

УДК 577.2

# Промоторы со специфической активностью в раковых клетках при генной терапии меланомы

В. В. Плешкан<sup>1,2\*</sup>, И. В. Алексеенко<sup>1,2</sup>, М. В. Зиновьева<sup>1</sup>, Т. В. Виноградова<sup>1</sup>, Е. Д. Свердлов<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10<sup>2</sup>Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, площадь Академика И.В. Курчатова, 2

E-mail: vpleshkan@gmail.com

Поступила в редакцию 01.04.2011 г.

**РЕФЕРАТ** Меланома – злокачественная опухоль, развивающаяся из пигментообразующих клеток меланоцитов, – относится к наиболее агрессивным формам рака. Использование генетических конструкций, специфически убивающих клетки меланомы, не затрагивая здоровые клетки, могло бы продлить время жизни больных и улучшить качество их жизни. Один из способов достижения избирательности действия терапевтических генов по отношению к опухолевым клеткам – использование для стимуляции транскрипции терапевтического гена промоторов, активных только в опухолевых, но не в нормальных клетках. В представленном обзоре описаны промоторы генов, экспрессирующихся преимущественно в клетках меланомы. Использование таких строго специфических к опухоли этого вида промоторов и регуляторных элементов позволяет снизить вероятность неспецифической экспрессии генов в нормальных тканях. В то же время при создании универсальных противоопухолевых средств преимущество имеют опухолеспецифические промоторы и их регуляторные элементы. В обзоре приведены примеры использования двойных промоторов, имеющих большие перспективы для генной терапии опухолей.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** меланома, генная терапия, тканеспецифические промоторы, специфическая экспрессия трансгена.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** Ad – аденовирус; CRAds (conditionally replicative adenoviruses) – условно реплицирующиеся аденовирусы; DT-A – А-цепь дифтерийного токсина; HSVtk – тимидинкиназа вируса простого герпеса; МРЛ – мелкоклеточный рак легкого; MC1R (melanocortin 1 receptor) – рецептор 1 меланокортина; MIA (melanoma inhibitory activity) – белок меланомной ингибирующей активности; MITF (microphthalmia-associated transcription factor) – фактор транскрипции, ассоциированный с микрофтальмией; TERT – обратная транскриптаза теломеразы человека; TSP (tumor specific promoter) – опухолеспецифический промотор; TSS (transcription start site) – точка начала транскрипции.

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы во всем мире, в том числе и в России, отмечается неуклонный рост заболеваемости злокачественной меланомой кожи. Злокачественная меланома относится к наиболее агрессивным опухолям, пятилетняя выживаемость больных не превышает 50%. Особенность меланомы заключается в раннем метастазировании, поэтому химио- и лучевая терапии малоэффективны при этом заболевании [1–3].

В перспективе важное место в терапии злокачественной меланомы отводится методам генотерапии, основанным на введении терапевтического гена (трансгена) в меланомные клетки больного. Терапев-

тические конструкции могут содержать гены, компенсирующие снижение экспрессии генов-супрессоров, которое приводит к развитию опухоли, или, наоборот, гены, продукты которых нейтрализуют повышенную экспрессию нежелательного гена (онкогена) [4–7]. Среди генных стратегий уничтожения раковых клеток одним из наиболее универсальных считается подход, в котором используются так называемые гены-убийцы [8–10]. При этом в опухолевую клетку вводится ген, кодирующий фермент, несвойственный нормальной клетке и способный превращать нетоксичное для здоровых клеток соединение (пролекарство) в токсин, вызывающий гибель опухолевых клеток, содержащих ген-убийцу. Таким образом, обе-

спечивается селективное уничтожение раковых клеток, в которых работает ген-убийца [11–13]. Наиболее известными и используемыми генами-убийцами служат ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSVtk) и ген цитозиндезаминазы дрожжей (FCY1). В отличие от клеточной тимидинкиназы, HSVtk обладает способностью фосфорилировать противогерпетические средства ацикловир и ганцикловир. Клетки, трансформированные геном HSVtk, погибают в присутствии этих агентов, поскольку клеточные киназы превращают фосфорилированные ацикловир и ганцикловир в трифосфаты, которые при клеточном делении включаются во вновь синтезированную ДНК и обрывают дальнейший ее синтез. При этом погибают именно делящиеся клетки, а не покоящиеся, в которых не синтезируется ДНК и не включается ганцикловир или ацикловир [14]. Ген HSVtk успешно использовали в экспериментальной терапии многих видов опухолей у животных. Ряд систем с использованием этого гена проходят клинические испытания [13, 15, 16]. Использование гена FCY1 основано на отсутствии его продукта – цитозиндезаминазы – в клетках млекопитающих и на его способности превращать нетоксичный для человека 5-фторцитозин в известный цитостатик – 5-фторурацил [17, 18]. После внедрения цитозиндезаминазы в опухолевые клетки и ее специфической экспрессии в них введение в организм больного фторцитозина приводит к его внутриклеточному превращению во фторурацил, что снижает токсический эффект фторурацила на нормальные клетки.

Специфичность вектора к ткани данного типа может задаваться либо путем его доставки именно в эту ткань, либо путем создания условий для специфической экспрессии трансгена в заданной ткани. Последний метод ввиду его простоты используется чаще. С этой целью в конструкции векторов используют промоторы и энхансеры, работающие специфично в опухолях данной ткани [19, 20]. В случае злокачественной меланомы используют промоторы и энхансеры генов, вовлеченных в биосинтез меланина. Преимуществом строго специфических к опухолям данного типа промоторов и других регуляторных элементов является обеспечение экспрессии трансгена только в опухолевых, но не в нормальных тканях. Однако недостатком таких подходов является их не-универсальность и связанное с этим неизбежное увеличение стоимости препаратов, основанных на таких промоторах. Компромиссный вариант состоит в использовании более универсальных опухолеспецифических промоторов, способных работать в широком спектре опухолей, но не в нормальных клетках. Несколькими увеличивая риск поражения нормальных тканей, такой подход считается экономически более

оправданным: одни и те же конструкции могут использоваться в терапии широкого спектра опухолей. Существует и еще одно соображение в пользу промоторов более широкого спектра действия. Оно связано с плохо изученной специфичностью экспрессии генов в метастазах данной опухоли. Нет строгой гарантии, что узкоспецифический промотор, хорошо работающий в первичной опухоли, сохранит эту способность во всех ее метастазах. Использование универсальных промоторов снижает вероятность инактивации промотора в метастазах.

В представленном обзоре описаны структура и свойства как промоторов, специфических для клеток меланомы, так и промоторов, активных в широком спектре опухолей, но, тем не менее, используемых в генной терапии меланомы.

