

МЕЛАНОМА: ПОВЕРХНОСТНЫЕ МАРКЕРЫ КАК ПЕРВЫЙ “ПОРТ” АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ГЕНОВ ПРИ МНОГОУРОВНЕВОЙ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

© 2011 г. В. В. Плешкан^{1,2}, М. В. Зиновьева^{1*}, Е. Д. Свердлов^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997

²Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, 123182

Поступила в редакцию 06.10.2010 г.

Принята к печати 12.11.2010 г.

Меланома — одна из наиболее злокачественных опухолей, метастазирующая лимфогенным и гематогенным путем. Устойчивость клеток меланомы ко многим видам химиотерапии приводит к высокой смертности от этого заболевания. Большие надежды возлагаются на генно-терапевтические подходы к лечению меланомы. В настоящее время одной из главных проблем на пути эффективного использования терапевтических средств постгеномной генерации является то, что нет оптимальных методов доставки чужеродного генетического материала в клетки-мишени пациента. В этой связи, поверхностные специфические маркеры клеток меланомы могут рассматриваться как перспективные мишени для терапевтического воздействия. В данном обзоре описаны известные в настоящее время рецепторы, специфичные для клеток меланомы, ее стволовые клетки, приводятся данные об антигенах меланомы, презентруемых на поверхности клеток белками главного комплекса гистосовместимости. Способность к интернализации поверхностных белков может сыграть значительную роль при разработке методов направленной доставки генно-терапевтических препаратов. В заключение рассматривается концепция многоуровневой генной терапии и определяется место, которое в ней могут занимать поверхностные детерминанты как мишени доставки генно-терапевтических систем к опухоли.

Ключевые слова: меланома, поверхностные антигены, рецепторы, направленная доставка, генотерапия.

MELANOMA: SURFACE MARKERS AS THE FIRST POINT OF TARGETED DELIVERY OF THERAPEUTIC GENES IN MULTILEVEL GENE THERAPY by V. V. Pleshkan^{1, 2}, M. V. Zinovyeva^{1*}, E. D. Sverdlov^{1, 2} (Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia *e-mail: mzinov@ibch.ru; ²Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123182 Russia). Melanoma is one of the most malignant tumors, aggressively metastasizing by lymphatic and hematogenous routes. Due to the resistance of melanoma cells to many types of chemotherapy, this disease causes high mortality rate. High hopes are pinned on gene therapeutic approaches to melanoma treatment. At present, one of the main problems of the efficient use of the post-genomic generation therapeutic means is the lack of optimal techniques of delivery of foreign genetic material to the patient's target cells. Surface specific markers of melanoma cells can be considered as promising therapeutic targets. This review describes currently known melanoma specific receptors and its stem cells, as well as contains data on melanoma antigens presented on the cell surface by major histocompatibility complex proteins. The ability of surface proteins to internalize might be successfully used for the development of methods of targeted delivery of gene therapeutic constructs. In conclusion, a concept of multilevel gene therapy and the possible role therein of surface determinants as targets of gene systems delivery to the tumor are discussed.

Keywords: melanoma, surface antigens, receptors, targeted delivery, gene therapy.

Принятые сокращения: ЦТЛ — цитотоксические Т-лимфоциты; ГКГ — главный комплекс гистосовместимости; HLA — человеческие лейкоцитарные антигены, молекулы главного комплекса гистосовместимости; ИФН-γ — гамма-интерферон человека; ФНО-α — фактор некроза опухоли альфа; ИЛ — интерлейкин; MC1R — рецептор меланокортина 1; HGF — ростовой фактор гепатоцитов; CVA21 — вирус Коксаки А21; HMW-MAA — меланома-ассоциированный антиген с высоким молекулярным весом; α-МСГ — меланоцит-стимулирующий гормон; GCV — ганцикловир.

* Эл. почта: mzinov@ibch.ru

Злокачественная меланома, одна из самых агрессивных опухолей, отличается способностью к раннему метастазированию и высокой смертностью пациентов. Развитие метастазов в лимфатической системе наблюдается в 70% случаев меланомы, обычно поражаются печень, легкие, мозг и костная ткань [1]. Именно метастазирование на ранних стадиях обуславливает высокую смертность и неэффективность терапии данного заболевания. Основное средство борьбы с меланомой — хирургическая резекция. Классические подходы, такие как химиотерапия и радиотерапия, в случае меланомы дают менее выраженные эффекты, чем в случае других опухолей, поскольку метастазы меланомы часто резистентны к этой терапии [2–4]. Поэтому большие надежды возлагаются на подходы к лечению, ставшие возможными в постгеномную эпоху, такие как противораковые вакцины (см. обзоры [5, 6]) и генная терапия [7]. Последняя основана на том, что специфическая генетическая информация тем или иным способом вносится в малигнизированные клетки и активируется в них [7]. Для доставки генетической информации необходим специальный “переносчик”, вектор, специфичность доставки которого к опухолевым клеткам позволяет увеличить терапевтический эффект при минимальном воздействии на здоровые клетки организма. Специфичность достигается путем присоединения к вектору молекул, способных взаимодействовать со специфическими поверхностными маркерами меланомы, которые отсутствуют у нормальных клеток (или где их концентрация меньше). Поэтому правильный выбор поверхностной мишени, обеспечивающей адресную доставку терапевтической системы, является одним из важнейших составных частей успеха генно-терапевтического воздействия.

Поверхностные маркеры клеток меланомы — предмет многолетних исследований, многие из них широко известны, но, в то же время, постоянно обнаруживаются новые антигены и рецепторы [8, 9]. Описано множество антигенов меланомы, их интенсивно изучают в попытках использовать для диагностики и для создания противораковых вакцин. Рецепторы, специфичные для клеток меланомы, могут служить мишенями для взаимодействия с recombinantными векторами. Уникальность экспрессии и/или высокая плотность распределения рецептора на клеточной мембране опухоли (по сравнению с другими клетками) определяют специфичность взаимодействия и внедрения доставляемого генетического материала в клетки меланомы.

В данном обзоре рассматриваются проблемы, связанные с выбором мишеней для специфической доставки генетического материала в клетки меланомы. Поэтому особое внимание уделяется дифференциальным детерминантам, присутствующим или имеющим повышенную концентрацию на поверхности клеток меланомы, но практически отсутствующим на нормальных, не опухолевых клетках. Мы допускаем возможность того, что мишень мо-

жет экспрессироваться также на поверхности клеток опухолей других типов. В этом случае вектор будет направлен и на такие опухоли, если они развиваются в организме одновременно с меланомой. Описаны некоторые из известных поверхностных антигенов, под которыми подразумеваются фрагменты белков, презентруемых на поверхность клеток молекулами главного комплекса гистосовместимости типа I (ГКГ I), а также рецепторы меланомы и молекулы клеточной адгезии. Рассматривается возможность их использования для специфического распознавания малигнизированных клеток при доставке генетического материала для лечения данного заболевания. Особое внимание уделяется поверхностным антигенам недавно выявленных стволовых клеток меланомы, которые перспективны в качестве мишеней противораковой терапии. Рассматриваются поверхностные антигены метастазов — основной причины смертности при меланоме, а также возможность их использования для специфического распознавания малигнизированных клеток при доставке генетического материала.

АНТИГЕНЫ, ОПРЕДЕЛЯЕМЫЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИМИ Т-ЛИМФОЦИТАМИ

Одним из достижений иммунологии опухолей в последнее десятилетие явились успехи в изучении механизмов распознавания антигенов и разрушения опухолевых клеток. Конечными эффекторными клетками, которые опосредуют иммунную активность против опухолей, служат цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), узнающие (посредством специфических Т-клеточных рецепторов) пептиды, связанные на поверхности клеток с белками ГКГ I. Опухолевые антигены группируют в категории по кодирующим их генам. Некоторые из них возникают *de novo* благодаря мутациям, специфичным для опухолевых клеток и уникальным для данного типа опухоли или даже для индивидуальных раковых клеток. Другие антигены происходят от немутантных генов, которые не экспрессируются в нормальных клетках, но экспрессируются в опухолевых. В случае меланомы это часто продукты генов, которые нормально экспрессируются в фетальных и тестикулярных тканях. Наконец, третьи антигены происходят от нормальных генов, которые специфичны для данной клеточной линии в процессе развития. Такие антигены называют дифференцировочными [10]. Они могут стать мишенями для антител, обладающих той же специфичностью, что и Т-клеточный рецептор, который узнает данный антиген.

