

UDC 616.006.81; 577.218

Адресная доставка терапевтических генов при лечении меланомы: роль поверхностных маркеров и специфических промоторов

И. В. Алексеенко^{1,2}, М. В. Зиновьева¹, В. В. Плешкан^{1,2}, Е. Д. Свердлов^{1,2}

¹Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН
Ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, Российская Федерация, 117997

²Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной генетики РАН
Пл. Академика И. В. Курчатова, 2, Москва, Российская Федерация, 123182

mzinov@mail.ru

Одной из проблем генной терапии злокачественной меланомы является целенаправленная экспрессия терапевтического гена в опухолевых клетках и их метастазах при минимизации ее в нормальных клетках. В обзоре рассмотрен двухэтапный подход к высокоспецифичной терапии. На первом этапе осуществляется адресная доставка терапевтических генов в опухолевые клетки с использованием в качестве мишени поверхностных маркеров меланомных клеток, на втором – обеспечивается специфичность экспрессии генов в опухолевых клетках. Проведен анализ поверхностных маркеров меланомных клеток с точки зрения применения их как мишеней для терапевтического воздействия. Предложены критерии выбора наиболее перспективных мишеней. Использование промоторов, активных только в меланомных клетках, позволяет еще больше увеличить специфичность воздействия за счет контроля транскрипции терапевтических генов в таких клетках.

Ключевые слова: генная терапия, поверхностные маркеры, промоторы, меланома.

В последние годы во всем мире возрастает количество пациентов с диагнозом злокачественной меланомы, принадлежащей к наиболее агрессивным опухолям. Одна из основных особенностей меланомы – раннее метастазирование, которое и приводит к высокой смертности пациентов: выживаемость больных в течение пяти лет после заболевания не превышает 50 %. В связи с этим терапия меланомы сопряжена со множеством трудностей, в числе которых сложность распознавания метастазов и высокая резистентность меланомных клеток, что определяет плохой прогноз развития заболевания [1, 2]. До настоящего времени основным способом лечения меланомы является хирургическая резекция пораженных тканей. Химио- и радиотерапия оказываются малоэффективными, поскольку метаста-

зы меланомы часто устойчивы к подобному лечению [2]. В связи с этим генная терапия предлагает новые подходы, базирующиеся на усилении специфичности воздействия на целевые малигнизированные клетки одновременно со снижением влияния препаратов на здоровые клетки. Одной из главных проблем на пути эффективного использования терапевтических средств постгеномной генерации является отсутствие оптимальных методов доставки терапевтического гена (трансгена) в злокачественные клетки. Для решения этой проблемы можно использовать специфические поверхностные маркеры клеток меланомы, связывающиеся с лигандами, введенными в состав доставляющего вектора. С другой стороны, опухолевую специфичность можно придать, создав условия для транскрипции трансгена только в определенной ткани. Для выполнения второго условия при конструировании терапевти-

ческих векторов используют промоторы и энхансеры, специфические для заданного типа опухолей [3, 4]. Преимуществом применения строго специфических к данной опухоли промоторов и других регуляторных элементов состоит в максимальном снижении побочных эффектов. Однако промоторы, хорошо работающие в первичной опухоли, не всегда сохраняют эту способность в ее метастазах. Поэтому кажется весьма перспективным использование промоторов, работающих в широком спектре опухолей, но не в нормальных клетках. Такие конструкции могут быть универсальными при лечении разных типов опухолей. Сочетание направленной доставки и специфической экспрессии генов может значительно увеличить безопасность терапевтической системы.

В данном обзоре описаны маркеры, имеющие повышенную концентрацию на поверхности клеток меланомы, но практически отсутствующие на нормальных, не опухолевых клетках. Особое внимание уделено изменению профиля экспрессии маркеров меланомы в метастазах. Рассмотрена возможность их использования для специфического распознавания малигнизированных клеток при доставке генетического материала. Приведены данные о поверхностных антигенах стволовых клеток меланомы, перспективных в качестве мишеней противораковой терапии. Кроме того, описаны структуры и свойства промоторов, специфических для клеток меланомы, а также промоторов, активных в широком спектре опухолей, и обсуждается возможность их использования для генной терапии меланомы.

Поверхностные маркеры меланомы. Поверхностные маркеры клеток меланомы являются предметом многолетних исследований [5, 6]. Ниже приведены наиболее значимые из них.

Антигены, определяемые цитотоксическими Т-лимфоцитами. Клетки меланомы синтезируют различные антигены, узнающиеся аутологичными и специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ) при презентации молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) [7]. Некоторые из этих антигенов представляют собой хорошие мишени для иммунотерапии.

Антигены, презентируемые на поверхности клеток меланомы, можно подразделить на четыре

класса [8]. Первый класс представлен антигенами дифференцировки меланоцитов. К ним относят такие белки, как тирозиназа (TYR), MLANA, SILV, TRP-1 и TRP-2 [9–11]. Антигены данного класса играют ключевую роль в развитии меланоцитов и обладают узкой тканеспецифичностью. Транскрипция генов, кодирующих белки этого класса, наблюдается только в меланоцитах, в клетках родимых и пигментных пятен, а также в клетках меланомы. Высокий уровень таких антигенов в пигментных и родимых пятнах не позволяет отличить клетки меланомы от неонкогенных клеток меланоцитарного ряда [12]. Однако данные антигены могут служить высокочувствительными диагностическими маркерами при определении клеток меланомы в крови и при метастазировании [13] и быть хорошими мишенями для терапии метастазов.

Ко второму классу принадлежат тестикулярно-опухолевые антигены. Они специфичны для эмбриональных клеток и обычно отсутствуют в тканях взрослого организма, за исключением семенников и плаценты [14, 15]. Однако эти антигены высоко представлены и в опухолях разного гистологического происхождения, в том числе и в меланомах [16]. К тестикулярно-опухолевым антигенам относят три семейства экспрессирующих их генов – *MAGE*, *BAGE* и *GAGE*. Клетки меланомы презентируют как минимум один из указанных антигенов. До настоящего времени функции этих антигенов изучены недостаточно. Предполагается, что они могут быть вовлечены в регуляцию клеточного цикла и апоптоза [14–16]. Гены *CTAG1B (NY-ESO-1)* и *LAGE-1* входят в другую группу тестикулярно-опухолевых антигенов [17]. Уровень транскрипции генов *NY-ESO-1/LAGE-1* в семенниках и плаценте очень высок; в сердце, скелетных мышцах и поджелудочной железе – низок, а в других тканях экспрессия гена не детектируется. Повышенная экспрессия гена *NY-ESO-1* наблюдается при некоторых типах рака, в частности, в клетках меланомы и зависит от стадии заболевания. Увеличенную экспрессию *NY-ESO-1* связывают с плохим прогнозом развития болезни [18].