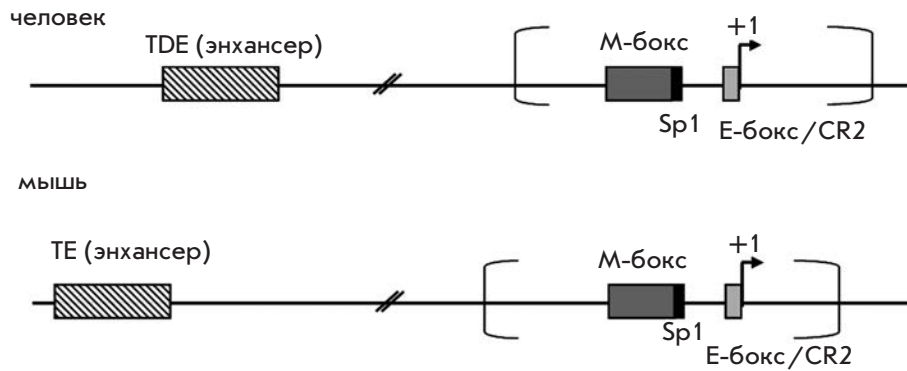
### **ПРОМОТОРЫ, СПЕЦИФИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ В МЕЛАНОЦИТАХ**

Наиболее изученные и используемые в настоящее время промоторные модули, контролирующие специфическую экспрессию терапевтического гена в клетках меланомы, – промоторы генов тирозиназы (TYR) или меланомной ингибирующей активности (MIA), иногда в сочетании с дистальными элементами других промоторов и/или энхансерами [21, 22].

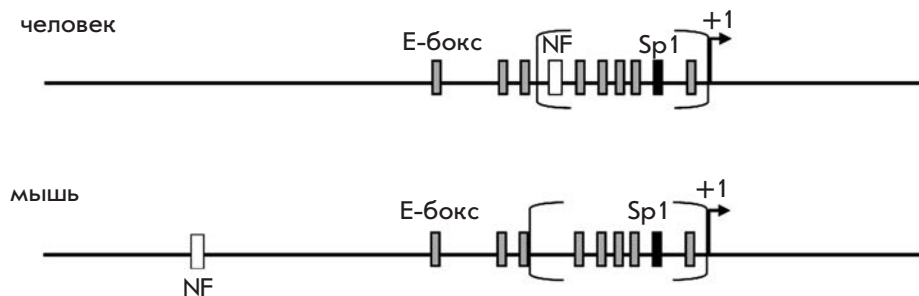
#### **Промотор гена тирозиназы**

Тирозиназа (TYR) – один из ключевых ферментов, необходимых для синтеза пигмента меланина, который образуется только в меланоцитах и пигментном эпителии сетчатки. Ген TYR экспрессируется исключительно в указанных клетках и во многих – но не во всех – меланомах человека и служит хорошим маркером дифференцировки меланоцитов [23]. Показано, что 5'-область относительно точки инициации транскрипции (transcription start site, TSS) определяет специфичность экспрессии гена тирозиназы [24, 25]. Делеционный анализ показал, что минимальный промотор гена тирозиназы человека, по-видимому, находится в координатах -209/+51 относительно TSS [26] (рис. А). Для тканеспецифической активности промотора TYR человека достаточно фрагмента 115 п.н. [24]. Этот фрагмент промотора содержит три позитивных регуляторных элемента: консервативный элемент, характерный для меланоцит-специфических промоторов – М-бокс (-104/-37 от TSS), соединенный с девятью нуклеотидами, названными CR1, Sp1-сайт (-45/-37 от TSS), и эволюционно консервативный элемент CR2, состоящий из мотива Е-бокса и перекрывающегося с ним октамерного элемента (-14/+1 от TSS) [24]. Характерно, что октамерный элемент в промоторе TYR выродился у многих млекопитающих, включая мышь

А Промотор гена тирозиназы



Б Промотор гена MIA



Схематическое изображение структуры промоторов генов тирозиназы и меланомной ингибирующей активности (MIA) человека и мыши. А – Схема промотора гена тирозиназы; Б – схема промотора MIA. Прямоугольником с косой штриховкой обозначен энхансер, белым прямоугольником – сайт связывания фактора транскрипции NF-κB; темно-серым прямоугольником – M-бокс, светло-серым – E-бокс, черным – сайт связывания фактора Sp1; круглыми скобками выделен участок, соответствующий минимальному промотору. Стрелкой указан сайт инициации транскрипции.

[27]. E-бокс содержит мотив CANNTG, связывающий факторы транскрипции семейства bHLH (basic-helix-loop-helix). Этот мотив обнаружен в промоторах гена TYR у разных видов животных, подобный мотив входит и в состав M-бокса, а также в энхансерный участок гена тирозиназы [27]. Меланоцит-специфическая экспрессия гена тирозиназы активируется при связывании продукта гена MITF с участком промотора, включающего M-бокс и начало E-бокса [24].

Промоторы генов тирозиназы человека и мыши обладают высокой степенью идентичности нуклеотидной последовательности [25]. Однако функциональное сравнение промоторов этих генов человека и мыши показало, что промотор TYR человека проявлял меньшую эффективность и специфичность экспрессии в меланоцитах, чем промотор Tyr мыши [25]. Предполагается, что в активности промотора TYR человека большую роль играет энхансер. Энхансер TYR человека, названный тирозиназным дистальным элементом (TDE), расположен в координатах -2014/-1810 и содержит E-бокс [25]. Для проявления специфической активности гена тирозиназы человека важно связывание двух факторов транскрипции MITF с E-боксами, входящими в состав как промотора, так и энхансера [21].

В 5'-области гена тирозиназы мыши также обнаружен энхансер размером 200 п.н., идентичный энхансеру TYR человека, однако, для проявления специфической активности гена мыши важен только промотор [26, 28].