Клетки меланомы также экспрессируют различные антигены, которые узнаются аутологичными и специфичными ЦТЛ при презентации молекулами ГКГ I [11]. Некоторые из этих антигенов представляют собой хорошие мишени для иммунотерапии, и на их основе получен ряд противораковых вакцин [5].

Антигены, презентированные на поверхности клеток меланомы, могут быть подразделены на четыре класса [5].

1. Антигены дифференцировки меланоцитов, которые обнаруживаются только в клетках меланомы и в нормальных меланоцитах. К этому классу относятся продукты экспрессии гена тирозиназы (*TYR*), а также генов *Melan-A/MART-1 (MLANA)*, *gp100/Pmel17 (SILV)*, *TRP-1(gp75)* и *TRP-2*.

2. Тестикулярно-опухолевые антигены, экспрессируемые в опухолях различного гистологического происхождения и не активные во всех тканях взрослого организма, кроме семенников и плаценты. Представители этой группы кодируются генами семейств *MAGE*, *BAGE* и *GAGE*, генами *CTAG1B (NY-ESO-1)* и *SSX2*.

3. Антигены, представляющие собой пептидные фрагменты или белки, содержание которых сильно повышено в различных типах опухолей, они кодируются такими генами как *BIRC5*, *MUC1/2*, *AFP* и *EphA2*.

4. Опухоль-специфичные антигены, возникающие вследствие точечных мутаций повсеместно распространенных генов, таких как *p53*, *Ras*, *CDK4*, *TPR-2/INT2*, *MUM1*, *CTNNB1* (β -катенин), *CDKN2B (INK4a)*.

При изучении меланомы наиболее интересными представляются первые две группы антигенов, синтез которых высоко специфичен для меланомных клеток (таблица).

Антигены дифференцировки меланоцитов

Оказалось, что вырабатываются ЦТЛ как к дифференцировочным антигенам нормальных меланоцитов, так и меланомных клеток. Как сказано выше, таких антигенов несколько: тирозиназа (*TYR*), *MLANA*, *SILV*, *TRP-1* и *TRP-2* [12–17]. Большинство из них на поверхности клеток презентированы молекулами ГКП, а именно – *HLA-A2*, однако, встречаются разные комбинации пептидов и других молекул ГКГ [16–20]. Так, например, один из пептидов тирозиназы презентруется молекулами *HLA-DR4* [21].

Тирозиназа, связанный с мембраной гликопротеин, – ключевой фермент биосинтеза меланина, катализирующий превращение тирозина в дигидроксифенилаланин и последнего в допахинон [22]. Тирозиназа экспрессируется исключительно клетками, происходящими из нейроэктодермы, такими как меланоциты, меланомные клетки и клетки глии; она может служить специфическим маркером метастатических клеток меланомы, включая клетки, циркулирующие в крови [23]. Два других представителя тирозиназоподобных белков – *TRP-1* и *TRP-2* – имеют сходный профиль экспрессии [24].

Другой антиген меланомы – *MLANA (Melan-A/MART-1)* – состоит из 118 а.о. и узнается аутологичными и аллогенными инфильтрирующими опу-

холь лимфоцитами. Транскрипция гена *MLANA* наблюдается в меланоцитах, уровень экспрессии повышен в клетках родимых и пигментных пятен [25]. Содержание белка *MLANA* в клетках меланомы различно у разных пациентов, а также в метастазах, и сильно зависит от места возникновения опухоли [26]. Четких данных об изменении экспрессии гена *MLANA* при опухолевой прогрессии нет.

Белок *SILV (gp100/PMEL17)* – гомолог белка гена *silver* мыши, нарушение функционирования которого приводит к возникновению характерной пигментации [27]. Точная функция *SILV* неизвестна; показано, что он локализован в мембранах меланосом и играет важную роль в структурировании меланосом и в морфогенезе премеланосом, а также в биосинтезе интермедиата меланина – 5,6-дигидроксииндол-2-карбоксикислоты [28, 29]. Как и в случае тирозиназы и *MLANA*, *SILV* синтезируется только в меланоцитах, клетках и метастазах меланомы.

Антигены данного класса имеют ключевое значение в развитии меланоцитов. Чувствительность выявления всех этих белков при иммуногистохимическом окрашивании клеток меланом очень высока, но сходная картина наблюдается при окрашивании клеток в пигментных и родимых пятнах, что не позволяет различить онкогенные клетки [30]. Тем не менее, данные белки могут служить хорошими диагностическими маркерами при определении клеток меланомы в крови и при метастазировании [1].

Отличительная черта всех описанных антигенов – их узкая тканеспецифичность. С одной стороны, их содержание в меланоцитах и меланомных клетках практически одинаково, и это затрудняет их использование для направленной терапии меланом. Но, с другой стороны, специфичность воздействия на клетки меланомы может быть достигнута за счет использования промоторов, специфически активирующихся только в раковых клетках. Создание конструкций, нацеленных на клетки меланомно-меланоцитарного ряда, в сочетании со специфичным для опухоли промотором могут способствовать селективному уничтожению клеток меланомы, в том числе, предотвращать распространение метастазов по всему организму.

Тестикулярно-опухолевые антигены

Тестикулярно-опухолевые антигены специфичны для эмбриональных клеток, обычно их нет в тканях взрослого организма, за исключением семенников и плаценты [31]. Однако эти гены экспрессируются в опухолях разного гистологического происхождения, таких как меланома, карцинома легкого, саркома, карцинома мочевого пузыря, хотя их очень редко находят в опухолях мозга, карциноме почки и при лейкозе [31–34]. К специфичным для раковых клеток (в том числе и меланомы) тестикулярно-опухолевым антигенам относят три семейства экспрессирующих их генов – *MAGE*, *BAGE*

Тканеспецифичность поверхностных маркеров меланомы

Поверхностные маркеры	Экспрессия маркеров			
	нормальные клетки кожи, включая родимые и пигментные пятна	клетки меланомы	метастазы меланомы	другие типы клеток*
<i>Антигены дифференцировки меланоцитов**</i>				
TYR	+	+	+	—
MLANA	+	+	+	—
SILV	+	+	+	—
TRP-1	+	+	+	—
TRP-2	+	+	+	—
<i>Антигены, специфичные только для меланомных клеток**</i>				
MIA	—	+	+	Хондроциты, хондросаркома
MELOE-1/2	—	+	+	—
<i>Тестикулярно-опухолевые антигены**</i>				
MAGE1/3	—	+	↑	Эмбриональные клетки, клетки семенников, плаценты, разные формы рака
BAGE	—	+	+	
GAGE1/2	—	+	+	
NY-ESO-1	—	+	↑	
SSX2	—	+	+	
<i>Интернализуемые рецепторы клеток эктодермального происхождения</i>				
MC1R	+	+	+	Незначительно в семенниках, яичнике, надпочечниках, кератиноцитах, дендритах и активированных моноцитах
c-Met	↓	+	↑	Практически во всех типах клеток и опухолях
<i>Молекулы клеточной адгезии</i>				
L1CAM (CD171)	—	+	↑	Нейроны, Швановские клетки, почечные канальца, лимфоциты. Повышенная экспрессия при некоторых типах рака
MCAM (CD146)	↓	+	↑	Клетки эндотелия. Некоторые типы рака
ALCAM (CD166)	↓	+***	↑	
ICAM1 (CD54)	↓	+	↑	Эндотелиальные клетки, клетки иммунной системы. Изменение экспрессии при многих типах рака
CEACAM1 (CD66a)	↓	+	+	Во многих нормальных клетках, экспрессия изменяется при многих типах рака
<i>Меланома-ассоциированный антиген с высоким молекулярным весом</i>				
HMW-MAA	—	+	+	—
<i>Поверхностные маркеры стволовых клеток меланомы</i>				
CD133 (PROM1)	—	+	↑	Разные типы стволовых клеток, включая опухолевые
CD271 (NGFR)	—	+	↑	Мезенхимальные стволовые клетки
ABC5	—	+	↑	
ABC2	—	+	+	

* Экспрессия в тканях, кроме нормальных клеток кожи, родимых и пигментных пятен и клеток меланомы.

