expenditure of anticancer drugs for breast cancer," *Saudi Pharm. J.*, vol. 28, no. 6, pp. 669–674, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.jsps.2020.04.007.
- [7]. Y. Jounaidi and D. J. Waxman, "Use of replication-conditional adenovirus as a helper system to enhance delivery of P450 prodrug-activation genes for cancer therapy.," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 1, pp. 292–303, Jan. 2004, doi: 10.1158/0008-5472.can-03-1798.
- [8]. S. K. Libutti, "Recording 25 years of progress in Cancer Gene Therapy.," *Cancer Gene Ther.*, vol. 26, no. 11–12, pp. 345–346, Nov. 2019, doi: 10.1038/s41417-019-0121-y.
- [9]. B. Cesur-Ergün and D. Demir-Dora, "Gene therapy in cancer.," *J. Gene Med.*, vol. 25, no. 11, p. e3550, Nov. 2023, doi: 10.1002/jgm.3550.
- [10]. D. J. Waxman, L. Chen, J. E. Hecht, and Y. Jounaidi, "Cytochrome P450-based cancer gene therapy: recent advances and future prospects.," *Drug Metab. Rev.*, vol. 31, no. 2, pp. 503–522, May 1999, doi: 10.1081/dmr-100101933.

- [11]. A. P. Mishra, S. Chandra, R. Tiwari, A. Srivastava, and G. Tiwari, "Therapeutic potential of prodrugs towards targeted drug delivery.," *Open Med. Chem. J.*, vol. 12, pp. 111–123, Oct. 2018, doi: 10.2174/1874104501812010111.
- [12]. L. Chen and D. J. Waxman, "Cytochrome P450 gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) for cancer.," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 8, no. 15, pp. 1405–1416, 2002, doi: 10.2174/1381612023394566.
- [13]. Y. Jounaidi, C.-S. Chen, G. J. Veal, and D. J. Waxman, "Enhanced antitumor activity of P450 prodrug-based gene therapy using the low Km cyclophosphamide 4-hydroxylase P450 2B11.," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 5, no. 3, pp. 541–555, Mar. 2006, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0321.
- [14]. P. Roy and D. J. Waxman, "Activation of oxazaphosphorines by cytochrome P450: application to gene-directed enzyme prodrug therapy for cancer.," *Toxicol In Vitro*, vol. 20, no. 2, pp. 176–186, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.tiv.2005.06.046.
- [15]. G. Voelcker, "The mechanism of action of cyclophosphamide and its consequences for the development of a new generation of oxazaphosphorine cytostatics," *Sci. Pharm.*, vol. 88, no. 4, p. 42, Sep. 2020, doi: 10.3390/scipharm88040042.
- [16]. L. H. Fraiser, S. Kanekal, and J. P. Kehrer, "Cyclophosphamide toxicity. Characterising and avoiding the problem.," *Drugs*, vol. 42, no. 5, pp. 781–795, Nov. 1991, doi: 10.2165/00003495-199142050-00005.
- [17]. M. C. E. McFadyen, W. T. Melvin, and G. I. Murray, "Cytochrome P 450 enzymes: Novel options for cancer therapeutics," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 3, no. 3, pp. 363–371, Mar. 2004, doi: 10.1158/1535-7163.363.3.3.
- [18]. H. O. McCarthy et al., "Bioreductive GDEPT using cytochrome P450 3A4 in combination with AQ4N.," *Cancer Gene Ther.*, vol. 10, no. 1, pp. 40–48, Jan. 2003, doi: 10.1038/sj.cgt.7700522.
- [19]. B. Mittal, S. Tulsyan, S. Kumar, R. D. Mittal, and G. Agarwal, "Cytochrome P450 in cancer susceptibility and treatment.," *Adv. Clin. Chem.*, vol. 71, pp. 77–139, Jul. 2015, doi: 10.1016/bs.acc.2015.06.003.
- [20]. D. R. Nelson et al., "The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature.," *DNA Cell Biol.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–51, Feb. 1993, doi: 10.1089/dna.1993.12.1.