**Промотор гена меланомной ингибирующей активности (MIA)**

Ген меланомной ингибирующей активности (MIA) экспрессируется преимущественно в клетках меланомы, хондросаркомы, в некоторых аденокарциномах и хондроцитах, но при этом он не активен в нормальных меланоцитах [29–31]. Белок MIA – секретлируемый ингибитор клеточного роста, который препятствует присоединению клеток меланомы к внеклеточному матриксу, тем самым способствуя инвазии и метастазированию [32–34]. В отличие от промотора гена TYR, активность промотора гена MIA человека коррелирует с прогрессией меланомы [35]. Известно, что участок длиной 1.4 т.п.н., фланкирующий 5'-участок гена MIA относительно точки инициации транскрипции, обеспечивает специфичность экспрессии этого гена только в меланомных клетках, но не в меланоцитах [36]. С помощью делеционного анализа показано, что минимальный промотор

гена *MIA* человека состоит из 212 п.н. (координаты -211/+1), мышцы – 230 п.н. (-229/+1), как это показано на рис. Б. При этом элементы промоторов этого гена человека и мышцы, ответственные за специфичность экспрессии в клетках меланомы, расположены в координатах -212/-170 и -230/-130 соответственно [36, 37]. Структура и размер промоторов *MIA* у человека и мышцы консервативны и содержат одинаковые элементы, которые могут различаться своим положением [38]. Так, оба промотора *MIA* не содержат ТАТА-боксы и/или СААТ-последовательность вблизи точки инициации транскрипции. Сайт Sp1 консервативен, он находится в положении -108/-103 в промоторе *MIA* человека и -106/-101 в промоторе мышцы. Промоторы *MIA* содержат множественные E-боксы с сайтами связывания мотивов типа «спираль-петля-спираль» (bHLH-binding motif) [36] (рис. Б). Сайт связывания фактора транскрипции NF-κB также высококонсервативен в генах человека и мышцы, но при этом имеет разные координаты (-207/-198 и -819/-811 соответственно) [36]. Делеция или мутация этого сайта приводит к значительному снижению активности промотора *MIA* человека в клетках меланомных линий [36]. Промоторы *MIA* человека и мышцы включают и такие распространенные элементы, как сайты связывания α-INF-2, C/EBP, GATA-1, GM-CSF, NF-IL6, NF-κB, TCF-2 и другие. Интересно, что активность промотора *MIA* может зависеть от фактора NF-κB, контролирующего экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла [36]. Об энхансерных элементах гена *MIA* до настоящего времени ничего не известно.

#### **Промотор гена рецептора меланокортина**

Рецептор MC1R (рецептор 1 меланокортина) экспрессируется преимущественно в меланоцитах и меланомах [39, 40]. MC1R представляет собой сопряженный с G-белком трансмембранный рецептор α-меланоцитстимулирующего гормона (α-МСГ). Высокая экспрессия гена *MC1R* характерна также для клеточных линий, происходящих из первичных и метастатических меланом [41]. Минорные количества этого рецептора встречаются и в других тканях и клетках, например в яичке, яичнике, надпочечниках, кератиноцитах, дендритных клетках и активированных моноцитах [41, 42]. Участок длиной 3.2 т.п.н., расположенный в 5'-области относительно TSS гена *MC1R*, содержит несколько Sp1-связывающих мотивов, консенсусные последовательности AP-1- и AP-2-сайтов и несколько E-боксов. Промотор гена *MC1R* не содержит ТАТА- и СААТ-последовательностей вблизи TSS [43, 44]. Меланоцит-специфическая экспрессия *MC1R*, как и гена тирозиназы, активируется при связывании фактора транскрипции MITF

с E-боксом [45–48]. Показано, что 150 п.н., расположенных выше АТГ-кодона гена *MC1R*, достаточно для инициации меланоцит-специфической транскрипции [49]. Этот минимальный промотор может рассматриваться как один из возможных кандидатов, вовлеченных в транскрипционный контроль экспрессии трансгена в клетках меланомы.

#### **Использование гетерологичных регуляторных элементов для усиления промоторов меланомы**

Использование контролирующих транскрипцию *cis*-регуляторных элементов на основе различных сочетаний промотора гена тирозиназы и дополнительных гетерологичных энхансеров для специфической экспрессии трансгена в меланоме описано в ряде работ [21, 22, 26]. Оказалось, что только в присутствии энхансерного элемента промотор *TYR* обеспечивает высокую активность и специфичность гена *TYR* человека [25]. Конструкция, состоящая из промотора *TYR* человека (209 п.н.) и двух и более последовательно присоединенных энхансеров *TYR* человека (по 200 п.н. каждый), проявляет наибольший специфический эффект при трансфекции клеток меланомных линий [26]. Димер энхансера гена тирозиназы мышцы, соединенный с промотором гена мышцы, также усиливает активность и специфичность гена мышцы [26]. Подобные конструкции использовали при создании условно реплицирующихся аденовирусов (CRAds), где промотор аденовирусного гена *E1A* заменяли специфически активным в меланомах промотором hTyр2E/P, состоящим из димера энхансера гена тирозиназы человека и корового промотора этого гена человека [50]. Полученные аденовирусы проявляли выраженное онколитическое действие на клетки меланомных линий. Цитотоксический эффект таких конструкций был сравним по уровню с действием CRAd с сильным неспецифическим цитомегаловирусным (CMV) промотором. В то же время наблюдалось сильное снижение цитотоксического эффекта аденовируса на нормальные фибробласты и кератиноциты [50]. Таким образом, использование специфического промотора в области *E1A* генома аденовируса позволило добиться селективного воздействия на клетки меланомы. Еще больший эффект на активность и специфичность промотора *TYR* человека оказывало присоединение нескольких энхансеров гена тирозиназы мышцы. Так, например, при создании онколитических аденовирусных векторов использовали промоторную конструкцию TETP, которая содержала коровый промотор *TYR* человека (tyrosinase promoter – TP) и тандем из четырех энхансеров гена тирозиназы мышцы (tyrosinase enhancer – TE) [51]. Использование этого промотора для контроля экспрессии гена-



репортера люциферазы повышало активность последнего в клетках меланомы на несколько порядков по сравнению с активностью в немеланомных клетках [51]. Замена энхансеров мыши на энхансерные последовательности человека в данных конструкциях приводила к повышению активности репортерного гена только в 2–3 раза [51]. Этот же промотор (TETP) использовали для контроля экспрессии суицидных генов, доставляемых в клетки меланомы с помощью бактерий *Listeria monocytogenes* [52]. Ранее было показано, что невирулентные штаммы листерий могут проникать в клетки солидных опухолей и обеспечивать в них репликацию доставляемых плазмид [53–55]. При бактериальной доставке плазмид, в которых промотор TETP контролирует суицидный ген пурин-нуклеозидфосфорилазы (PNP) или химерный ген цитозиндезаминазы и фосфорибозилтрансферазы (FCU1) дрожжей, трансген специфически экспрессируется в клетках меланомы B16, но не в фибробластах почки COS-1. Если используется неспецифический CMV-промотор, то суицидные гены экспрессируются в обеих линиях клеток [52].