** Антигены презентированы на поверхности клеток молекулами главного комплекса гистосовместимости I класса.

*** Экспрессия ALCAM повышена только в случае метастатической меланомы и не меняется при других типах меланом; (+) — детектируется экспрессия; (—) — экспрессия не обнаружена; ↓/↑ — экспрессия понижена или повышена по сравнению с первичными меланомами.

и *GAGE*, которые располагаются на X-хромосоме человека. До настоящего времени функции этих антигенов изучены недостаточно. Обнаружено шесть антигенов, кодируемых последовательностями генов *MAGE1* (два антигена), *MAGE3*, *BAGE*, *GAGE1*, *GAGE2* [32–34]. Все эти антигены хорошо охарактеризованы по структуре презентируемых пептидов и презентирующих молекул. Более 60% меланом презентируют как минимум один из указанных антигенов [11]. Так, доля меланом, экспрессирующих гены *BAGE* [32], составляет 22%, а гены *GAGE-1* и *GAGE-2* – 24% [33]. Экспрессия этих генов происходит, по-видимому, только на ранних стадиях сперматогенеза [35]. Это наблюдение подтверждено при гибридизации *in situ* гомолога гена *MAGE* мыши [36]. Поскольку зародышевые клетки не экспрессируют классических молекул ГКП, то антиген не будет презентирован на таких клетках [37]. Антигены *MAGE1* и *MAGE4* встречаются в первичных опухолях реже (20 и 9% соответственно), для них характерно увеличение экспрессии в отдаленных метастазах (51 и 44% соответственно) [38]. Кроме того, появление белков *MAGE1* и *MAGE4* характеризует плохой прогноз развития заболевания [39].

Ген *CTAG1B (NY-ESO-1)* и гомологичный ген *LAGE-1* представляют другую группу тестикулярно-опухолевых антигенов. Каждый из этих генов имеет по две альтернативные рамки считывания, все четыре белковых продукта презентированы на мембране и имеют сходный профиль экспрессии [40]. 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 и, в частности, в клетках меланомы [41]. Показано, что транскрипция *NY-ESO-1* наблюдается у 36% из исследованных пациентов с “толстой” меланомой (более 4.00 мм); в меньшей степени – в “средних” меланомах (1.01–4.00 мм) – 10.8%; и вообще не происходит в “тонких” меланомах (менее 1.00 мм). Наиболее интересным представляется то, что экспрессия *NY-ESO-1* зависит от стадии меланомы и составляет 3.5% на I-ой стадии, 9.5% на II-ой и 45.5% на III-ей, уровень экспрессии высок и в метастазах [39]. Экспрессию *NY-ESO-1* связывают с плохим прогнозом развития меланомы [38].

Семейство генов *SSX* в настоящее время насчитывает пять генов, которые в норме экспрессируются только в семенниках и – в следовых количествах – в щитовидной железе; следовательно, антигены относятся к группе тестикулярно-опухолевых [42]. Все эти гены экспрессируются при многих типах рака, включая меланому, однако уровень их экспрессии различен и наиболее интенсивен в меланоме ген *SSX2* [43, 44].

Экспрессия генов различных меланомных маркеров играет ключевую роль в индукции противо-

опухолевого иммунитета. Интенсивные исследования тестикулярно-опухолевых антигенов и антигенов дифференцировки меланоцитов открывают большие возможности для разработки новых подходов диагностики и лечения меланом методом вакцинотерапии. Наибольший интерес для генной терапии меланомы представляет группа тестикулярно-опухолевых антигенов. Возможности их использования для направленной доставки генно-терапевтических конструкций будут рассмотрены ниже.

Два других семейства антигенов, презентируемые на поверхности клеток меланомы, – это антигены, которые представляют собой пептидные фрагменты, или белки, синтез которых в различных типах опухолей очень высок. Опухоль-специфичные антигены, возникающие вследствие точечных мутаций повсеместно распространенных генов, не уникальны для клеток меланомы и имеют универсальное значение для опухолей разной гистологической природы. Подробное рассмотрение этих генов выходит за рамки данного обзора.

Антигены, преимущественно синтезируемые в клетках меланомы

Отдельную группу представляют собой поверхностные антигены, экспрессия которых специфична только для клеток меланомы и их метастазов. В настоящее время известно два таких антигена – *MIA* и *MELOE*.

Белок меланомной ингибирующей активности (*MIA* – Melanoma-Inhibiting Activity) – это белок с мол. весом 11 кДа, опухолевый аутокринно-секретируемый ингибитор клеточного роста, регулирующий степень адгезии клеток к внеклеточному матриксу [45]. *MIA* играет важную роль в инвазии и метастазировании меланомы и рассматривается как высокоспецифичный и чувствительный маркер для злокачественной меланомы [46–49]. Получены экспериментальные подтверждения тому, что экспрессия гена *MIA* происходит преимущественно в меланоме, а также в хондросаркомах, аденокарциномах и хондроцитах, и практически отсутствует в нормальной коже и родимых пятнах [47, 50–53]. Фрагмент 1.4 т.п.н., фланкирующий 5'-участок гена, определяет специфичность экспрессии гена в меланомных клетках, но не в меланоцитах [54, 55]. Активность промотора *MIA* у человека коррелирует с прогрессией меланомы [56].

Недавно охарактеризовали новый антиген клеток меланомы, определяемый ЦТЛ, – сверхэкспрессируемый антиген меланомы (*MELOE* – melanoma-overexpressed antigen); этот антиген практически отсутствует в других тканях и опухолях [57]. Весьма необычны транскрипты этого гена, которые представлены не одной уникальной протяженной рамкой считывания, а содержат несколько коротких транскриптов. Определены две такие формы синтезирующихся мРНК – генов *MELOE-1* и

MELOE-2, продукты которых определяются различными ЦТЛ. Эти антигены, как предполагают, могут быть подходящими мишенями для иммунотерапии меланомы [58, 59]. В настоящее время функции и свойства этого антигена неизвестны, опубликованы только три работы Годе (Godet) и соавт. [57–59], посвященных изучению генов *MELOE*.

Антигены, синтез которых очень высок только в меланоме, представляют наибольший интерес для разработки генно-терапевтических подходов к лечению меланомы. Высокоспецифичная экспрессия этих генов делает их хорошими мишенями для воздействий. Уникальность генетического аппарата этих молекул также может быть использована для создания генно-инженерных конструкций, определяющих экспрессию терапевтических генов только в меланоме. Например, описано использование промотора *MIA* для создания конструкций с суицидальными генами и показана высокая специфичность таких конструкций для клеток меланомных линий [60].

РЕЦЕПТОРЫ МЕЛАНОМНЫХ КЛЕТОК

Хорошими мишенями для терапевтического воздействия могут служить рецепторы клеток меланомы. Взаимодействие с рецептором меланомы может обеспечить избирательное проникновение конструкций в нужные клетки за счет интернализации рецептора. Кроме того, воздействие на некоторые рецепторы может вызывать иммуномодулирующие эффекты [61].