Также к тестикулярно-опухолевым антигенам принадлежит семейство *SSX*, насчитывающее пять представителей. Все они в норме экспрессируются

в семенниках, в следовых количествах – в щитовидной железе и обнаруживаются при многих типах рака [19]. При меланоме особенно интенсивна транскрипция гена *SSX2* [20].

Входящие в два других класса антигены, презентированные на поверхности и представляющие собой пептидные фрагменты или белки, содержание которых сильно повышено в различных типах опухолей (например, *BIRC5*, *MUC1/2*, *AFP* и *EphA2*), а также опухолеспецифические антигены, возникающие вследствие точечных мутаций повсеместно распространенных генов (*p53*, *Ras*, *CDK4*, *MUM1*, *CTNNB1*, *CDKN2B/INK4* и др.), не уникальны для клеток меланомы и их рассмотрение выходит за рамки данного обзора.

Антигены, преимущественно синтезируемые клетками меланомы. Отдельную группу составляют поверхностные антигены, экспрессия которых специфична только для клеток меланом и их метастазов. В настоящее время известны два таких антигена – *MIA* (*melanoma-inhibiting activity*) и *MELOE* (*melanoma-overexpressed antigen*). Белок меланомной ингибирующей активности *MIA* играет важную роль в инвазии и метастазировании меланом и рассматривается как высокоспецифический и чувствительный маркер. Экспрессия гена *MIA* обнаружена преимущественно в меланоме, незначительно – в хондросаркомах, карциномах яичника и почек, при раке головы/шеи и отсутствует в клетках нормальной кожи и родимых пятнах [21, 22]. Недавно охарактеризованный антиген *MELOE* специфичен только для клеток меланомы, в других тканях и опухолях он не выявлен. Функции и свойства этого антигена до сих пор неизвестны [23, 24].

Важным фактором при лечении меланомы является доставка терапевтических генов в метастазы. Для этого необходимо понимать, как изменяются наборы поверхностных маркеров в ряду опухолей-метастазы. Анализ профилей экспрессии описанных выше антигенов показал, что антигены дифференцировки *SILV*, *MLANA*, *TYR* в образцах как первичных опухолей, так и метастазов находятся на одинаковом уровне. В то же время тестикулярно-опухолевые антигены *MAGE1*, *MAGE4*, *NY-ESO-1* встречаются в первичных опухолях реже и в меньших количествах, чем в метастазах [25], и, следова-

тельно, могут быть мишенями терапевтического воздействия как в первичных опухолях, так и метастазах. Обнаружено, что экспрессия гена *MIA* увеличивается с прогрессией меланомы [26].

Высокоспецифическая экспрессия тестикулярно-опухолевых антигенов и антигенов дифференцировки меланоцитов делает их хорошими мишенями для доставки генно-терапевтических конструкций. С другой стороны, уникальность генетического регуляторного аппарата этих генов может быть использована для экспрессии терапевтических генов только в меланомах.

Рецепторы меланомных клеток способны обеспечивать избирательное проникновение терапевтических конструкций в нужные клетки за счет интернализации рецептора. Им посвящено много обзоров [27, 28]. Здесь же мы остановимся на описании только двух рецепторов – меланокортина и тирозинкиназного рецептора *c-Met*, представляющих наибольший интерес в качестве мишеней для направленной доставки препаратов.

Рецептор меланокортина 1 (MC1R). Охарактеризованы пять различных меланокортиновых рецепторов со специфическим распределением экспрессии по тканям человека [29]. В меланоцитах и клетках меланом предпочтительно экспрессируется только рецептор α -меланоцит-стимулирующего гормона *MC1R*. Высокая экспрессия *MC1R* характерна также для клеточных линий, происходящих из первичных и метастатических меланом, в некоторых других тканях и клетках встречаются лишь минорные количества этого рецептора [30, 31]. Рецептор *MC1R* в основном локализуется внутри клеток, его количество увеличивается на поверхности клеток при метастатической и увеальной меланомах [30]. Индуцируют выход *MC1R* на поверхность клеток некоторые цитокины, такие как интерферон γ (*IFN- γ*), фактор некроза опухоли α (*TNF- α*), интерлейкины *IL-4* и *IL-10* [32]. Рецептор *MC1R* имеет очень высокое сродство к таким лигандам, как адренокортикотропный и меланоцит-стимулирующий гормоны, способные специфически интернализироваться клетками [32, 33]. Таким образом, этот рецептор можно рассматривать в качестве одного из кандидатов для направленной доставки препаратов в клетки меланомы.

Рецептор c-Met (HGFR). Рецептор ростового фактора гепатоцитов c-Met (HGFR) синтезируется в эпителиальных клетках и играет важную роль при эмбриональном развитии. Природным лигандом рецептора является ростовой фактор гепатоцитов (HGF), экспрессия которого наблюдается и в меланомных клетках, что приводит к активации рецептора c-Met, регулирующего сигнальные пути MAPK и PI3K [34]. Высокая экспрессия c-Met в первичных меланомах стимулирует инвазивный рост раковых клеток и усиливает их метастатический потенциал. Вероятно, аутокринная регуляция HGF/c-Met важна для развития меланомы и поэтому нарушение лиганд-рецепторного взаимодействия может вызывать подавление роста меланомы [36]. Показано, что антитела с высокой аффинностью к HGF блокируют его связывание с рецептором, ингибируют фосфорилирование c-Met, клеточную пролиферацию и инвазию клеток опухоли [37]. При взаимодействии HGF с рецептором происходит интернализация последнего [38], что делает возможным использование c-Met в качестве рецептора для введения в клетку терапевтических генов, если в состав вектора включить аналог лиганда HGF.

Молекулы межклеточного взаимодействия. Развитие многих типов опухолей, включая меланому, сопровождается нарушением экспрессии генов, кодирующих белки клеточной адгезии [39]. Изменения в качественном и количественном составе молекул клеточной адгезии могут служить прогностическим признаком малигнизации. Молекулы клеточной адгезии представлены обширным классом белков, подразделяющимся на семейства иммуноглобулинов, кадгеринов, селектинов, интегринов и муцинов [40]. Примером могут служить белки подсемейства иммуноглобулинов CAM, таких как MCAM (CD146, MUC18), LICAM (CD171), ALCAM (CD166), ICAM1 (CD54) и CEACAM1 (CD66a). Содержание их в нормальных меланоцитах невелико [39]. При малигнизации экспрессия соответствующих генов постепенно возрастает, достигая максимума в метастатических клетках меланомы, что способствует повышению инвазивности и подвижности клеток меланомы и увеличению уровня метастазирования [39, 41, 42]. Предполагается, что большинство молекул клеточной адгезии определяют высокую метастатическую активность меланомы, а в не-

которых случаях они являются основными факторами образования метастазов [42]. Значительная плотность указанных рецепторов на поверхности клеток меланомы делает их привлекательной мишенью для направленной доставки трансгенов. Характерной особенностью большинства указанных молекул клеточной адгезии является их способность к интернализации, что может обеспечивать эффективное введение вектора, связанного с рецептором, внутрь клетки [43, 44].