Еще одним примером использования гетерологичных регуляторных элементов для усиления промотора *TYR* может служить промотор *Tyrex2*, содержащий коровий промотор *TYR* человека и тандем из двух энхансеров гена тирозиназы мыши [56]. При создании аденовирусного вектора этот промотор использовали для контроля работы суицидного гена *PNP*, способного превращать пролекарство 6-метилпуриндезоксирибонуклеозид в высокотоксичное пуриновое основание 6-метилпурин [57]. При обработке клеток меланомы аденовирусом *Tyrex2-PNP* и внесения пролекарства погибало около 90% клеток. В немеланомных клеточных линиях, цитотоксический эффект наблюдался только при использовании неспецифического конститутивного CMV-промотора [56].

С использованием репортерного гена хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT) и терапевтических генов *HSVtk* и *DT-A* (A-цепь дифтерийного токсина) сравнили активность промоторов генов *Tyr* мыши и *MIA* человека и их сочетаний с одним или несколькими энхансерами гена тирозиназы мыши [22]. Промоторы генов *Tyr*, *MIA* и их различные сочетания с энхансерами гена тирозиназы мыши обеспечивали специфическую экспрессию как репортерного гена CAT, так и терапевтических генов *HSVtk* и *DT-A* в клетках линий меланомы. Показано, что присоединение нескольких энхансеров гена тирозиназы к промотору *MIA* значительно повышает специфическую активность промотора *MIA* в клетках меланомных линий, причем, как и в случае промотора гена ти-

розиназы, эффект от энхансеров мыши на порядок выше, чем от энхансеров *TYR* человека. Наибольший эффект в обоих случаях наблюдался при использовании конструкций, содержащих одновременно три-четыре энхансера мыши [22].

Описан рекомбинантный аденоассоциированный вектор, в котором использован суицидный ген под промотором *MIA*, соединенным с тандемом из четырех энхансерных элементов гена тирозиназы мыши [58]. Изучены конструкции с полноразмерным промотором *MIA* (1386 п.н.) и минимальным промотором *MIA* (493 п.н.), достаточным для поддержания специфической транскрипции в клетках меланомы (рис. Б). Показано, что конструкции, содержащие только промоторы *MIA*, имели слабую транскрипционную активность, добавление тандема из четырех энхансеров гена тирозиназы мыши значительно увеличивало специфическую активность только в клетках меланомных линий [58]. Транскрипционный потенциал конструкции с энхансерами гена тирозиназы и минимальным промотором *MIA* был немного ниже, чем у конструкции с полным промотором. Эффект ингибирования роста клеток меланомы при использовании промоторов *MIA* с четырьмя энхансерами гена тирозиназы лишь немного уступает эффекту конструкции с CMV-промотором, который, однако, не обеспечивает избирательности экспрессии трансгена [58].

Приведенные результаты показывают, что использование различных сочетаний меланомоспецифических промоторов и энхансеров обеспечивает высокий уровень экспрессии трансгенов в клетках меланомы и может решать проблему специфичности при генотерапии данного заболевания [50, 52, 56]. Особый интерес представляет промотор гена *MIA*, так как этот ген, в отличие от гена *TYR*, экспрессируется только в клетках злокачественной меланомы, но не в других клетках меланоцитарного ряда. Таким образом, регуляторные элементы этого гена могут сочетать как тканеспецифические, так и опухолеспецифические свойства. Однако до настоящего времени промотор гена *MIA* мало изучен в качестве кандидата для генной терапии меланомы и практически ничего не известно о возможностях промотора гена *MC1R*.

### **ПРОМОТОРЫ, СПЕЦИФИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ В КЛЕТКАХ МЕЛАНОМЫ И ДРУГИХ ОПУХОЛЕЙ**

Другой подход, позволяющий специфически контролировать экспрессию трансгена в клетках меланомы, – использование промоторов, специфических не только для меланомы, но и других опухолевых клеток – TSP (tumor specific promoter). Примерами TSP-промоторов являются промоторы генов *TERT*, *Sox-2*, *CXCR4* и *BIRC5*, для которых характерна

сверхэкспрессия контролируемых ими генов во многих типах опухолей и отсутствие или минимальная экспрессия в нормальных тканях.

Ген *TERT* кодирует каталитическую субъединицу теломеразы человека. Этот ген активен во время эмбрионального развития, а также в опухолевых клетках (примерно в 85% случаев), тогда как в подавляющем большинстве нормальных клеток организма экспрессия *TERT* подавлена [59]. Экспрессия *TERT* повышена при поверхностно распространяющейся меланоме [60], что, как предполагается, защищает клетки меланомы от вхождения в апоптоз.

Циклооксигеназа 2 (*Coх-2*) – это индуцибельная изоформа *Coх-1*, которая, в отличие от *Coх-1*, не детектируется в большинстве нормальных тканей [61]. Экспрессия гена *Coх-2* тесно связана с канцерогенезом и прогрессией некоторых типов интестинальных неоплазий и опухолей эпителиального происхождения [62, 63]. Ген *Coх-2* экспрессируется на высоком уровне в клетках меланомы и не экспрессируется в родинках и нормальном эпителии гена [64].

Экспрессия гена *CDF-1* рецептора  $\alpha$ -хемокина – *CXCR4* – характерна для клеток рака молочной железы и практически не детектируется в нормальном эпителии молочной железы [65]. Сверхэкспрессия рецепторов *CXCR3* и *CXCR4* показана и в клетках меланомы. Предполагается, что рецепторы играют важную роль при инвазии меланомы, модулируя клеточную подвижность, пролиферацию и выживание [66].

Сурвивин, кодируемый геном *BIRC5*, относится к белкам-ингибиторам апоптоза, он играет важную роль в росте и прогрессии опухолей различного типа [67]. *BIRC5* экспрессируется в эмбриональных и фетальных тканях [68], многих типах неоплазий, включая меланому [69–71], и не детектируется в дифференцированных взрослых тканях [72].

Опухолеспецифические промоторы могут использоваться в составе описанных выше условно реплицирующихся аденовирусов (CRAds) для достижения онколитического эффекта. Так, промотор *TERT* использовали вместо промотора гена *E1A* для транскрипционного контроля репликации аденовируса. Кроме того, эта конструкция содержала ген апоптоина под сильным конститутивным CMV-промотором [73]. Апоптоин – вирусный белок, который специфическим образом индуцирует апоптоз раковых клеток [74]. Таким образом, создана система, обладающая «двойной» опухолеспецифичностью – определяемой промотором *TERT*, который активируется в опухолевых клетках, и апоптоином, избирательно воздействующим на опухолевые клетки. При инфицировании клеток вирусами Ad-*TERT*-*Aoptin* происходило подавление роста меланомных клеток линий A375

и B16, приводящее в итоге к апоптозу, в то время как нормальные эпидермальные меланоциты были защищены от подобного действия [73]. Более того, на модели метастатической меланомы мыши показано уменьшение легочных метастазов при внутриопухолевом и системном введении конструкции Ad-*TERT*-*Aoptin*. При использовании этой системы наблюдалось также увеличение выживаемости мышей [73].