Поверхность меланомных клеток содержит большое число рецепторов, представленных рецепторами факторов роста (FGFR, TGFR, IGFR, EGFR, PDGFR, c-kit, c-met), и рецепторами, запускающими ряд клеточных сигнальных каскадов (Wnt, Notch и другие). Во многих работах показано, что при возникновении и развитии меланомы увеличивается экспрессия генов рецепторов факторов роста, что приводит к повышению пролиферации и выживаемости клеток меланомы. В настоящее время предложено использовать ингибиторы таких рецепторов для лечения меланом, ряд препаратов находится на стадии испытаний [62, 63]. Рецепторам меланомных клеток посвящено много обзоров [64–66]. В данном обзоре мы остановимся на описании только двух рецепторов — меланокортина и тирозинкиназного рецептора c-Met, представляющих наибольший интерес как мишени для направленной доставки терапевтических препаратов.

Рецептор меланокортина 1 (MC1R)

Имеется пять различных подтипов меланокортиновых рецепторов, для каждого из которых характерно свое распределение экспрессии по тканям человека [67, 68]. Из них только MC1R предпочтительно экспрессируется в меланоцитах и меланомах [69, 70]. MC1R представляет собой рецептор для α -

меланоцит-стимулирующего гормона (α -МСГ) — тридекапептида, происходящего из молекулы-предшественника проопиомеланокортина [71]. Высокая экспрессия гена *MC1R* характерна также для клеточных линий, происходящих из первичных и метастатических меланом [72]. Минорные количества этого рецептора встречаются в некоторых других тканях и клетках, например в яичке, яичнике, надпочечниках, кератиноцитах, дендритных клетках и активированных моноцитах [70, 72–74]. Характерно, что MC1R при меланомах локализуется, в основном, внутри клетки [72]. Выход рецептора на поверхность можно индуцировать некоторыми цитокинами в иммунокомпетентных клетках, таких как моноциты и макрофаги [72, 75]; MC1R представлен на поверхности в большем количестве при метастатической и увеальной меланоме (меланома сосудистой оболочки глазного яблока) [76, 77]. Воздействие таких провоспалительных цитокинов, как интерферон γ (ИФН- γ), фактор некроза опухоли α (ФНО- α), интерлейкины 4 и 10 (ИЛ-4 и ИЛ-10), способно индуцировать выход MC1R на поверхность клеток культуры увеальной меланомы [76]. Таким образом, этот рецептор может рассматриваться в качестве высокоспецифичного маркера для увеальной меланомы (детектируется в 95% случаев), особенно при увеличении степени экстрацеллюлярной представленности рецептора [76].

Данный рецептор перспективен в качестве одного из возможных кандидатов для направленной доставки препаратов в клетки меланомы, о чем будет сказано далее.

Рецептор c-Met (HGFR)

Рецептор c-Met, или иначе рецептор ростового фактора гепатоцитов (HGFR), синтезируется в эпителиальных клетках и является важнейшим участником эмбрионального развития и при заживлении ран [78]. Он синтезируется и в первичных меланомах [79], стимулирует инвазивный рост раковых клеток и усиливает их метастатический потенциал [80]. Природный лиганд рецептора — ростовой фактор гепатоцитов (HGF), который обычно синтезируется только в клетках мезенхимального происхождения. Однако во многих меланомных клетках продуцируется HGF, который может стимулировать длительную активацию рецептора c-Met, регулируемую MAPK и PI3K сигнальные пути [81]. Вероятно, аутокринная HGF/c-Met регуляция важна для развития меланомы, и поэтому одной из стратегий терапевтического воздействия может быть стратегия создания антагониста лиганд-рецепторного взаимодействия [62]. Есть несколько подходов, направленных на достижение этой цели. Например, конкурирующий антагонист HGF — белок NK4 — связывается с рецептором, однако не активирует его. В экспериментальных моделях различных типов опухолей введение белка NK4 или его гена приводит к угнетению опухолевой инвазии, метастазирования и ан-

гиогенез-зависимого роста опухоли [82]. Другой подход — угнетение самого HGF: антитела с высокой аффинностью к HGF блокируют его связывание с с-Met и ингибируют опосредованное HGF фосфорилирование с-Met, клеточную пролиферацию и инвазию клеток опухоли [83].

Все предлагаемые методы лечения опухолей с использованием этого рецептора направлены на попытки его ингибирования. Поскольку ранее было показано, что при взаимодействии HGF с рецептором происходит интернализация последнего [84], то, вероятно, можно попытаться использовать с-Met в качестве рецептора для введения в клетку терапевтических генов, если в состав вектора включить аналог лиганда HGF. Селективность распознавания опухолевых и нормальных клеток в данном случае может быть обеспечена опухоль-специфичными промоторами.

МОЛЕКУЛЫ МЕЖКЛЕТОЧНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Молекулы клеточной адгезии семейства САМ

На ранних стадиях формирования опухолей, как правило, наблюдаются нарушения клеточных контактов в ткани, это дает возможность малигнизированным клеткам перемещаться и формировать новые очаги заболевания [85, 86]. Изменения в качественном и количественном составе молекул клеточной адгезии могут как свидетельствовать о процессах малигнизации, так и служить прогностическим признаком, несмотря на то, что до конца механизм функционирования этих молекул неизвестен. Молекулы клеточной адгезии представлены обширным классом белков, подразделяющимся на семейства иммуноглобулинов, кадгеринов, селектинов, интегринов и муцинов [86]. Направление изменений в количестве молекул клеточной адгезии — увеличение или уменьшение их числа на поверхности клеток, — как правило, специфично для определенного типа рака. Развитие многих типов опухолей, включая меланому, сопровождается изменением экспрессии генов, кодирующих белки клеточной адгезии [87]. Предполагается, что при развитии меланомы важную роль играют гены большого семейства иммуноглобулинов. Известно, что нормальные меланоциты экспрессируют небольшое количество белков подсемейства иммуноглобулинов — САМ. При развитии меланомы значительно увеличивается количество таких молекул клеточной адгезии, как МСАМ (CD146, MUC18), L1CAM (CD171), ALCAM (CD166), ICAM1 (CD54) и CEACAM1 (CD66a) [88].

Рецептор МСАМ (Melanoma Cell Adhesion Molecule) опосредует гомо- и гетерологичные взаимодействия между меланомными и эндотелиальными клетками. В нормальных клетках экспрессия гена МСАМ наблюдается в эндотелиальных клетках сосудов, гладкой мускулатуре, костном мозге; высокий

уровень экспрессии обнаружен в родимых пятнах и клетках меланомы [89–91]. При малигнизации, экспрессия МСАМ постепенно увеличивается, достигая максимума в метастатических клетках меланомы [89, 92]. Этот процесс способствует повышению инвазивности и подвижности клеток меланомы, что приводит к повышению уровня метастазирования. Показано, что антитела к МСАМ способны ингибировать рост меланомных клеток и супрессировать образование метастазов [93].

Другой рецептор — L1CAM — играет важную роль при развитии и дифференцировке нервной системы; он также обнаружен в некоторых злокачественных опухолях, в том числе, и в меланоме [94, 95]. Ген рецептора L1CAM экспрессируется в нейронах, почках и лимфоцитах, но не в нормальной коже и пигментных родимых пятнах. Однако L1CAM специфически экспрессируется в первичных меланомах и метастазах меланомы в лимфатические узлы [96]. Взаимодействие рецептора L1CAM с интегрином $\alpha_v\beta_3$ играет важную роль в трансэндотелиальной миграции клеток меланомы [97, 98]. При повышенной экспрессии гена L1CAM происходит конверсия роста меланомной опухоли от радиальной к вертикальной фазе [99].

Молекула клеточной адгезии активированных лейкоцитов — ALCAM (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule) — вовлечена в гомофильное (ALCAM-ALCAM) и гетерофильное (ALCAM-CD6) клеточно-клеточное адгезионное взаимодействие [100, 101]. Рецептор ALCAM синтезируется в клетках метастатической меланомы, но белок отсутствует в неметастатических клетках; это указывает на то, что синтез рецептора ассоциирован с прогрессией меланомы [100, 102]. Содержание рецептора ALCAM повышено в клетках меланомы по сравнению с клетками родимых пятен [103].