Ассоциированный с меланомой антиген с высокой молекулярной массой. Значительная экспрессия гена, кодирующего меланома-ассоциированный антиген с высокой молекулярной массой (HMW-MAA), наблюдается только в клетках меланомы и в клеточных линиях меланомы человека, но он не выявлен в нормальных меланоцитах, клетках родинок и пигментных пятен [45]. Исследованиями последних лет показано, что HMW-MAA участвует в активации некоторых сигнальных путей, модулирующих адгезию, миграцию и инвазию клеток меланомы [45, 46]. Обнаружена способность HMW-MAA к интернализации внутрь клетки [47].

Поверхностные маркеры стволовых клеток меланомы. Большое количество экспериментальных данных свидетельствует о том, что среди клеток злокачественной меланомы имеется небольшая популяция стволовых клеток, способных к собственному воспроизведению и формированию опухоли [48–51]. Эту клеточную популяцию считают наиболее агрессивной. Предполагают, что именно стволовые клетки меланомы обеспечивают резистентность практически ко всем видам химиотерапии [50, 52]. Выявлено и охарактеризовано несколько поверхностных маркеров стволовых клеток меланомы. Один из них – мембранный маркер CD133 – обнаружен менее чем в 1 % клеток меланомы, причем эти клетки обладают большим онкогенным потенциалом [48, 49]. Другими маркерами являются Р-гликопротеины (ABCB5 и ABCG2), относящиеся к семейству MDR – АТР-зависимых транспортерных белков, обуславливающих резистентность клеток меланомы к химическим веществам [52, 53]. Уровень экспрессии гена *ABCB5* существенно выше в клетках меланомы, чем в родимых пятнах [53]. В положительных по *ABCB5* клетках значительно меньше представлены белки MHC1 и специфичес-

кие для меланомы антигены NY-ESO-1 и MAGE-A [54]. Недавно показано, что клетки, положительные по маркеру CD271, обладают наибольшим потенциалом для развития меланомы [50]. В таких клетках резко снижена экспрессия генов *TYR*, *MART1* и *MAGEC1/MAGEC2*. Этим фактом можно объяснить неудачи при терапии меланомы с использованием антител к белковым продуктам указанных генов. Однако практически в то же время опубликованы противоположные результаты, демонстрирующие наибольший онкогенный потенциал клеток, не содержащих CD271 [55].

В обзоре [51] высказано предположение о гетерогенности стволовых клеток меланомы и возможности существования клеток с разным фенотипом, несущих при определенных условиях различные маркеры. Предполагается, что возникновение метастазов может происходить за счет миграции раковых стволовых клеток в органы, где имеются подходящие условия для прикрепления таких клеток. В ряде работ наблюдали повышение уровня содержания маркеров опухолевых стволовых клеток при метастазировании [50]. Есть основания полагать, что терапия опухолей должна быть направлена в первую очередь на подавление стволовых клеток.

Использование поверхностных маркеров меланомы для направленной доставки терапевтических генов. К настоящему времени известно несколько путей применения рецепторов и поверхностных антигенов меланомы для терапии этого заболевания. Например, предложено использовать в терапии процесс интернализации в клетки токсических препаратов, конъюгированных со специфическими рецепторами меланомы. Обнадёживающие результаты получены при использовании конъюгатов гелонина с антителами к HMW-MAA [56]. Меланомные рецепторы могут служить мишенями для онколитических вирусов, в частности, вируса коксаки A21, взаимодействующего с рецептором ICAM1 [57]. Большинство рецепторов имеются и на многих нормальных клетках, поэтому необходимо выбирать рецепторы с повышенной экспрессией именно в клетках меланом. Большое значение при лечении меланом имеет разработка методов идентификации и уничтожения метастазов. На первое место выдвигаются задачи по изучению содержания в клетках меланомы и метастазов маркеров и рецеп-

торов стволовых клеток и возможности их применения в терапевтических целях. Кроме того, необходим поиск новых маркерных генов, которые можно было бы использовать для направленного воздействия на метастазы.

Промоторы, специфически активные в клетках меланомы. Специфичность к определенному типу ткани при создании генно-терапевтических конструкций обусловлена уровнем экспрессии трансгена, зависящим от регуляторных систем, в частности, энхансеров и промоторов, активных только в раковых клетках. В настоящее время наиболее изученными и используемыми для генной терапии меланомы являются промоторы генов тирозиназы и меланомной ингибирующей активности, иногда в сочетании с дистальными элементами других промоторов и/или энхансерами. Структуры промоторов *TYR* и *MIA* как человека, так и мыши хорошо исследованы и описаны [58–60]. Функциональное сравнение показало, что промотор *TYR* человека демонстрирует меньшую эффективность и специфичность экспрессии в меланоцитах человека по сравнению с промотором мыши. На активность промотора *TYR* человека большое влияние оказывает энхансер, а для проявления специфической активности гена мыши важен только сам промотор [58, 61, 62].

В ряде работ описано использование различных сочетаний промотора тирозиназы с контролирующими транскрипцию *цис*-регуляторными элементами – гетерологичными энхансерами, и установлено их влияние на специфичность экспрессии трансгена в клетках меланомы [58]. Наибольший усиливающий эффект на активность и специфичность промотора *TYR* человека оказывает присоединение нескольких энхансеров *Tur* мыши. Энхансерные последовательности человека в тех же конструкциях приводят к повышению активности репортерного гена лишь в 2–3 раза [61]. До настоящего времени ничего не известно об энхансерных элементах гена *MIA*. Показано, что в отличие от промотора гена *TYR*, активность промотора гена *MIA* человека возрастает при прогрессии меланомы [60]. В проведенном исследовании влияния энхансеров *Tur* мыши на активности промоторов *Tur* мыши и *MIA* человека выявлено, что присоединение нескольких энхансеров гена тирозиназы к промотору *MIA* значительно повышает специфическую активность по-

следнего в клетках меланомных линий. Как и в случае промотора тирозиназы, эффект от энхансеров мыши на порядок выше, чем от энхансеров тирозиназы человека [63]. Ингибирование роста меланомных клеток при использовании промоторов *MIA* с четырьмя энхансерами *Tur* мыши лишь немного уступает эффекту при действии сильного конститутивного промотора *CMV*, который при этом не обеспечивает избирательной экспрессии трансгена [64].

Приведенные данные демонстрируют, что применение различных сочетаний промоторов и энхансеров обуславливает высокую эффективность экспрессии трансгенов в клетках меланомы и может решить проблему специфичности при терапии данного заболевания [63, 64]. Особой привлекательностью обладает промотор гена *MIA*, поскольку этот ген (в отличие от гена *TYR*) экспрессируется только в клетках злокачественной меланомы, а не в других клетках меланоцитарного ряда.