Перспективность использования других опухолеспецифических промоторов в терапии меланомы оценили, определяя активность репортерного гена люциферазы, находящегося под транскрипционным контролем промоторов генов *Coх-2*, *CXCR4* и *BIRC5*. В качестве вектора использовали рекомбинантные аденовирусы, содержащие вместо *E1*-области один из TSP-промоторов и контролируемый им ген люциферазы [75]. Активность люциферазы измеряли в четырех клеточных линиях меланомы (Mel-624, A375M, SK-MEL-28 и MeWo) и в нормальных эпителиальных меланоцитах (HEM) [75]. Промотор гена *CXCR4* не обладал требуемой специфичностью – в нормальных меланоцитах его активность была даже выше, чем в клетках меланомы [75]. Ранее в меланомных клеточных линиях выявили транскрипционную активность промотора *Coх-2*, который не работал в первичных меланоцитах [76]. Однако активность промотора гена *Coх-2* сильно варьирует в зависимости от типа клеточных линий [75]. Наибольшую специфическую активность показал промотор гена сурвивина. Более того, его активность в нормальных меланоцитах была значительно ниже, чем в клетках меланомы [75]. Недавно показали, что при использовании промотора гена сурвивина для контроля экспрессии гена йодидного симпортера (NIS) клетки меланомной линии A375 приобретают способность поглощать радиоактивный йод-131, что отрицательно влияет на их выживание [77]. В то же время нормальные фибробласты зубной пульпы человека, трансфицированные этой же конструкцией, йод не поглощают и не погибают. Таким образом, из сравниваемых опухолеспецифических промоторов оптимальным для терапии меланомы был сурвивиновый промотор.

У большинства опухолеспецифических промоторов активность ниже, чем у конститутивных сильных промоторов, таких, как промоторы SV40 и CMV [75, 78, 79]. При этом активность даже сравнительно сильных опухолеспецифических промоторов значительно варьирует в зависимости от типа раковых клеток. В различных линиях опухолевых клеток активность промотора гена сурвивина варьирует от 0.3 до 16% от активности CMV-промотора [80–82], а эффективность работы промотора *TERT* может различаться до 20 раз [83].

Использование промоторов, обладающих определенной тканеспецифической активностью, позволяет решить множество проблем, связанных с неспецифической токсичностью вектора доставки. Так, аденовирусные векторы имеют существенные ограничения, обусловленные низкой эффективностью трансдукции клеток меланомы из-за малой концентрации или отсутствия на клетках меланомы коксаки-аденовирусных рецепторов (CAR), опосредующих трансдукцию клеток [84]. Введение высоких доз аденовирусов отрицательно сказывалось на организме в целом. Созданы конструкции AdRGD аденовирусов, обладающие тропизмом к  $\alpha_v$ -интегринам и более эффективно трансдуцирующие клетки меланомы, нежели стандартные аденовирусы [85]. Тем не менее, системное введение таких аденовирусных конструкций приводило к неспецифической трансдукции и гибели нормальных клеток. Решением этой проблемы стало использование специфических промоторов. Перспективными для терапии меланомы оказались аденовирусы AdRGD, содержащие суицидный ген *HSVtk* под транскрипционным контролем опухолеспецифического промотора *TERT* или специфического для меланомы промотора *Tyrex2* вместо стандартного неспецифического CMV-промотора [86]. При внутриопухолевом введении векторов AdRGD-TERT-*HSVtk* или AdRGD-Tyrex2-*HSVtk* отмечено уменьшение размеров опухоли у мышей после введения ганцикловира. Такой же эффект достигается при введении низких доз неспецифического AdRGD-CMV-*HSVtk*, однако в этом случае при повышении дозы вектора наблюдалась потеря веса у мыши и токсические повреждения печени [86]. С другой стороны, даже внутривенное введение высоких доз векторов AdRGD-TERT-*HSVtk* или AdRGD-Tyrex2-*HSVtk* не вызывает токсических повреждений печени. Таким образом, благодаря использованию специфических промоторов достигается супрессия неспецифической цитотоксичности аденовирусов в нормальных, не опухолевых клетках [86].

Для создания эффективных генно-терапевтических средств большое значение имеет размер промотора, поскольку многие векторы имеют ограниченную емкость. Показано, например, что у ретровирусных векторов, содержащих длинные промоторные модули, титр вируса зачастую снижается при увеличении размера введенного промотора [87]. Однако многие короткие промоторы либо очень слабы, либо теряют свою тканевую специфичность, поэтому возможность создания коротких и специфических промоторов, обладающих достаточным транскрипционным потенциалом, представляется важной задачей. Способом, позволяющим справиться с этими ограничениями,

может стать создание синтетических и/или двойных (химерных) промоторов.

### СОЗДАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ И ДВОЙНЫХ ПРОМОТОРОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Для создания специфических промоторных модулей *de novo* используются охарактеризованные контролирующие элементы известных промоторов. Например, созданы искусственные промоторы на основе элементов промоторов генов тирозиназы и  $\alpha$ -фетопротейна (AFP1) человека, обладающих сильной и специфической экспрессией в клеточных линиях меланомы [88]. Как отмечено ранее, промотор тирозиназы содержит M-бокс – консервативный элемент, характерный для меланоцит-специфических промоторов [89]. Этот элемент использовали в сочетании с элементами из 5'-области промотора *AFP1* – специфическим для клеточного цикла элементом GRE и AP1-связывающим элементом. При различных комбинациях одной или нескольких копий фрагментов промоторов тирозиназы и  $\alpha$ -фетопротейна – M-бокса, AP1- и GRE-элементов, получены несколько эффективных меланоцит-специфических промоторов. Эти промоторы были селективно активны в меланомной линии B16, но не в клетках линии HeLa [88]. Длина искусственных конструкций не превышала 300 п.н., наиболее эффективным был промотор, состоящий из трех GRE-, трех AP1-элементов и двух M-боксов. Установлено, что если число регуляторных элементов промотора в химерной конструкции превышает восемь единиц, то наблюдается потеря специфичности промотора [88]. По-видимому, активность синтетических промоторов зависит как от числа регуляторных элементов, так и от вектора. Оптимальное число регуляторных элементов необходимо подбирать в каждом случае. Например, в описанной выше работе Ротфелса и соавт. [22] показано, что для увеличения активности промоторов как *MIA*, так и *TYR*, достаточно присоединить четыре копии энхансера гена тирозиназы мыши.