Рецептор ICAM1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) индуцируется некоторыми цитокинами, в том числе ФНО- α , ИЛ-1 и ИФН- γ . В норме ген ICAM1 экспрессируется в эндотелиальных клетках и клетках иммунной системы. Лигандами рецептора служат интегрин $\alpha_v\beta_3$ (лимфоцитфункционально-ассоциированный антиген 1) и интегрин α_M (Mac1) лимфоцитов [104]. Экспрессия гена ICAM1 коррелирует с прогрессией меланомы и повышает риск метастазирования [105]; она более характерна для меланом, нежели для обычных родимых пятен, и увеличивается вместе с индексом Бреслоу в первичных меланомах [106, 107]. Показано, что у пациентов с ICAM1-положительными меланомами наблюдается очень короткий интервал от начала до прогрессии заболевания, и длительность их выживания ниже по сравнению с пациентами, ICAM1 у которых отсутствует [108]. В модельных опытах на животных супрессия гена рецептора ICAM1 приводит к уменьшению метастазирования [109]. Тем не менее, специфичность роли ICAM1 в прогрессии меланомы остается неясной; вероятно, ICAM1 в меланомных

клетках ингибирует взаимодействие опухолевых клеток с лейкоцитами, что способствует выживанию опухоли [110]. ICAM1 является натуральным рецептором для прикрепления и внедрения вирусов коксаки в клетки [111]. Был показан онколитический эффект вируса коксаки A21 (CVA21) дикого типа на меланомные клеточные линии, экспрессирующие ген рецептора ICAM1. Вирус способен также инфицировать меланомные опухоли, привитые мышам, и останавливать их рост [112–114].

Раково-эмбриональная молекула клеточной адгезии — SEACAM1 — вовлечена в межклеточное взаимодействие и проведение сигналов в эпителии, вероятно, являясь супрессором клеточного роста, поскольку его содержание снижено, или он вообще отсутствует в некоторых карциномах [88]. Цитоплазматический домен SEACAM1 взаимодействует с интегрином β_3 , обе молекулы локализованы на опухолево-стромальной границе растущей меланомы; предполагается, что взаимодействие SEACAM1- β_3 играет большую роль в миграции и инвазии меланомы [115, 116]. Появление SEACAM1 в первичных меланомах ассоциируется с последующим развитием метастазирования [117].

Недавние исследования показали, что все перечисленные выше молекулы клеточной адгезии — высокочувствительные и специфичные диагностические маркеры меланомы [118]. Более того, экспрессия гена *ICAM*, например, реципрокно коррелирует с выживанием пациентов и развитием метастазов в региональных лимфоузлах [119, 120], а экспрессия гена *LICAM* в первичных меланомах ассоциирована с метастатическим распространением опухоли, являясь, таким образом, независимым прогностическим фактором риска метастазирования [95]. Предполагается, что большинство этих молекул и определяют высокую метастатическую способность меланомы, а в некоторых случаях — основные эффекторы образования метастазов [121]. Немаловажное обстоятельство заключается в том, что высокая плотность указанных рецепторов на поверхности метастатической меланомы делает эти рецепторы привлекательными в качестве мишеней для направленной доставки терапевтических генов. В качестве “навигатора” для доставки можно использовать известные лиганды указанных рецепторов. Характерной особенностью большинства указанных рецепторов является их способность к интернализации [122–125], что может обеспечить введение вектора, связанного с рецептором, внутрь клетки.

Меланома-ассоциированный антиген с высоким молекулярным весом

Меланома-ассоциированный антиген с высоким молекулярным весом (HMW-MAA), или связанный с мембраной хондроитинсульфат, — это протеогликан меланомы; наблюдается высокая

экспрессия его гена в клетках меланомы и в большинстве клеточных линий меланомы человека, но он не обнаружен в нормальных меланоцитах, клетках родинок и пигментных пятен [126]. Исследования последних лет показали, что HMW-MAA участвует в активации некоторых сигнальных путей, модулирующих адгезию, распространение, миграцию и инвазию клеток меланомы [126]. Он опосредует взаимодействие клеток меланомы с внеклеточным матриксом, необходим для обеспечения метастатического потенциала клеток меланомы и способствует инвазии меланомы путем реорганизации цитоскелета. Индукция гуморального ответа к этому антигену приводит к статистически значимому продлению сроков выживания пациентов на IV-ой стадии опухоли [127]. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к HMW-MAA используется для диагностики десмопластической и акральной лентигинозной меланом, которые другими способами трудно идентифицировать [128, 129]. Небольшая фракция (около 5%) антител, связанных с HMW-MAA, интернализуется и деградирует внутри клетки [130]. Недавно разработаны химиотерапевтические препараты, в которых токсические агенты, конъюгированные с антителами к HMW-MAA, могут доставляться в клетки меланомы [131].

ПОВЕРХНОСТНЫЕ МАРКЕРЫ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ

В настоящее время все большее признание получает концепция опухолевых стволовых клеток [132]. Значительное количество экспериментальных данных свидетельствует в пользу предположения, что среди клеток злокачественной меланомы имеется небольшая популяция стволовых клеток, способных к формированию дифференцированных клеток опухоли, а также способных к собственному воспроизведению [133–136]. Именно эта клеточная популяция меланомы наиболее агрессивна и вызывает опухоли у зараженных животных; эти клетки обладают также значительной устойчивостью к лечению. Предполагают, что стволовые клетки меланомы имеют свойства, которые обеспечивают их резистентность практически ко всем видам используемой химиотерапии [135, 137, 138]. Обнаружено и охарактеризовано несколько поверхностных маркеров клеток меланомы. Мембранный маркер CD133 обнаружен менее чем в 1% клеток меланомы, причем эти клетки обладают большим онкогенным потенциалом [136, 139, 140]. Хотя CD133 считается отличительным маркером многих типов стволовых клеток, в последние годы появились сведения, что далеко не все опухолевые стволовые клетки имеют этот маркер [141]. В том числе, показано, что не во всех агрессивных меланомах найдены CD133-положительные фракции [103]. Другими поверхностными маркерами являются Р-гликопротеины (ABC5 [138] и ABCG2 [139]), относящиеся к семейству MDR — АТФ-зависимых транспортных

белков, обеспечивающих резистентность клеток к химическим веществам. Уровень экспрессии гена *ABCB5* значительно выше в метастатических меланомах, чем в родимых пятнах [138]. Показано, что фракция клеток меланомы человека, содержащая белок *ABCB5*, после перевивки мышам NOD/SCID вызывает образование опухоли, рост которой подавляется антителами к белку *ABCB5* [140]. В положительных по *ABCB5* клетках значительно меньше представлены белки ГКП и специфические для меланомы антигены NY-ESO-1 и MAGE-A [142].

В ряде работ показано, что содержащие CD133 опухолевые клетки при других формах рака также экспрессируют ген *ABCB5*. По-видимому, положительные по этим двум маркерам клетки ответственны за опухолеобразование [143, 144]. Данные о том, что стволовые клетки меланомы несут маркер *ABCG2*, противоречивы, и в некоторых работах не обнаружена связь этого белка со стволовыми клетками [145].

В 2010 г. показано, что клетки, положительные по маркеру CD271, обладают наибольшим потенциалом для развития меланомы [135]. В таких меланомных клетках резко снижена экспрессия генов *TYR*, *MART1* и *MAGEC1/MAGEC2* (на 86, 69 и 68% соответственно). Этот факт может объяснять неудачи при терапии меланомы с использованием антител к белковым продуктам этих генов. Однако практически в то же время опубликованы противоположные результаты, которые показали, что наибольшим онкогенным потенциалом обладают как раз клетки, не несущие CD271 (*CD271*⁻) [146]. Таким образом, поверхностный ландшафт детерминант, характерных для популяции стволовых клеток, до сих пор окончательно не установлен. В недавно появившемся обзоре, где собрана вся информация о стволовых клетках меланомы, высказано предположение о гетерогенности фенотипа стволовых клеток меланомы и возможности существования клеток с разным фенотипом, несущих при определенных условиях разные маркеры [147].