Отдельно следует остановиться на структуре и свойствах промотора гена меланокортинового рецептора. Меланоцит-специфическая экспрессия *MC1R*, как и в случае *TYR* и *MIA*, активируется при связывании транскрипционного фактора MITF [65]. Для инициации меланоцит-специфической транскрипции достаточно 150 п. н., расположенных выше АТГ-кодона [66]. Минимальный промотор гена *MC1R* может быть перспективным как один из возможных кандидатов для контроля экспрессии трансгена в клетках меланомы. До настоящего времени нет данных об использовании этого промотора при создании терапевтических конструкций.

Промоторы, специфически активные во многих типах опухолевых клеток. Примерами наиболее известных TSP (tumor specific promoters) могут служить промоторы генов *TERT*, *Cox-2* и *BIRC5*. Для этих промоторов характерным является повышенная экспрессия контролируемых ими генов во многих типах опухолей, включая меланому, по сравнению с экспрессией в нормальных тканях [67–69]. Например, исследование активности трансгенов в клетках меланомных линий, где в качестве вектора использовали рекомбинантные аденовирусы, показало, что активность промотора *BIRC5* в нормальных меланоцитах оказалась значительно ниже, чем в клетках меланомы [70]. При использовании промотора *BIRC5* для контроля экспрессии гена йодид-

ного симпортера (NIS) клетки меланомной линии A375 приобретают способность поглощать радиоактивный йод-131, что приводит к их гибели, тогда как нормальные фибробласты, трансфецированные этой же конструкцией, йод не поглощают и не гибнут [71]. Таким образом, промотор *BIRC5* проявляет высокую опухолеспецифичность и имеет хорошие перспективы применения в терапии меланомы. Однако большинство TSP обладают низкой активностью по сравнению с конститутивными сильными промоторами, такими как SV40 и *CMV* [71, 72]. Среди TSP наблюдается значительная вариабельность активности, обусловленная типом раковых клеток. В частности, в различных опухолевых клеточных линиях активность промотора *BIRC5* варьирует в пределах 0,3–16 % от активности промотора *CMV*, а эффективность работы промотора TERT может различаться в 20 раз в зависимости от линии раковых клеток [72, 73].

Создание и использование химерных промоторов. Одним из путей конструирования специфических промоторов, обладающих достаточным транскрипционным потенциалом и в меру коротких, чтобы совмещаться с векторами доставки, является создание синтетических и/или двойных (химерных) промоторов. Для получения специфических промоторных модулей *de novo* используют охарактеризованные промоторы и фрагменты регуляторных последовательностей. Например, сконструированы искусственные промоторы на основе элементов промоторов генов *TYR* и α -фетопротеина (*AFP1*) человека, обладающих сильной и специфической экспрессией в клеточных линиях меланомы [74]. Для меланоцит-специфических промоторов характерно наличие консервативного М-бокса. В 5'-области промотора *AFP1* находятся специфические для клеточного цикла элемент GRE и AP1-связывающий элемент. При различных комбинациях одной или нескольких копий фрагментов промоторов *TYR* и *AFP1* – М-бокса, AP1- и GRE-элементов – получено несколько эффективных специфических промоторов и показана их селективная активность в клетках меланомной линии B16, но не в клетках линии HeLa [74]. Активность и специфичность синтетических промоторов зависит от выбранного оптимального количества регуляторных элементов. В данном случае наибольшую эффективность прояв-

ляет конструкция промотора, состоящая из трех элементов GRE, трех – AP1, а также двух М-боксов длиной около 300 п. н. [74]

Использование гибридных двойных промоторов, из которых один раковоспецифический, а другой – сильный неспецифический или же каждый из промоторов является опухолеспецифическим позволяет повысить эффективность промоторов. Примером может служить созданный одним из первых химерный промотор CMV-TERT [75]. Гибридная конструкция получена на основе промотора гена обратной транскриптазы теломеразы человека (TERT) и минимального промотора цитомегаловируса (CMV). Данный промотор обладает большей активностью, чем немодифицированный промотор TERT, при этом он сохраняет опухолеспецифичность. Недавно описано использование и других двойных опухолеспецифических промоторов [76–78]. Показана возможность применения таких конструкций для повышения эффективности экспрессии трансгенов при лечении мелкоклеточного рака легких и рака молочной железы. Указанная технология позволяет достичь высокого уровня экспрессии терапевтического гена в клетках опухоли, сохраняя при этом раковую специфичность. Кроме того, в ряде исследований продемонстрировано, что при использовании двойных промоторов можно получать более универсальные конструкции, обеспечивающие экспрессию трансгена во многих типах раковых клеток [76, 78]. В настоящее время не описано систем двойных промоторов, специфических для меланомы. Однако создание конструкций на основе меланомоспецифических промоторов, таких как промоторы генов *MIA*, *TYR* и *MC1R*, возможно, позволило бы обеспечить универсальную и высокоэффективную экспрессию трансгенов в клетках меланомы.

Использование промоторов для генной терапии меланомы. Возможны два направления использования опухолеспецифических промоторов для генной терапии. В первом случае воздействуют на мишени – специфические молекулярные компоненты, играющие критическую роль при развитии рака, во втором – осуществляют поиск возможностей полного разрушения опухоли. Гетерогенная структура опухолей делает предпочтительным второй путь развития генной терапии, обычно подразумевающий суицидную терапию [79, 80]. Метод

суицидной генной терапии основан на введении в раковую клетку гена, кодирующего не свойственный нормальной клетке фермент, способный превращать нетоксичное соединение (пролекарство) в токсин, вызывающий селективную гибель только раковых клеток [80, 81]. Наиболее известными и часто используемыми являются гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (*HSVtk*) и цитозиндезаминазы дрожжей (*FCYI*). Описаны и другие гены-убийцы [82]. Успех применения суицидных генов в значительной степени зависит от «эффекта соседства» (bystander effect) [40].

Выводы. Для успешного использования генотерапии необходимы избирательная доставка терапевтических генов в опухолевые клетки и нетоксичность таких генов для нормальных клеток. Кроме того, должны существовать системная доставка, позволяющая агентам попадать как в первичные опухоли, так и метастазы, а также возможность количественного уничтожения опухолевых клеток и метастазов [83, 84]. Рассмотренные в обзоре поверхностные маркеры клеток меланомы можно применять для доставки генно-терапевтических конструкций в опухолевые клетки. Наиболее эффективной представляется доставка конструкции за счет связывания с поверхностным клеточным рецептором, способным интернализироваться клеткой при взаимодействии с лигандом [83]. Однако, как указано выше, поверхностные маркеры не являются строго специфическими для клеток меланомы и встречаются, хотя и с меньшей плотностью, на поверхности нормальных клеток.