Другой подход к конструированию специфических промоторов состоит в создании химерных или двойных промоторов.

Как отмечалось выше, большинство опухолеспецифических промоторов обладают более низкой активностью, чем конститутивные сильные промоторы, такие, как промоторы вирусов SV40 и CMV. Одним из подходов, позволяющих решить проблемы эффективности опухолеспецифических промоторов, является использование гибридных двойных промоторов: (i) один из которых опухолеспецифический, тогда как другой – сильный неспецифический; (ii) каждый промотор опухолеспецифический. Описанные двой-



ные промоторы обладают более высокой активностью в опухолях определенного типа, чем природные.

В качестве примера первой конструкции можно привести химерный промотор CMV-hTERT [90]. Химерная конструкция была получена на основе промотора гена обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT) и минимального CMV-промотора, который обладает большей активностью, чем немодифицированный промотор *hTERT*, сохраняя при этом опухолеспецифичность.

Описаны также двойные опухолеспецифические промоторы [91, 92]. С целью повышения эффективности экспрессии терапевтических генов в клетках мелкоклеточного рака легкого (МРЛ) получен химерный двойной промотор на основе промоторов генов *hASH1* и *EZH2*, имеющих высокий уровень экспрессии в клетках МРЛ. Активность двойного химерного промотора превышала активности соответствующих одиночных промоторов в 1–8 раз в зависимости от клеточной линии МРЛ [92]. В другой работе удалось достичь высокого уровня экспрессии активатора апоптоза *tBid* в клетках рака молочной железы, используя гибридный промотор, состоящий из промоторов гена сурвивина человека и гена, кодирующего гликопротеин муцин, экспрессия которого повышена в клетках опухолей молочной железы [91]. Таким образом, применение двойных промоторов позволяет обеспечить высокий уровень экспрессии терапевтического гена в опухолевых клетках, сохраняя при этом раковую специфичность. Использование двойных опухолеспецифических промоторов позволяет получать более универсальные генно-терапевтические конструкции, т.е. конструкции, обеспечивающие экспрессию терапевтического гена во многих типах раковых клеток. Например, создан вектор, несущий два фрагмента гена *DT-A* под контролем промоторов генов *IGF2-P4* и *H19* [93]. Введение такого вектора в клетки нескольких линий рака мочевого пузыря обеспечивало экспрессию гена во всех линиях, тогда как ген *DT-A* под контролем одного из промоторов – *IGF2-P4* или *H19*, проявлял активность не во всех использованных линиях опухолевых клеток.

В настоящее время не описано систем двойных промоторов, содержащих меланомоспецифические промоторы. Однако создание систем на основе меланомоспецифических промоторов таких, например, как промоторы генов *MIA* и *TYR*, возможно, позволило бы обеспечить универсальную, высокоэффективную и специфическую экспрессию терапевтического гена в клетках меланомы.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Терапия меланомы сопряжена с множеством трудностей, в числе которых высокая устойчивость меланомных клеток и раннее метастазирование, определяющее плохой прогноз. Необходимость воздействия на диссеминированные по всему организму метастатические локусы требует системного введения противомеланомных средств, что сопряжено с определенным риском воздействия на остальные клетки организма. Быстро развивающаяся генотерапия предлагает новые методики, позволяющие усилить специфичность воздействия на меланомные клетки одновременно со снижением вероятности повреждения здоровых клеток. Использование меланомоспецифических промоторов позволяет направленно воздействовать на клетки меланомы. Эти методы находятся на стадии развития и постоянно совершенствуются в поисках наиболее эффективных решений – от выбора оптимальных регуляторных элементов и создания конструкций на их основе до поиска новых векторов, в качестве которых используют как природные вирусы, так и искусственно создаваемые системы упаковки генетического материала [94, 95]. Можно надеяться, что в результате должна появиться простая и эффективная система элиминации меланом и ее метастазов.

*Работа получила финансовую поддержку Российской Президентской программы «Ведущие научные школы» (НШ – 5638.2010.4), Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и ФЦП (ГК № 16.512.12.2002).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Atallah E., Flaherty L. // *Curr. Treat. Options Oncol.* 2005. V. 6. P. 185–193.
- Bhatia S., Tykodi S.S., Thompson J.A. // *Oncology (Williston Park).* 2009. V. 23. P. 488–496.
- Ganesan P., Bakhshi S. // *Natl. Med. J. India.* 2010. V. 23. P. 21–27.
- Ko J.M., Fisher D.E. // *J. Pathol.* 2011. V. 223. P. 241–250.
- Nishizaki M., Fujiwara T., Tanida T., Hizuta A., Nishimori H., Tokino T., Nakamura Y., Bouvet M., Roth J.A., Tanaka N. // *Clin. Cancer Res.* 1999. V. 5. P. 1015–1023.
- Seth P. // *Cancer Biol. Ther.* 2005. V. 4. P. 512–517.
- Takeuchi M., Shichinohe T., Senmaru N., Miyamoto M., Fujita H., Takimoto M., Kondo S., Katoh H., Kuzumaki N. // *Gene Ther.* 2000. V. 7. P. 518–526.
- Denny W.A. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2003. V. 2003. P. 48–70.
- Dudek A.Z. // *Transl. Res.* 2010. V. 156. P. 136–146.
- Springer C.J., Niculescu-Duvaz I. // *J. Clin. Invest.* 2000. V. 105. P. 1161–1167.
- Mullen C.A., Coale M.M., Lowe R., Blaese R.M. // *Cancer Res.* 1994. V. 54. P. 1503–1506.
- Sverdlov E. // *Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2009. V. 24. P. 93–113.