Есть основания полагать, что терапия опухолей должна быть направлена в первую очередь на подавление опухолевых стволовых клеток, и изучение рецепторов и антигенов таких клеток имеет большое значение.

ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРОВ ПОВЕРХНОСТНЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ПРИ ОБРАЗОВАНИИ МЕТАСТАЗОВ

Как было отмечено, одно из важнейших характеристик меланомы, обуславливающей низкую выживаемость пациентов и сложность лечения, — раннее метастазирование. Оно может сопровождаться изменением набора поверхностных детерминант первичной опухоли. Распознавание того, как изменяются наборы поверхностных маркеров в ряду опухоль—метастазы, является очень важным факто-

ром при выборе мишени для специфической доставки терапевтических генов, поскольку именно метастазы обуславливают рецидивы заболевания. При сравнении профилей генной экспрессии в первичных опухолях и метастазах меланомы показано, что различия касаются ряда генов [148, 149]. Экспрессия некоторых генов, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла, и генов, кодирующих молекулы клеточной адгезии, повышается, в то время как экспрессия некоторых генов межклеточного взаимодействия в метастазах понижена. Например, уменьшение экспрессии гена E-кадгерина ассоциировано с повышением экспрессии N-кадгерина [150]. При анализе профилей экспрессии генов тестикулярно-опухолевых антигенов и антигенов дифференцировки показано, что антигены дифференцировки *SILV*, *MLANA*, *TYR* наблюдаются в 93–95% образцов как первичных опухолей, так и метастазов на одинаковом уровне [38]. В то же время тестикулярно-опухолевые антигены *MAGE1*, *MAGE4*, *NY-ESO-1* встречаются в первичных опухолях реже, чем в метастазах (20, 9 и 45% соответственно). Для генов *MAGE1* и *MAGE4* характерно дальнейшее увеличение экспрессии в отдаленных метастазах, а уровень экспрессии гена *NY-ESO-1* в метастазах одинаков [38].

При метастазировании, в первую очередь, происходит изменение профиля белков, ответственных за межклеточные контакты. Значительно увеличивается экспрессия генов, ответственных за клеточное взаимодействие и адгезию, например, генов семейства *CAM*, описанных выше [148]. В то же время, уровень экспрессии гена *CDH1*, кодирующего E-кадгерин в метастазах, понижен. Эпителиальный кадгерин — это кальций-зависимая молекула адгезии, связывающая клетки путем гомологичных взаимодействий. Его роль критична при индукции и поддержании полярности и дифференцировки клеток. Подавление или утрата его функции ассоциирована с инвазивным и агрессивным фенотипом различных типов опухолей человека, включая меланому [150].

Предполагается, что возникновение метастазов происходит за счет миграции раковых стволовых клеток и осеменения ими тех органов, которые содержат подходящий молекулярный контекст для прикрепления и размножения мигрирующих клеток. В ряде работ наблюдается повышение уровня содержания маркеров опухолевых стволовых клеток, таких как CD133, *ABCB5* и CD271, при метастазировании [135]. Однако эти результаты требуют подтверждения, так как при изучении профиля экспрессии генов в метастазах меланомы эти маркеры не были выявлены [148], а уровень внутриклеточных маркеров стволовых клеток — нестина и *BMI 1* — в метастазах, по некоторым данным, не отличается от первичных опухолей [151].

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЦЕПТОРОВ И АНТИГЕНОВ МЕЛАНОМЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ГЕНОВ

Метастазирующая меланома, несмотря на огромные усилия по разработке эффективных средств ее лечения, остается одной из нерешенных проблем в медицине, и частота заболеваемости ею продолжает увеличиваться. Используемые в настоящее время препараты имеют низкую эффективность. Большие надежды возлагаются на генную терапию, основанную на использовании регулируемых генных систем. Предложено несколько схем использования рецепторов и поверхностных антигенов меланомы для терапии этого онкозаболевания. Одной из них является инактивация рецепторов меланомы антителами. При этом доступ к рецептору стерически блокируется, нарушается его взаимодействие с лигандом, что и приводит к нарушению контроля сигнальных путей и гибели клеток. В настоящее время получены антитела практически ко всем известным рецепторам меланомы, и многие из них испытаны в клинике. Например, антитела к рецептору L1CAM частично ингибируют трансэндотелиальную миграцию клеток меланомы, снижая уровень метастазирования [98]. Антитела к некоторым лигандам препятствуют их взаимодействию с рецепторами, как описано в случае взаимодействия HGF с с-Met-рецептором [83]. Предложено использовать в терапии процесс интернализации в клетки токсических препаратов, конъюгированных со специфическими рецепторами меланомы. Обнадёживающие результаты дало использование конъюгатов гелонина с антителами к меланома-ассоциированному антигену HMW-MAA [131]. Выше уже упоминалось, что меланомные рецепторы могут служить и мишенями для онкологических вирусов, в частности, CVA21, взаимодействующего с рецептором ICAM1 [114]. В настоящее время рецепторы и поверхностные антигены меланомы широко используются для создания иммуновакцин [152]. Однако все они имеют множество недостатков и в ряде случаев малоэффективны. Характерным для меланомы является сохранение профиля экспрессии антигенов от первичной опухоли к метастазам. Наличие или отсутствие какого-либо из них специфично для каждого пациента и сохраняется в связке опухоль—метастазы, в то время как профили экспрессии антигенов у разных пациентов могут различаться [153]. В целом, наблюдается высокая гетерогенность экспрессии поверхностных антигенов у разных пациентов. Таким образом, использование для терапии тестикулярно-опухолевых антигенов и антигенов дифференцировки пока малоперспективно с точки зрения универсальности этого подхода.

В подавляющем большинстве случаев рецепторы и поверхностные антигены используются либо для создания иммуновакцин, либо в качестве мишеней химиотерапевтических препаратов. Имеется

и другое направление в генной терапии, а именно — стратегия специфического уничтожения раковых клеток, где наиболее универсальным является использование так называемых генов-убийц. В раковую клетку водится ген, кодирующий фермент, не свойственный нормальной клетке, который способен превращать нетоксичное для нормальных клеток соединение в токсин, вызывающий гибель раковых клеток. Основная проблема при этом — целевая доставка генно-терапевтической системы внутрь опухолевых клеток меланомы. Технологий, позволяющих использовать для направленной доставки терапевтических генов специфичные именно для меланомы поверхностные антигены или рецепторы, до настоящего времени не создано. Ранее была предложена технология селективного поиска целевых клеток при помощи рецепторов, специфически связывающих последовательности лигандов по типу коллаген-связывающего домена или RGD-аденовирусов [154, 155]. Таким образом могут быть разработаны перспективные препараты, использующие лиганды к специфическим для меланомы рецепторам и/или антигенам, презентированным на поверхности клеток меланомы.

Большинство рецепторов меланомы имеются и на многих нормальных клетках организма, поэтому особенно необходимы поиски рецепторов, повышение экспрессии которых характерно именно для меланом. Один из таких рецепторов — описанный выше MC1R, синтез которого заметно увеличен как в меланомных клеточных линиях, так и в меланомах человека, по сравнению с нормальными меланоцитами [72, 156, 157]. Для диагностики и лечения важен также тот факт, что иммуноцитохимическое окрашивание срезов различных тканей свидетельствует о более высоком уровне представленности этого рецептора в меланомах, чем в нормальных тканях [72]. Кроме того, этот рецептор имеет очень высокое сродство к таким лигандам, как адренокортикотропный гормон и МСГ. Суммируя имеющиеся на современном этапе сведения о меланокортиновых рецепторах и их экспрессии, можно сделать вывод, что MC1R является специфическим маркером клеток меланомы. Экспрессия гена этого рецептора в меланомах часто превышает его экспрессию в любых нормальных тканях организма, а лиганды к этому рецептору могут специфически интернализироваться клетками. Все это позволяет рассматривать данный рецептор как один из весьма перспективных кандидатов для направленной доставки генно-терапевтических препаратов при меланоме.