Более того, опухолевые клетки способны менять спектр поверхностных детерминант, чтобы избежать иммунного ответа. Поэтому для повышения специфичности доставки препаратов и снижения побочных эффектов на нормальные клетки при конструировании векторов используют промоторы и энхансеры, специфично работающие в опухолях данной ткани [3, 4]. В случае меланомы – это промоторы и энхансеры генов, вовлеченных в процесс синтеза меланина. Другим вариантом является применение более универсальных раковоспецифических промоторов, способных работать в широком спектре опухолей, но не в нормальных клетках. При создании терапевтических конструкций необходимо учитывать их пригодность для лечения метаста-

зов меланомы. Совместное использование специфических промоторов и их регуляторных элементов при создании генных конструкций и поверхностных маркеров клеток меланомы для проникновения препаратов в заданные клетки может оказаться весьма перспективным подходом для борьбы с этим смертельным заболеванием. Повысить эффективность применения трансгенов можно за счет «эффекта соседства», при котором в раковых клетках, получивших терапевтическую конструкцию, вырабатывается специфический продукт, токсичный для окружающих раковых клеток, но не токсичный для нормальных клеток. По имеющимся данным, достаточно попадания гена всего в 10 % опухолевых клеток, чтобы были уничтожены все клетки опухоли [40].

Описанные в обзоре методы находятся в стадии развития, когда определяются и отбираются наиболее подходящие регуляторные элементы и создаются конструкции на их основе. Подбираются новые векторы, для чего используют как природные вирусы, так и искусственно получаемые системы упаковки генетического материала. Можно надеяться, что в результате такого развития появится простая и эффективная система элиминации меланом и ее метастазов.

Работа поддержана Российской Президентской программой «Ведущие научные школы» (5638.2010.4), программой Президиума РАН (Физико-химическая биология), а также ФЦП ГК 16.512.12.2002 и ГК 11411.1008700.13.084.

I. V. Alekseenko^{1,2}, M. V. Zinovyeva¹, V. V. Pleshkan^{1,2}, E. D. Sverdlov^{1,2}

Gene targeting in melanoma therapy: exploiting of surface markers and specific promoters

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS 16/10, Miklukho-Maklaya, Moscow, Russian Federation, 117997

²Institute of Molecular Genetics 2, Kurchatov Sq., Moscow, Russian Federation, 123182

Summary

One of the problems of gene therapy of melanoma is effective expression of therapeutic gene in tumor cells and their metastases but not in normal cells. In this review, we will consider a two-step approach to a highly specific gene therapy. At the first step, therapeutic genes are delivered specifically to tumor cells using cell surface markers of melanoma cells as targets. At the second step, a specific expression of the therapeutic genes in tumor cells is ensured. Surface markers of melanoma cells were analyzed as potential targets for therapeutic treat-

ment. Criteria for choosing the most promising targets are proposed. The use of specific melanoma promoters allows to further increase the specificity of treatment via transcriptional control of therapeutic gene expression in melanoma cells.

Keywords: gene therapy, cell surface markers, melanoma-specific promoters, melanoma.

I. В. Алексеенко, М. В. Зиновьева, В. В. Плешкан, Е. Д. Свердлов

Адресна доставка терапевтичних генів при лікуванні меланоми: роль поверхневих маркерів і специфічних промоторів

Резюме

Однією з проблем генної терапії злоякісної меланоми є цілеспрямована експресія терапевтичного гена в пухлинних клітинах і їхніх метастазах за мінімізації її у нормальних клітинах. В огляді розглянуто двоетапний підхід до високоспецифічної терапії. На першому етапі здійснюється адресна доставка терапевтичних генів у пухлинні клітини з використанням як мішені поверхневих маркерів меланомних клітин, на другому – забезпечується специфічність експресії генів у пухлинних клітинах. Проведено аналіз поверхневих маркерів меланомних клітин з точки зору застосування їх як мішеней для терапевтичної дії. Запропоновано критерії вибору найперспективніших мішеней. Використання промоторів, активних лише в меланомних клітинах, дозволяє збільшити специфічність дії за рахунок контролю транскрипції терапевтичних генів у таких клітинах.

Ключові слова: генна терапія, поверхневі маркери, промотори, меланома.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Atallah E., Flaherty L. Treatment of metastatic malignant melanoma // *Curr. Treat. Options Oncol.*–2005.–**6**, N 3.–P. 185–193.
2. Ganesan P., Bakhshi S. Systemic therapy for melanoma // *Natl Med. J. India.*–2010.–**23**, N 1.–P. 21–27.
3. Robson T., Hirst D. G. Transcriptional targeting in cancer gene therapy // *J. Biomed. Biotechnol.*–2003.–**2003**, N 2.–P. 110–137.
4. Saukkonen K., Hemminki A. Tissue-specific promoters for cancer gene therapy // *Expert Opin. Biol. Ther.*–2004.–**4**, N 5.–P. 683–696.
5. Haass N. K., Smalley K. S. Melanoma biomarkers: current status and utility in diagnosis, prognosis, and response to therapy // *Mol. Diagn. Ther.*–2009.–**13**, N 5.–P. 283–296.
6. Agarwala S. S. Novel immunotherapies as potential therapeutic partners for traditional or targeted agents: cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 blockade in advanced melanoma // *Melanoma Res.*–2010.–**20**, N 1.–P. 1–10.
7. Boon T., van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes // *J. Exp. Med.*–1996.–**183**, N 3.–P. 725–729.
8. Vujanovic L., Butterfield L. H. Melanoma cancer vaccines and anti-tumor T cell responses // *J. Cell. Biochem.*–2007.–**102**, N 2.–P. 301–310.
9. Brichard V. G., Herman J., Van Pel A., Wildmann C., Gaugler B., Wolfel T., Boon T., Leth B. A tyrosinase nonapeptide presented by HLA-B44 is recognized on a human melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes // *Eur. J. Immunol.*–1996.–**26**, N 1.–P. 224–230.
10. Coulie P. G., Brichard V., Van Pel A., Wolfel T., Schneider J., Traversari C., Mattei S., De Plaen E., Lurquin C., Szikora J. P., Renaud J. C., Boon T. A new gene coding for a differentiation

- antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas // *J. Exp. Med.*—1994.—**180**, N 1.—P. 35–42.
11. Bakker A. B., Schreurs M. W., de Boer A. J., Kawakami Y., Rosenberg S. A., Adema G. J., Figdor C. G. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes // *J. Exp. Med.*—1994.—**179**, N 3.—P. 1005–1009.
 12. Ohsie S. J., Sarantopoulos G. P., Cochran A. J., Binder S. W. Immunohistochemical characteristics of melanoma // *J. Cutan. Pathol.*—2008.—**35**, N 5.—P. 433–444.
 13. Arenberger P., Arenbergerova M., Gkalpakiotis S., Lippert J., Stribrna J., Kremen J. Multimarker real-time reverse transcription-PCR for quantitative detection of melanoma-associated antigens: a novel possible staging method // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*—2008.—**22**, N 1.—P. 56–64.
 14. Simpson A. J., Caballero O. L., Jungbluth A., Chen Y. T., Old L. J. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer // *Nat. Rev. Cancer.*—2005.—**5**, N 8.—P. 615–625.
 15. Feng Y., Gao J., Yang M. When MAGE meets RING: insights into biological functions of MAGE proteins // *Protein Cell.*—2, N 1.—P. 7–12.
 16. Boel P., Wildmann C., Sensi M. L., Brasseur R., Renaud J. C., Coulie P., Boon T., van der Bruggen P. BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes // *Immunity.*—1995.—**2**, N 2.—P. 167–175.
 17. Rimoldi D., Rubio-Godoy V., Dutoit V., Lienard D., Salvi S., Guillaume P., Speiser D., Stockert E., Spagnoli G., Servis C., Cerottini J. C., Lejeune F., Romero P., Valmori D. Efficient simultaneous presentation of NY-ESO-1/LAGE-1 primary and non-primary open reading frame-derived CTL epitopes in melanoma // *J. Immunol.*—2000.—**165**, N 12.—P. 7253–7261.
 18. Velazquez E. F., Jungbluth A. A., Yancovitz M., Gnjatic S., Adams S., O'Neill D., Zavilevich K., Albukh T., Christos P., Mazumdar M., Pavlick A., Polsky D., Shapiro R., Berman R., Spira J., Busam K., Osman I., Bhardwaj N. Expression of the cancer/testis antigen NY-ESO-1 in primary and metastatic malignant melanoma (MM)—correlation with prognostic factors // *Cancer Immunol.*—2007.—**7**.—P. 11–17.
 19. Gure A. O., Tureci O., Sahin U., Tsang S., Scanlan M. J., Jager E., Knuth A., Pfreundschuh M., Old L. J., Chen Y. T. Ssx: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer // *Int. J. Cancer.*—1997.—**72**, N 6.—P. 965–971.
 20. Caballero O. L., Chen Y. T. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy // *Cancer Sci.*—2009.—**100**, N 11.—P. 2014–2021.
 21. Bosserhoff A. K., Echtenacher B., Hein R., Buettner R. Functional role of melanoma inhibitory activity in regulating invasion and metastasis of malignant melanoma cells *in vivo* // *Melanoma Res.*—2001.—**11**, N 4.—P. 417–421.
 22. Perez R. P., Zhang P., Bosserhoff A. K., Buettner R., Abu-Hadid M. Expression of melanoma inhibitory activity in melanoma and nonmelanoma tissue specimens // *Hum. Pathol.*—2000.—**31**, N 11.—P. 1381–1388.
 23. Godet Y., Moreau-Aubry A., Guilloux Y., Vignard V., Khammari A., Dreno B., Jotereau F., Labarriere N. MELOE-1 is a new antigen overexpressed in melanomas and involved in adoptive T cell transfer efficiency // *J. Exp. Med.*—2008.—**205**, N 11.—P. 2673–2682.
 24. Rogel A., Vignard V., Bobinet M., Labarriere N., Lang F. A long peptide from MELOE-1 contains multiple HLA class II T cell epitopes in addition to the HLA-A*0201 epitope: an attractive candidate for melanoma vaccination // *Cancer Immunol. Immunother.*—2011.—**60**, N 3.—P. 327–337.
 25. Barrow C., Browning J., MacGregor D., Davis I. D., Sturrock S., Jungbluth A. A., Cebon J. Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage // *Clin. Cancer Res.*—2006.—**12**, N 3, Pt 1.—P. 764–771.
 26. Kluger H. M., Hoyt K., Bacchiocchi A., Mayer T., Kirsch J., Kluger Y., Szol M., Ariyan S., Molinaro A., Halaban R. Plasma markers for identifying patients with metastatic melanoma // *Clin. Cancer Res.*—**17**, N 8.—P. 2417–2425.
 27. Kwong L., Chin L., Wagner S. N. Growth factors and oncogenes as targets in melanoma: lost in translation? // *Adv. Dermatol.*—2007.—**23**.—P. 99–129.
 28. O'Connell M. P., Weeraratna A. T. Hear the Wnt Ror: how melanoma cells adjust to changes in Wnt // *Pigment Cell Melanoma Res.*—2009.—**22**, N 6.—P. 724–739.
 29. Gantz I., Konda Y., Tashiro T., Shimoto Y., Miwa H., Munzert G., Watson S. J., DelValle J., Yamada T. Molecular cloning of a novel melanocortin receptor // *J. Biol. Chem.*—1993.—**268**, N 11.—P. 8246–8250.
 30. Salazar-Onfray F., Lopez M., Lundqvist A., Aguirre A., Escobar A., Serrano A., Korenblit C., Petersson M., Chhajlani V., Larsson O., Kiessling R. Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker // *Br. J. Cancer.*—2002.—**87**, N 4.—P. 414–422.
 31. Roberts D. W., Newton R. A., Beaumont K. A., Helen L. J., Sturm R. A. Quantitative analysis of MC1R gene expression in human skin cell cultures // *Pigment Cell Res.*—2006.—**19**, N 1.—P. 76–89.
 32. Lopez M. N., Pereda C., Ramirez M., Mendoza-Naranjo A., Serrano A., Ferreira A., Poblete R., Kalergis A. M., Kiessling R., Salazar-Onfray F. Melanocortin 1 receptor is expressed by uveal malignant melanoma and can be considered a new target for diagnosis and immunotherapy // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*—2007.—**48**, N 3.—P. 1219–1227.
 33. Star R. A., Rajora N., Huang J., Stock R. C., Catania A., Lipton J. M. Evidence of autocrine modulation of macrophage nitric oxide synthase by alpha-melanocyte-stimulating hormone // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—1995.—**92**, N 17.—P. 8016–8020.
 34. Li G., Schaidt H., Satyamoorthy K., Hanakawa Y., Hashimoto K., Herlyn M. Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development // *Oncogene.*—2001.—**20**, N 56.—P. 8125–8135.
 35. Christensen J. G., Burrows J., Salgia R. c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention // *Cancer Lett.*—2005.—**225**, N 1.—P. 1–26.
 36. Marquette A., Bagot M., Bensussan A., Dumaz N. Recent discoveries in the genetics of melanoma and their therapeutic implications // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*—2007.—**55**, N 6.—P. 363–372.
 37. Burgess T., Coxon A., Meyer S., Sun J., Rex K., Tsuruda T., Chen Q., Ho S. Y., Li L., Kaufman S., McDorman K., Cattley R. C., Sun J., Elliott G., Zhang K., Feng X., Jia X. C., Green L., Radinsky R., Kendall R. Fully human monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor with therapeutic potential against hepatocyte growth factor/c-Met-dependent human tumors // *Cancer Res.*—2006.—**66**, N 3.—P. 1721–1729.
 38. Naka D., Shimomura T., Yoshiyama Y., Sato M., Sato M., Ishii T., Hara H. Internalization and degradation of hepatocyte growth factor in hepatocytes with down-regulation of the receptor/c-Met // *FEBS Lett.*—1993.—**329**, N 1–2.—P. 147–152.
 39. Johnson J. P. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma // *Cancer Metastasis Rev.*—1999.—**18**, N 3.—P. 345–357.
 40. Mesnil M., Crespin S., Avanzo J. L., Zaidan-Dagli M. L. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinoge-