- [21]. P. Urban, T. Lautier, D. Pompon, and G. Truan, "Ligand access channels in cytochrome P450 enzymes: A review.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 6, May 2018, doi: 10.3390/ijms19061617.
- [22]. M. Zhao et al., "Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism in humans.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 23, Nov. 2021, doi: 10.3390/ijms222312808.
- [23]. S. P. Rendic and F. P. Guengerich, "Human Family 1-4 cytochrome P450 enzymes involved in the metabolic activation of xenobiotic and physiological chemicals: an update.," *Arch. Toxicol.*, vol. 95, no. 2, pp. 395–472, Feb. 2021, doi: 10.1007/s00204-020-02971-4.

- [24]. L. Waskell and J.-J. P. Kim, "Electron transfer partners of cytochrome P450," in *Cytochrome P450*, P. R. Ortiz de Montellano, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2015, pp. 33–68.
- [25]. M. Rooseboom, J. N. M. Commandeur, and N. P. E. Vermeulen, "Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 56, no. 1, pp. 53–102, Mar. 2004, doi: 10.1124/pr.56.1.3.
- [26]. F. P. Guengerich, "Cytochrome P450 Enzymes," in *Comprehensive Toxicology*, Second Edition., vol. 4, C. A. McQueen, Ed. Oxford: Elsevier, 2010, pp. 41–76.
- [27]. L. Quiñones S et al., "Papel de las enzimas citocromo p450 en el metabolismo de fármacos antineoplásicos: Situación actual y perspectivas terapéuticas," *Rev. méd. Chile*, vol. 136, no. 10, Oct. 2008, doi: 10.4067/S0034-98872008001000015.
- [28]. F. P. Guengerich, "A history of the roles of cytochrome P450 enzymes in the toxicity of drugs.," *Toxicol. Res.*, vol. 37, no. 1, pp. 1–23, Jan. 2021, doi: 10.1007/s43188-020-00056-z.
- [29]. A. Gaedigk et al., "The pharmacogene variation (pharmvar) consortium: incorporation of the human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature database.," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 103, no. 3, pp. 399–401, Mar. 2018, doi: 10.1002/cpt.910.
- [30]. T. K. Chang, G. F. Weber, C. L. Crespi, and D. J. Waxman, "Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes.," *Cancer Res.*, vol. 53, no. 23, pp. 5629–5637, Dec. 1993.
- [31]. Z. Huang, P. Roy, and D. J. Waxman, "Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 59, no. 8, pp. 961–972, Apr. 2000, doi: 10.1016/s0006-2952(99)00410-4.
- [32]. M. Furlanut and L. Franceschi, "Pharmacology of ifosfamide.," *Oncology*, vol. 65 Suppl 2, pp. 2–6, 2003, doi: 10.1159/000073350.
- [33]. C.-S. Chen, J. T. Lin, K. A. Goss, Y. He, J. R. Halpert, and D. J. Waxman, "Activation of the anticancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide: identification of cytochrome P450 2B enzymes and site-specific mutants with improved enzyme kinetics.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 65, no. 5, pp. 1278–1285, May 2004, doi: 10.1124/mol.65.5.1278.
- [34]. L. Sun, C. S. Chen, D. J. Waxman, H. Liu, J. R. Halpert, and S. Kumar, "Re-engineering cytochrome P450 2B11dH for enhanced metabolism of several substrates including the anti-cancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide.," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 458, no. 2, pp. 167–174, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.abb.2006.12.021.
- [35]. T.-A. Nguyen et al., "Improvement of cyclophosphamide activation by CYP2B6 mutants: from in silico to ex vivo.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 73, no. 4, pp. 1122–1133, Apr. 2008, doi: 10.1124/mol.107.042861.