Проблему безопасности при использовании генных систем для не затронутых опухолью клеток и других систем организма решают либо путем доставки структуры, специфичной для раковых клеток, либо путем, который обеспечивает специфическую экспрессию генной системы только в раковых клетках при полном ее запрете в нормальных клетках. Этого можно достичь при использовании регу-

ляторных систем, активных только в раковых клетках, в частности, специфичных промоторов. Такими промоторами для меланомы служат промотор гена тирозиназы мыши, который исключительно активен в меланоцитах и во многих меланомах человека [158–161], и промотор гена *MIA*, который обеспечивает селективную экспрессию гена в клетках меланомы, но не в меланоцитах [55].

Большое значение при лечении меланом имеет разработка приемов идентификации и уничтожения метастазов. Так как их возникновение и распространение связывают со стволовыми клетками, на первое место выдвигаются задачи по изучению содержания в клетках меланомы и метастазов маркеров меланомных стволовых клеток (*CD133*, *ABC5* и *CD271*) и возможности их использования в терапевтических целях. Кроме того, необходимы поиски новых маркерных генов стволовых клеток, которые можно было бы использовать для направленного воздействия генно-терапевтических конструкций на метастазы, содержащие эти мишени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ПОВЕРХНОСТНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ОПУХОЛИ И КОНЦЕПЦИЯ МНОГОУРОВНЕВОЙ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

В литературе формулируют следующие требования к идеальной генной терапии. Во-первых, это избирательная доставка терапевтических генов в опухолевые клетки. Во-вторых, это их нетоксичность для нормальных клеток. В-третьих, это возможность системной доставки, позволяющей попадание агентов как в первичные опухоли, так и в метастазы (см., например [162, 163]).

Эти требования, несомненно, необходимы, но недостаточны. Чтобы терапия была действительно идеальной, к ним необходимо добавить еще один пункт, а именно — возможность количественного уничтожения опухолевых клеток и метастазов.

Рассмотренные в обзоре поверхностные маркеры клеток меланомы являются первым “портом”, через который генно-терапевтические системы доставляются к опухолевым клеткам. Генно-инженерная конструкция, упакованная в векторную систему, к которой присоединен лиганд, специфически взаимодействующий с поверхностной детерминантой опухолевой клетки, поглощается клеткой посредством эндоцитоза [164]. Все поверхностные белки в некоторой степени способны проникать внутрь клетки [165]. Возможно, наиболее эффективна доставка связанной с поверхностным детерминантом упакованной векторной конструкции в том случае, когда этот детерминант представляет собой поверхностный клеточный рецептор, который при связывании с лигандом интернализуется клеткой (рисунок *а*) [162].

Однако здесь возникают две проблемы, которым в литературе уделяют недостаточное внимание.

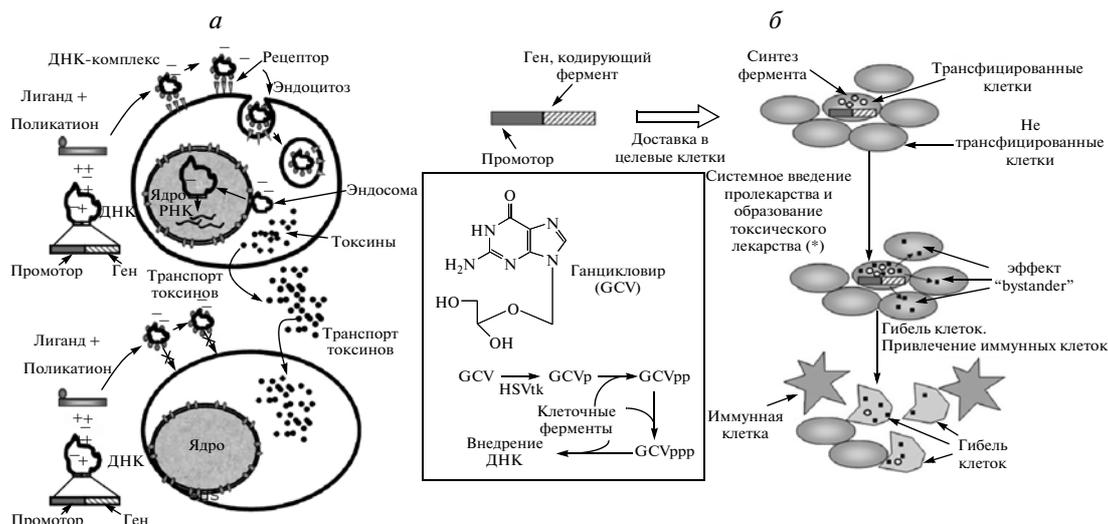
Опухоль может представлять собой гетерогенную смесь, одни клетки которой содержат требуемый рецептор, тогда как другие — нет. Тогда в клетки, не содержащие рецептор, векторная система не будет доставлена. Кроме того, многие клетки, содержащие рецептор, в силу чисто стохастических причин также не будут получать терапевтическую конструкцию. Поэтому нельзя ожидать полного выполнения последнего пункта — уничтожения всех клеток опухоли.

В идеале, система должна обладать вторым уровнем надежности. Она должна синтезировать “инфекционный” продукт, с одной стороны, способный секретироваться из клеток, получивших генную конструкцию, в окружающие клетки и, с другой стороны, токсичный для окружающих раковых клеток, но *не токсичный* для нормальных. Тогда будут уничтожаться раковые клетки, не содержащие терапевтических генов.

Наконец, как мы видели выше, чаще всего поверхностные детерминанты не являются строго специфичными для клеток опухоли. Они встречаются, хотя и с меньшей плотностью, на поверхности нормальных клеток. Это означает, что генная конструкция должна работать только в раковых клетках и не работать в нормальных. Это — третий уровень надежности, обеспечивающий, так же как и предыдущий, безопасность здоровых клеток.

Примеры такого рода многоуровневых подходов под общим названием “генная хирургия” приведены в недавнем обзоре [7]. Один из них — подход, известный как ген-направленная энзиматическая пролекарственная терапия (*Gene-directed enzyme prodrug therapy, GDEPT*), или генная терапия с использованием генов самоубийства опухоли (*suicide gene therapy*) [166–168]. Его принцип схематически представлен на рисунке *б*. В опухолевые клетки вводится ген, превращающий внутри них нетоксичный про-агент в токсичный агент. Все клетки данной опухоли, как бы гетерогенны они ни были, имеют одно общее фундаментальное свойство: они все непрерывно пролиферируют, реплицируя ДНК. Это общее свойство может быть универсальной мишенью действия токсина в любой опухоли и в ее метастазах. В версии генетической хирургии заложены два из трех фундаментальных принципов, сформулированных выше. Первый принцип: клетка, где синтезируется токсин, распространяет его на окружающие клетки, но токсический продукт действует непосредственно на реплицирующуюся ДНК, наиболее универсальный и главный элемент амплификации раковых клеток. Эта репликация редко происходит в нормальных клетках. Второй принцип: чтобы обеспечить дополнительный уровень безопасности нормальных клеток, генная конструкция должна управляться раково-специфичным промотором, который неактивен в нормальных клетках.

В качестве примера приведем систему, включающую фермент тимидинкиназу вируса простого гер-



Основные этапы многоуровневой генной терапии. *a* – Доставка векторной конструкции через поверхностный клеточный рецептор, который при связывании с лигандом интернализуется клеткой; *b* – схема ген-направленной энзиматической пролекарственной терапии (по [170]). GCV – Ганцикловир; GCVp, GCVpp, GCVppp – фосфорилированный ганцикловир; HSVtk – тимидинкиназа вируса простого герпеса.