- nic process // *Biochim. Biophys. Acta.*—2005.—**1719**, N 1–2.—P. 125–145.
41. *van Kempen L. C., van den Oord J. J., van Muijen G. N., Weidle U. H., Bloemers H. P., Swart G. W.* Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin // *Am. J. Pathol.*—2000.—**156**, N 3.—P. 769–774.
 42. *Thies A., Berlin A., Brunner G., Schulze H. J., Moll I., Pfuller U., Wagener C., Schachner M., Altevogt P., Schumacher U.* Glycoconjugate profiling of primary melanoma and its sentinel node and distant metastases: implications for diagnosis and pathophysiology of metastases // *Cancer Lett.*—2007.—**248**, N 1.—P. 68–80.
 43. *Piazza T., Cha E., Bongarzone I., Canevari S., Bolognesi A., Polito L., Bargellesi A., Sassi F., Ferrini S., Fabbi M.* Internalization and recycling of ALCAM/CD166 detected by a fully human single-chain recombinant antibody // *J. Cell Sci.*—2005.—**118**, Pt 7.—P. 1515–1525.
 44. *Pearl R. A., Pacifico M. D., Richman P. I., Wilson G. D., Grover R.* Stratification of patients by melanoma cell adhesion molecule (MCAM) expression on the basis of risk: implications for sentinel lymph node biopsy // *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.*—2008.—**61**, N 3.—P. 265–271.
 45. *Campoli M. R., Chang C. C., Kageshita T., Wang X., McCarthy J. B., Ferrone S.* Human high molecular weight-melanoma-associated antigen (HMW-MAA): a melanoma cell surface chondroitin sulfate proteoglycan (MSCP) with biological and clinical significance // *Crit. Rev. Immunol.*—2004.—**24**, N 4.—P. 267–296.
 46. *Goto Y., Arigami T., Murali R., Scolyer R. A., Tanemura A., Takata M., Turner R. R., Nguyen L., Nguyen T., Morton D. L., Ferone S., Hoon D. S.* High molecular weight-melanoma-associated antigen as a biomarker of desmoplastic melanoma // *Pigment Cell Melanoma Res.*—2010.—**23**, N 1.—P. 137–140.
 47. *Chan M. C., Murphy R. M.* Kinetics of cellular trafficking and cytotoxicity of 9.2.27-gelonin immunotoxins targeted against the high-molecular-weight melanoma-associated antigen // *Cancer Immunol. Immunother.*—1999.—**47**, N 6.—P. 321–329.
 48. *Fang D., Nguyen T. K., Leishear K., Finko R., Kulp A. N., Hotz S., Van Belle P. A., Xu X., Elder D. E., Herlyn M.* A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas // *Cancer Res.*—2005.—**65**, N 20.—P. 9328–9337.
 49. *Schatton T., Murphy G. F., Frank N. Y., Yamaura K., Waaga-Gasser A. M., Gasser M., Zhan Q., Jordan S., Duncan L. M., Weishaupt C., Fuhlbrigge R. C., Kupper T. S., Sayegh M. H., Frank M. H.* Identification of cells initiating human melanomas // *Nature.*—2008.—**451**, N 7176.—P. 345–349.
 50. *Boiko A. D., Razorenova O. V., van de Rijn M., Swetter S. M., Johnson D. L., Ly D. P., Butler P. D., Yang G. P., Joshua B., Kaplan M. J., Longaker M. T., Weissman I. L.* Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271 // *Nature.*—2010.—**466**, N 7302.—P. 133–137.
 51. *Hoek K. S., Goding C. R.* Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma // *Pigment Cell Melanoma Res.*—2010.—**23**, N 6.—P. 746–759.
 52. *Frank N. Y., Margaryan A., Huang Y., Schatton T., Waaga-Gasser A. M., Gasser M., Sayegh M. H., Sadee W., Frank M. H.* ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma // *Cancer Res.*—2005.—**65**, N 10.—P. 4320–4333.
 53. *Monzani E., Facchetti F., Galmozzi E., Corsini E., Benetti A., Cavazzin C., Gritti A., Piccinini A., Porro D., Santinami M., Invernici G., Parati E., Alessandri G., La Porta C. A.* Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential // *Eur. J. Cancer.*—2007.—**43**, N 5.—P. 935–946.
 54. *Schatton T., Schutte U., Frank N. Y., Zhan Q., Hoerning A., Robles S. C., Zhou J., Hodi F. S., Spagnoli G. C., Murphy G. F., Frank M. H.* Modulation of T-cell activation by malignant melanoma initiating cells // *Cancer Res.*—2010.—**70**, N 2.—P. 697–708.
 55. *Held M. A., Curley D. P., Dankort D., McMahon M., Muthusamy V., Bosenberg M. W.* Characterization of melanoma cells capable of propagating tumors from a single cell // *Cancer Res.*—2010.—**70**, N 1.—P. 388–397.
 56. *Selbo P. K., Rosenblum M. G., Cheung L. H., Zhang W., Berg K.* Multi-modality therapeutics with potent anti-tumor effects: photochemical internalization enhances delivery of the fusion toxin scFvMEL/rGel // *PLoS One.*—2009.—**4**, N 8.—P. e6691.
 57. *Au G. G., Lincz L. F., Enno A., Shafren D. R.* Oncolytic Coxsackievirus A21 as a novel therapy for multiple myeloma // *Br. J. Haematol.*—2007.—**137**, N 2.—P. 133–141.
 58. *Shibata K., Muraosa Y., Tomita Y., Tagami H., Shibahara S.* Identification of a cis-acting element that enhances the pigment cell-specific expression of the human tyrosinase gene // *J. Biol. Chem.*—1992.—**267**, N 29.—P. 20584–20588.
 59. *Golob M., Buettner R., Bosserhoff A. K.* Characterization of a transcription factor binding site, specifically activating MIA transcription in melanoma // *J. Invest. Dermatol.*—2000.—**115**, N 1.—P. 42–47.
 60. *Bosserhoff A. K., Lederer M., Kaufmann M., Hein R., Stolz W., Apfel R., Bogdahn U., Buettner R.* MIA, a novel serum marker for progression of malignant melanoma // *Anticancer Res.*—1999.—**19**, N 4A.—P. 2691–2693.
 61. *Peter I., Graf C., Dummer R., Schaffner W., Greber U. F., Hemmi S.* A novel attenuated replication-competent adenovirus for melanoma therapy // *Gene Ther.*—2003.—**10**, N 7.—P. 530–539.
 62. *Lillehammer T., Tveito S., Engesaeter B. O., Fodstad O., Maehlandsmo G. M., Engebraaten O.* Melanoma-specific expression in first-generation adenoviral vectors *in vitro* and *in vivo*—use of the human tyrosinase promoter with human enhancers // *Cancer Gene Ther.*—2005.—**12**, N 11.—P. 864–872.
 63. *Rothfels H., Paschen A., Schadendorf D.* Evaluation of combined gene regulatory elements for transcriptional targeting of suicide gene expression to malignant melanoma // *Exp. Dermatol.*—2003.—**12**, N 6.—P. 799–810.
 64. *Schoensiegel F., Paschen A., Sieger S., Eskerski H., Mier W., Rothfels H., Kleinschmidt J., Schadendorf D., Haberkorn U.* MIA (melanoma inhibitory activity) promoter mediated tissue-specific suicide gene therapy of malignant melanoma // *Cancer Gene Ther.*—2004.—**11**, N 6.—P. 408–418.
 65. *Rouzaud F., Hearing V. J.* Regulatory elements of the melanocortin 1 receptor // *Peptides.*—2005.—**26**, N 10.—P. 1858–1870.
 66. *Miccadei S., Pascucci B., Picardo M., Natali P. G., Civitareale D.* Identification of the minimal melanocyte-specific promoter in the melanocortin receptor 1 gene // *J. Exp. Clin. Cancer Res.*—2008.—**27**—P. 71–79.
 67. *Denkert C., Kobel M., Berger S., Siegert A., Leclere A., Trefzer U., Hauptmann S.* Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma // *Cancer Res.*—2001.—**61**, N 1.—P. 303–308.
 68. *Robledo M. M., Bartolome R. A., Longo N., Rodriguez-Frade J. M., Mellado M., Longo I., van Muijen G. N., Sanchez-Mateos P., Teixido J.* Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells // *J. Biol. Chem.*—2001.—**276**, N 48.—P. 45098–45105.
 69. *Slater M., Scolyer R. A., Gidley-Baird A., Thompson J. F., Barden J. A.* Increased expression of apoptotic markers in melanoma // *Melanoma Res.*—2003.—**13**, N 2.—P. 137–145.
 70. *Lu B., Makhija S. K., Nettelbeck D. M., Rivera A. A., Wang M., Komarova S., Zhou F., Yamamoto M., Haisma H. J., Alvarez R.*