13. Yamamoto S., Yamano T., Tanaka M., Hoon D.S., Takao S., Morishita R., Aikou T., Kaneda Y. // *Cancer Gene Ther.* 2003. V. 10. P. 179–186.
14. Ezzeddine Z.D., Martuza R.L., Platika D., Short M.P., Malick A., Choi B., Breakefield X.O. // *New Biol.* 1991. V. 3. P. 608–614.
15. Ambade A.V., Joshi G.V., Mulherkar R. // *Indian. J. Med. Res.* 2010. V. 132. P. 415–422.
16. Li S., Tokuyama T., Yamamoto J., Koide M., Yokota N., Namba H. // *Oncology.* 2005. V. 69. P. 503–508.
17. Erbs P., Regulier E., Kintz J., Leroy P., Poitevin Y., Exinger F., Jund R., Mehtali M. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 3813–3822.
18. Graepler F., Lemken M.L., Wybranietz W.A., Schmidt U., Smirnow I., Gross C.D., Spiegel M., Schenk A., Graf H., Lauer U.A., et al. // *World J. Gastroenterol.* 2005. V. 11. P. 6910–6919.
19. Robson T., Hirst D.G. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2003. V. 2003. P. 110–137.
20. Saukkonen K., Hemminki A. // *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2004. V. 4. P. 683–696.
21. Lillehammer T., Tveito S., Engesaeter B.O., Fodstad O., Maelandsmo G.M., Engebraaten O. // *Cancer Gene Ther.* 2005. V. 12. P. 864–872.
22. Rothfels H., Paschen A., Schadendorf D. // *Exp. Dermatol.* 2003. V. 12. P. 799–810.
23. Hearing V.J., Tsukamoto K. // *FASEB J.* 1991. V. 5. P. 2902–2909.
24. Bentley N.J., Eisen T., Goding C.R. // *Mol. Cell Biol.* 1994. V. 14. P. 7996–8006.
25. Shibata K., Muraosa Y., Tomita Y., Tagami H., Shibahara S. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 20584–20588.
26. Siders W.M., Halloran P.J., Fenton R.G. // *Cancer Res.* 1996. V. 56. P. 5638–5646.
27. Sato S., Tanaka M., Miura H., Ikeo K., Gojobori T., Takeuchi T., Yamamoto H. // *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2001. V. 6. P. 10–18.
28. Ganss R., Montoliu L., Monaghan A.P., Schutz G. // *EMBO J.* 1994. V. 13. P. 3083–3093.
29. Bosserhoff A.K., Moser M., Hein R., Landthaler M., Buettner R. // *J. Pathol.* 1999. V. 187. P. 446–454.
30. Dietz U.H., Sandell L.J. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 3311–3316.
31. Perez R.P., Zhang P., Bosserhoff A.K., Buettner R., Abu-Hadid M. // *Hum Pathol.* 2000. V. 31. P. 1381–1388.
32. Blesch A., Bosserhoff A.K., Apfel R., Behl C., Hessdoerfer B., Schmitt A., Jachimczak P., Lottspeich F., Buettner R., Bogdahn U. // *Cancer Res.* 1994. V. 54. P. 5695–5701.
33. Bosserhoff A.K., Echtenacher B., Hein R., Buettner R. // *Melanoma Res.* 2001. V. 11. P. 417–421.
34. Winklmeier A., Contreras-Shannon V., Arndt S., Melle C., Bosserhoff A.K. // *Cancer Sci.* 2009. V. 100. P. 261–268.
35. Bosserhoff A.K., Kaufmann M., Kaluza B., Bartke I., Zirngibl H., Hein R., Stolz W., Buettner R. // *Cancer Res.* 1997. V. 57. P. 3149–3153.
36. Bosserhoff A.K., Hein R., Bogdahn U., Buettner R. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 490–495.
37. Golob M., Buettner R., Bosserhoff A.K. // *J. Invest. Dermatol.* 2000. V. 115. P. 42–47.
38. Bosserhoff A.K., Kondo S., Moser M., Dietz U.H., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Buettner R., Sandell L.J. // *Dev. Dyn.* 1997. V. 208. P. 516–525.
39. Roberts D.W., Newton R.A., Beaumont K.A., Helen Leonard J., Sturm R.A. // *Pigment Cell Res.* 2006. V. 19. P. 76–89.
40. Schwahn D.J., Xu W., Herrin A.B., Bales E.S., Medrano E.E. // *Pigment Cell Res.* 2001. V. 14. P. 32–39.
41. Salazar-Onfray F., Lopez M., Lundqvist A., Aguirre A., Escobar A., Serrano A., Korenblit C., Petersson M., Chhajlani V., Larsson O., et al. // *Br. J. Cancer.* 2002. V. 87. P. 414–422.
42. Thornwall M., Dimitriou A., Xu X., Larsson E., Chhajlani V. // *Horm. Res.* 1997. V. 48. P. 215–218.
43. Moro O., Ideta R., Ifuku O. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. V. 262. P. 452–460.
44. Rouzaud F., Hearing V.J. // *Peptides.* 2005. V. 26. P. 1858–1870.
45. Aoki H., Moro O. // *Life Sci.* 2002. V. 71. P. 2171–2179.
46. Smith A.G., Box N.F., Marks L.H., Chen W., Smit D.J., Wyeth J.R., Huttley G.A., Eastal S., Sturm R.A. // *Gene.* 2001. V. 281. P. 81–94.
47. Tachibana M. // *Pigment Cell Res.* 2000. V. 13. P. 230–240.
48. Yasumoto K., Yokoyama K., Takahashi K., Tomita Y., Shibahara S. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 503–509.
49. Miccadei S., Pascucci B., Picardo M., Natali P.G., Civitareale D. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2008. V. 27. P. 71.
50. Nettelbeck D.M., Rivera A.A., Balague C., Alemany R., Curiel D.T. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. P. 4663–4670.
51. Peter I., Graf C., Dummer R., Schaffner W., Greber U.F., Hemmi S. // *Gene Ther.* 2003. V. 10. P. 530–539.
52. Stritzker J., Pilgrim S., Szalay A.A., Goebel W. // *BMC Cancer.* 2008. V. 8. P. 94.
53. Huang B., Zhao J., Shen S., Li H., He K.L., Shen G.X., Mayer L., Unkeless J., Li D., Yuan Y., et al. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. P. 4346–4352.
54. Riedel C.U., Monk I.R., Casey P.G., Morrissey D., O'Sullivan G.C., Tangney M., Hill C., Gahan C.G. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 3091–3094.
55. Yu Y.A., Shabahang S., Timiryasova T.M., Zhang Q., Beltz R., Gentshev I., Goebel W., Szalay A.A. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 313–320.
56. McCart J.A., Wang Z.H., Xu H., Hu Y., Park B., Alexander H.R., Bartlett D.L. // *Mol. Ther.* 2002. V. 6. P. 471–480.
57. Sorscher E.J., Peng S., Bebok Z., Allan P.W., Bennett L.L., Jr., Parker W.B. // *Gene Ther.* 1994. V. 1. P. 233–238.
58. Schoensiegel F., Paschen A., Sieger S., Eskerski H., Mier W., Rothfels H., Kleinschmidt J., Schadendorf D., Haberkorn U. // *Cancer Gene Ther.* 2004. V. 11. P. 408–418.
59. Cong Y.S., Wright W.E., Shay J.W. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002. V. 66. P. 407–425, table of contents.
60. Slater M., Scolyer R.A., Gidley-Baird A., Thompson J.F., Barden J.A. // *Melanoma Res.* 2003. V. 13. P. 137–145.
61. Dubois R.N., Abramson S.B., Crofford L., Gupta R.A., Simon L.S., van De Putte L.B., Lipsky P.E. // *FASEB J.* 1998. V. 12. P. 1063–1073.
62. Ristimaki A., Honkanen N., Jankala H., Sipponen P., Harkonen M. // *Cancer Res.* 1997. V. 57. P. 1276–1280.
63. Williams C., Shattuck-Brandt R.L., DuBois R.N. // *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* 1999. V. 889. P. 72–83.
64. Denkert C., Kobel M., Berger S., Siegert A., Leclere A., Trefzer U., Hauptmann S. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. P. 303–308.
65. Muller A., Homey B., Soto H., Ge N., Catron D., Buchanan M.E., McClanahan T., Murphy E., Yuan W., Wagner S.N., et al. // *Nature.* 2001. V. 410. P. 50–56.
66. Robledo M.M., Bartolome R.A., Longo N., Rodriguez-Frade J.M., Mellado M., Longo I., van Muijen G.N., Sanchez-Mateos P., Teixeira J. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 45098–45105.
67. Altieri D.C. // *Prog. Cell Cycle Res.* 2003. V. 5. P. 447–452.
68. Adida C., Crotty P.L., McGrath J., Berrebi D., Diebold J., Altieri D.C. // *Am. J. Pathol.* 1998. V. 152. P. 43–49.
69. Chiodini C., Cesinaro A.M., Ottani D., Fantini F., Giannetti A., Trentini G.P., Pincelli C. // *J. Invest. Dermatol.* 1999. V. 113. P. 415–418.
70. Sarela A.I., Verbeke C.S., Ramsdale J., Davies C.L., Markham A.F., Guillou P.J. // *Br. J. Cancer.* 2002. V. 86. P. 886–892.