- [36]. T. K. H. Chang, L. Yu, J. A. Goldstein, and D. J. Waxman, "Identification of the polymorphically expressed CYP2C19 and the wild-type CYP2C9-ILE359allele as low-Km catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation," *Pharmacogenetics*, vol. 7, no. 3, pp. 211–221, Jun. 1997 [Online]. Available: https://journals.lww.com/jpharmacogenetics/abstract/1997/06000/identification_of_the_polymorphically_expressed.6.aspx. [Accessed: 24-Apr-2024]
- [37]. L. Griskevicius et al., "Bioactivation of cyclophosphamide: the role of polymorphic CYP2C enzymes," *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 59, no. 2, pp. 103–109, Jun. 2003, doi: 10.1007/s00228-003-0590-6.
- [38]. Z. Desta and D. A. Flockhart, "Pharmacogenetics of drug metabolism," in *Clinical and translational science*, Elsevier, 2017, pp. 327–345.
- [39]. F. Bohnenstengel, U. Hofmann, M. Eichelbaum, and H. K. Kroemer, "Characterization of the cytochrome P450 involved in side-chain oxidation of cyclophosphamide in humans," *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 51, no. 3–4, pp. 297–301, 1996, doi: 10.1007/s002280050201.
- [40]. I. El-Serafi et al., "Cytochrome P450 2J2, a new key enzyme in cyclophosphamide bioactivation and a potential biomarker for hematological malignancies," *Pharmacogenomics J.*, vol. 15, no. 5, pp. 405–413, Oct. 2015, doi: 10.1038/tpj.2014.82.
- [41]. G. F. Weber and D. J. Waxman, "Activation of the anti-cancer drug ifosfamide by rat liver microsomal P450 enzymes," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 45, no. 8, pp. 1685–1694, Apr. 1993, doi: 10.1016/0006-2952(93)90310-s.
- [42]. O. Gotoh, "Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 1, pp. 83–90, Jan. 1992, doi: 10.1016/S0021-9258(18)48462-1.
- [43]. H. Starobova and I. Vetter, "Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy," *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 10, p. 174, May 2017, doi: 10.3389/fnmol.2017.00174.
- [44]. A. A. Stavrovskaya, "Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells," *Biochemistry Mosc*, vol. 65, no. 1, pp. 95–106, Jan. 2000.
- [45]. D. J. Waxman and P. S. Schwartz, "Harnessing apoptosis for improved anticancer gene therapy," *Cancer Res.*, vol. 63, no. 24, pp. 8563–8572, Dec. 2003.
- [46]. S. E. Carrera-Pacheco, A. Mueller, J. A. Puente-Pineda, J. Zúñiga-Miranda, and L. Guaman, "Designing cytochrome P450 enzymes for use in cancer gene therapy," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, May 2024 [Online]. Available: <http://doi: 10.3389/fbioe.2024.1405466>. [Accessed: 20-May-2024]
- [47]. K. L. Harris et al., "Ancestral Sequence Reconstruction of a Cytochrome P450 Family Involved in Chemical Defense Reveals the Functional Evolution of a Promiscuous, Xenobiotic-Metabolizing Enzyme in Vertebrates," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 39, no. 6, Jun. 2022, doi: 10.1093/molbev/msac116.

- [48]. R. E. S. Thomson, S. E. Carrera-Pacheco, and E. M. J. Gillam, "Engineering functional thermostable proteins using ancestral sequence reconstruction.," *J. Biol. Chem.*, vol. 298, no. 10, p. 102435, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.jbc.2022.102435.
- [49]. Y. Gumulya et al., "Engineering highly functional thermostable proteins using ancestral sequence reconstruction," *Nat. Catal.*, vol. 1, no. 11, pp. 878–888, Oct. 2018, doi: 10.1038/s41929-018-0159-5.
- [50]. S. Kumar, C. S. Chen, D. J. Waxman, and J. R. Halpert, "Directed evolution of mammalian cytochrome P450 2B1: mutations outside of the active site enhance the metabolism of several substrates, including the anticancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide.," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 20, pp. 19569–19575, May 2005, doi: 10.1074/jbc.M500158200.
- [51]. C. S. Chen, Y. Jounaidi, T. Su, and D. J. Waxman, "Enhancement of intratumoral cyclophosphamide pharmacokinetics and antitumor activity in a P450 2B11-based cancer gene therapy model.," *Cancer Gene Ther.*, vol. 14, no. 12, pp. 935–944, Dec. 2007, doi: 10.1038/sj.cgt.7701092.