- D., Curiel D. T., Zhu Z. B. Evaluation of tumor-specific promoter activities in melanoma // *Gene Ther.*—2005.—**12**, N 4.—P. 330–338.
71. Huang R., Zhao Z., Ma X., Li S., Gong R., Kuang A. Targeting of tumor radioiodine therapy by expression of the sodium iodide symporter under control of the survivin promoter // *Cancer Gene Ther.*—2011.—**18**, N 2.—P. 144–152.
72. Gu J., Fang B. Telomerase promoter-driven cancer gene therapy // *Cancer Biol. Ther.*—2003.—**2**, N 4, Suppl. 1.—P. S64–70.
73. Konopka K., Spain C., Yen A., Overlid N., Gebremedhin S., Duzgunes N. Correlation between the levels of survivin and survivin promoter-driven gene expression in cancer and non-cancer cells // *Cell. Mol. Biol. Lett.*—2009.—**14**, N 1.—P. 70–89.
74. Martinelli R., De Simone V. Short and highly efficient synthetic promoters for melanoma-specific gene expression // *FEBS Lett.*—2005.—**579**, N 1.—P. 153–156.
75. Davis J. J., Wang L., Dong F., Zhang L., Guo W., Teraishi F., Xu K., Ji L., Fang B. Oncolysis and suppression of tumor growth by a GFP-expressing oncolytic adenovirus controlled by an hTERT and CMV hybrid promoter // *Cancer Gene Ther.*—2006.—**13**, N 7.—P. 720–723.
76. Poulsen T. T., Pedersen N., Juel H., Poulsen H. S. A chimeric fusion of the hASH1 and EZH2 promoters mediates high and specific reporter and suicide gene expression and cytotoxicity in small cell lung cancer cells // *Cancer Gene Ther.*—2008.—**15**, N 9.—P. 563–575.
77. Farokhimanesh S., Rahbarizadeh F., Rasaei M. J., Kamali A., Mashkani B. Hybrid promoters directed *tBid* gene expression to breast cancer cells by transcriptional targeting // *Biotechnol. Prog.*—2010.—**26**, N 2.—P. 505–511.
78. Amit D., Hochberg A. Development of targeted therapy for bladder cancer mediated by a double promoter plasmid expressing diphtheria toxin under the control of H19 and IGF2-P4 regulatory sequences // *J. Transl. Med.*—2010.—**8**.—P. 134–151.
79. Denny W. A. Prodrugs for gene-directed enzyme-prodrug therapy (suicide gene therapy) // *J. Biomed. Biotechnol.*—2003.—**2003**, N 1.—P. 48–70.
80. Sverdlov E. D. Not gene therapy, but genetic surgery – the right strategy to attack cancer // *Mol. Gen. Microbiol. Virol.*—2009.—**24**, N 3.—P. 93–113.
81. Ezzeddine Z. D., Martuza R. L., Platika D., Short M. P., Malick A., Choi B., Breakefield X. O. Selective killing of glioma cells in culture and *in vivo* by retrovirus transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene // *New Biol.*—1991.—**3**, N 6.—P. 608–614.
82. Stritzker J., Pilgrim S., Szalay A. A., Goebel W. Prodrug converting enzyme gene delivery by *L. monocytogenes* // *BMC Cancer.*—2008.—**8**, N 1.—P. 94–103.
83. Xu L., Huang C. C., Huang W., Tang W. H., Rait A., Yin Y. Z., Cruz I., Xiang L. M., Pirolo K. F., Chang E. H. Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes // *Mol. Cancer Ther.*—2002.—**1**, N 5.—P. 337–346.
84. Liu Y., Tao J., Li Y., Yang J., Yu Y., Wang M., Xu X., Huang C., Huang W., Dong J., Li L., Liu J., Shen G., Tu Y. Targeting hypoxia-inducible factor-1alpha with Tf-PEI-shRNA complex via transferrin receptor-mediated endocytosis inhibits melanoma growth // *Mol. Ther.*—2009.—**17**, N 2.—P. 269–277.

Received 10.10.11