71. Tanaka K., Iwamoto S., Gon G., Nohara T., Iwamoto M., Tanigawa N. // *Clin. Cancer Res.* 2000. V. 6. P. 127–134.
72. Bao R., Connolly D.C., Murphy M., Green J., Weinstein J.K., Pisarcik D.A., Hamilton T.C. // *J. Natl. Cancer Inst.* 2002. V. 94. P. 522–528.
73. Li X., Liu Y., Wen Z., Li C., Lu H., Tian M., Jin K., Sun L., Gao P., Yang E., et al. // *Mol. Cancer.* 2010. V. 9. P. 10.
74. Rohn J.L., Noteborn M.H. // *Apoptosis.* 2004. V. 9. P. 315–322.
75. 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., et al. // *Gene Ther.* 2005. V. 12. P. 330–338.
76. Nettelbeck D.M., Rivera A.A., Davydova J., Dieckmann D., Yamamoto M., Curiel D.T. // *Melanoma Res.* 2003. V. 13. P. 287–292.
77. Huang R., Zhao Z., Ma X., Li S., Gong R., Kuang A. // *Cancer Gene Ther.* 2010. V. 18. P. 144–152.
78. Rein D.T., Breidenbach M., Nettelbeck D.M., Kawakami Y., Siegal G.P., Huh W.K., Wang M., Hemminki A., Bauerschmitz G.J., Yamamoto M., et al. // *J. Gene Med.* 2004. V. 6. P. 1281–1289.
79. van Houdt W.J., Haviv Y.S., Lu B., Wang M., Rivera A.A., Ulasov I.V., Lamfers M.L., Rein D., Lesniak M.S., Siegal G.P., et al. // *J. Neurosurg.* 2006. V. 104. P. 583–592.
80. Chen J.S., Liu J.C., Shen L., Rau K.M., Kuo H.P., Li Y.M., Shi D., Lee Y.C., Chang K.J., Hung M.C. // *Cancer Gene Ther.* 2004. V. 11. P. 740–747.
81. Konopka K., Spain C., Yen A., Overlid N., Gebremedhin S., Duzgunes N. // *Cell Mol. Biol. Lett.* 2009. V. 14. P. 70–89.
82. Zhu Z.B., Makhija S.K., Lu B., Wang M., Kaliberova L., Liu B., Rivera A.A., Nettelbeck D.M., Mahasreshti P.J., Leath C.A., et al. // *Cancer Gene Ther.* 2004. V. 11. P. 256–262.
83. Gu J., Fang B. // *Cancer Biol Ther.* 2003. V. 2. P. S64–70.
84. Hemmi S., Geertsen R., Mezzacasa A., Peter I., Dummer R. // *Hum. Gene Ther.* 1998. V. 9. P. 2363–2373.
85. Okada Y., Okada N., Nakagawa S., Mizuguchi H., Kanehira M., Nishino N., Takahashi K., Mizuno N., Hayakawa T., Mayumi T. // *Cancer Lett.* 2002. V. 177. P. 57–63.
86. Okada Y., Okada N., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T. // *Cancer Gene Ther.* 2005. V. 12. P. 608–616.
87. Diaz R.M., Eisen T., Hart I.R., Vile R.G. // *J. Virol.* 1998. V. 72. P. 789–795.
88. Martinelli R., De Simone V. // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. P. 153–156.
89. Lowings P., Yavuzer U., Goding C.R. // *Mol. Cell Biol.* 1992. V. 12. P. 3653–3662.
90. Davis J.J., Wang L., Dong F., Zhang L., Guo W., Teraishi F., Xu K., Ji L., Fang B. // *Cancer Gene Ther.* 2006. V. 13. P. 720–723.
91. Farokhimanesh S., Rahbarizadeh F., Rasaei M.J., Kamali A., Mashkani B. // *Biotechnol. Prog.* 2010. V. 26. P. 505–511.
92. Poulsen T.T., Pedersen N., Juel H., Poulsen H.S. // *Cancer Gene Ther.* 2008. V. 15. P. 563–575.
93. Amit D., Hochberg A. // *J. Transl. Med.* 2010. V. 8. P. 134.
94. Fernandez C.A., Rice K.G. // *Mol. Pharm.* 2009. V. 6. P. 1277–1289.
95. Yao H., Ng S.S., Tucker W.O., Tsang Y.K., Man K., Wang X.M., Chow B.K., Kung H.F., Tang G.P., Lin M.C. // *Biomaterials.* 2009. V. 30. P. 5793–5803.