- [52]. M. Tychoopoulos, L. Corcos, P. Genne, P. Beaune, and I. de Waziers, "A virus-directed enzyme prodrug therapy (VDEPT) strategy for lung cancer using a CYP2B6/NADPH-cytochrome P450 reductase fusion protein.," *Cancer Gene Ther.*, vol. 12, no. 5, pp. 497–508, May 2005, doi: 10.1038/sj.cgt.7700817.
- [53]. W. Touati et al., "A suicide gene therapy combining the improvement of cyclophosphamide tumor cytotoxicity and the development of an anti-tumor immune response.," *Curr. Gene Ther.*, vol. 14, no. 3, pp. 236–246, 2014, doi: 10.2174/1566523214666140424152734.
- [54]. J. Mercapide, G. Rappa, F. Anzanello, J. King, O. Fodstad, and A. Lorico, "Primary gene-engineered neural stem/progenitor cells demonstrate tumor-selective migration and antitumor effects in glioma.," *Int. J. Cancer*, vol. 126, no. 5, pp. 1206–1215, Mar. 2010, doi: 10.1002/ijc.24809.
- [55]. T. Lautier, P. Urban, J. Loeper, L. Jezequel, D. Pompon, and G. Truan, "Ordered chimeraesis applied to CYP2B P450 enzymes.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1860, no. 7, pp. 1395–1403, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.bbagen.2016.03.028.
- [56]. C. Ekhardt, V. D. Doodeman, S. Rodenhuis, P. H. M. Smits, J. H. Beijnen, and A. D. R. Huitema, "Influence of polymorphisms of drug metabolizing enzymes (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, GSTA1, GSTP1, ALDH1A1 and ALDH3A1) on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide.," *Pharmacogenet. Genomics*, vol. 18, no. 6, pp. 515–523, Jun. 2008, doi: 10.1097/FPC.0b013e3282fc9766.
- [57]. W. Shu et al., "Cytochrome P450 Genetic Variations Can Predict mRNA Expression, Cyclophosphamide 4-Hydroxylation, and Treatment Outcomes in Chinese Patients With Non-Hodgkin's Lymphoma.," *J. Clin. Pharmacol.*, vol. 57, no. 7, pp. 886–898, Jul. 2017, doi: 10.1002/jcph.878.

- [58]. V. McErlane et al., "A cytochrome P450 2B6 mediated gene therapy strategy to enhance the effects of radiation or cyclophosphamide when combined with the bio-reductive drug AQ4N.," *J. Gene Med.*, vol. 7, no. 7, pp. 851–859, Jul. 2005, doi: 10.1002/jgm.728.
- [59]. M. Löhr et al., "Microencapsulated, CYP2B1-transfected cells activating ifosfamide at the site of the tumor: the magic bullets of the 21st century.," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 49 Suppl 1, pp. S21-4, May 2002, doi: 10.1007/s00280-002-0448-0.
- [60]. J. P. Braybrooke et al., "Phase I study of MetXia-P450 gene therapy and oral cyclophosphamide for patients with advanced breast cancer or melanoma.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 4, pp. 1512–1520, Feb. 2005, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0155.
- [61]. P. R. Ortiz de Montellano, "Cytochrome P450-activated prodrugs.," *Future Med. Chem.*, vol. 5, no. 2, pp. 213–228, Feb. 2013, doi: 10.4155/fmc.12.197.
- [62]. M. C. Stipp and A. Acco, "Involvement of cytochrome P450 enzymes in inflammation and cancer: a review.," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 87, no. 3, pp. 295–309, Mar. 2021, doi: 10.1007/s00280-020-04181-2.
- [63]. O. M. Malekshah, X. Chen, A. Nomani, S. Sarkar, and A. Hatefi, "Enzyme/prodrug systems for cancer gene therapy.," *Curr. Pharmacol. Rep.*, vol. 2, no. 6, pp. 299–308, Dec. 2016, doi: 10.1007/s40495-016-0073-y.