песа (HSVtk) и пролекарство – известный малотоксичный противогерпетический препарат ганцикловир (GCV). Схематически этот подход изображен на рисунке *b*. Ген HSVtk вводят в раковые клетки, где он работает и синтезирует фермент – вирусную тимидинкиназу. Затем пациент системно получает GCV. Вирусная тимидинкиназа, в отличие от клеточных ферментов, фосфорилирует GCV, превращая его в монофосфат, который затем последовательно превращается клеточными киназами в ди- и трифосфаты GCV. Трифосфат включается в реплицирующуюся ДНК и обрывает синтез растущих цепей. Раковая клетка погибает (есть и другие механизмы токсичности фосфорилированного GCV для клетки). Превращение нетоксичного GCV в токсичный трифосфат происходит внутри раковой клетки и поэтому не оказывает эффекта на здоровые клетки. Таким образом, осуществляется первый принцип, сформулированный выше. Проникновение токсина в соседние клетки происходит за счет так называемого байстендер эффекта (bystander, “эффект соседства”). Фосфорилированный GCV выходит из клеток опухоли и проникает в соседние клетки. Там он превращается в трифосфат и, если это реплицирующиеся клетки, т.е. раковые клетки, то включается в ДНК и обрывает ее синтез. Соседние клетки погибают, хотя в них может не быть гена HSVtk. По имеющимся данным, достаточно попадания гена всего в 10% опухолевых клеток, чтобы были уничтожены все клетки опухоли [86]. Это чрезвычайно важно, поскольку практически невозможно доставить ген во все опухолевые клетки.

Несмотря на очевидную теоретическую обоснованность и множество усилий, практическое применение генетической хирургии – еще весьма далекая перспектива. В обзоре 2003 г. [169] автор пишет:

“Большое число экспериментов на большом числе опухолей выполнено с этой системой, и первые опыты на модельных животных были очень обещающими. Это сподвигло исследователей на клинические испытания, но до сих пор сколько-нибудь обнадеживающих результатов не получено”. Этот обзор суммирует результаты клинических испытаний до 2010 г. Данные за последние несколько лет суммированы в другом обзоре [167] и в базе данных по клиническим испытаниям (www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/). Несмотря на важность накопленной информации, и на то, что в ряде случаев получен реальный клинический успех, результаты на человеке даже близко не приближаются к тем, которые рутинно получают на животных. Вопрос – почему. Этот вопрос остается нерешенным.

Возможный путь его решения – правильный выбор рецептора-мишени, на который будет направляться действие терапевтической системы. Это позволило бы увеличить эффективность доставки системы к опухолевым клеткам, тогда как неполнота доставки компенсировалась бы дополнительными уровнями эффективности, запрограммированными в самой системе. В случае меланомы такой мишенью может быть одна из поверхностных детерминант, рассмотренных в данном обзоре.

Авторы выражают глубокую благодарность Т.В. Виноградовой за помощь при подготовке обзора.

Работа получила финансовую поддержку Российской Президентской программы “Ведущие научные школы” (НШ – 5638.2010.4) и ФЦП ГК (02.512.12.2027).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arenberger P., Arenbergerova M., Gkalpakiotis S., Lippert J., Stribrna J., Kremen J. 2008. Multimarker real-time reverse transcription-PCR for quantitative detection of melanoma-associated antigens: a novel possible staging method. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **22**, 56–64.
2. Johnson T.M., Smith J.W., 2nd, Nelson B.R., Chang A. 1995. Current therapy for cutaneous melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **32**, 689–707; quiz 708–709.
3. Prehn R.T. 1996. The paradoxical association of regression with a poor prognosis in melanoma contrasted with a good prognosis in keratoacanthoma. *Cancer Res.* **56**, 937–940.
4. Wildemore J.K., Schuchter L., Mick R., Synnestevedt M., Elenitsas R., Bedrosian I., Czerniecki B.J., Guerry D., Lessin S.R., Elder D.E., Bucky L.P. 2001. Locally recurrent malignant melanoma characteristics and outcomes: a single-institution study. *Ann. Plast. Surg.* **46**, 488–494.
5. Vujanovic L., Butterfield L.H. 2007. Melanoma cancer vaccines and anti-tumor T cell responses. *J. Cell. Biochem.* **102**, 301–310.
6. Caballero O.L., Chen Y.T. 2009. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci.* **100**, 2014–2021.
7. Sverdlov E. 2009. Not gene therapy, but genetic surgery – the right strategy to attack cancer. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* **24**, 93–113.
8. Haass N.K., Smalley K.S. 2009. Melanoma biomarkers: current status and utility in diagnosis, prognosis, and response to therapy. *Mol. Diagn. Ther.* **13**, 283–296.
9. Agarwala S.S. 2010. Novel immunotherapies as potential therapeutic partners for traditional or targeted agents: cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 blockade in advanced melanoma. *Melanoma Res.* **20**, 1–10.
10. Michaeli Y., Denkberg G., Sinik K., Lantzy L., Chih-Sheng C., Beauverd C., Ziv T., Romero P., Reiter Y. 2009. Expression hierarchy of T cell epitopes from melanoma differentiation antigens: unexpected high level presentation of tyrosinase-HLA-A2 Complexes revealed by peptide-specific, MHC-restricted, TCR-like antibodies. *J. Immunol.* **182**, 6328–6341.
11. Boon T., van der Bruggen P. 1996. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **183**, 725–729.
12. Brichard V., Van Pel A., Wolfel T., Wolfel C., De Plaen E., Lethe B., Coulie P., Boon T. 1993. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* **178**, 489–495.
13. Coulie P.G., Brichard V., van Pel A., et al. 1994. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* **180**, 35–42.
14. Kawakami Y., Eliyahu S., Delgado C.H., Robbins P.F., Rivoltini L., Topalian S.L., Miki T., Rosenberg S.A. 1994. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 3515–3519.
15. Bakker A.B., Schreurs M.W., de Boer A.J., Kawakami Y., Rosenberg S.A., Adema G.J., Figdor C.G. 1994. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* **179**, 1005–1009.
16. Cox A.L., Skipper J., Chen Y., Henderson R.A., Darrow T.L., Shabanowitz J., Engelhard V.H., Hunt D.F., Slingluff C.L., Jr. 1994. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science.* **264**, 716–719.
17. Wang R.F., Robbins P.F., Kawakami Y., Kang X.Q., Rosenberg S.A. 1995. Identification of a gene encoding a melanoma tumor antigen recognized by HLA-A31-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* **181**, 799–804.
18. Brichard V.G., Herman J., van Pel A., Wildmann C., Gaugler B., Wolfel T., Boon T., Lethe B. 1996. A tyrosinase nonapeptide presented by HLA-B44 is recognized on a human melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **26**, 224–230.
19. Kawakami Y., Eliyahu S., Jennings C., Sakaguchi K., Kang X., Southwood S., Robbins P.F., Sette A., Appella E., Rosenberg S.A. 1995. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J. Immunol.* **154**, 3961–3968.
20. Castelli C., Storkus W.J., Maeurer M.J., Martin D.M., Huang E.C., Pramanik B.N., Nagabhushan T.L., Parmiani G., Lotze M.T. 1995. Mass spectrometric identification of a naturally processed melanoma peptide recognized by CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **181**, 363–368.
21. Topalian S.L., Rivoltini L., Mancini M., Markus N.R., Robbins P.F., Kawakami Y., Rosenberg S.A. 1994. Human CD4+ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 9461–9465.
22. Hearing V.J., Jimenez M. 1989. Analysis of mammalian pigmentation at the molecular level. *Pigment Cell Res.* **2**, 75–85.
23. Smith B., Selby P., Southgate J., Pittman K., Bradley C., Blair G.E. 1991. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet.* **338**, 1227–1229.
24. Jimbow K., Gomez P.F., Toyofuku K., Chang D., Miura S., Tsujiya H., Park J.S. 1997. Biological role of tyrosinase related protein and its biosynthesis and transport from TGN to stage I melanosome, late endosome, through gene transfection study. *Pigment Cell Res.* **10**, 206–213.
25. Busam K.J., Jungbluth A.A. 1999. Melan-A, a new melanocytic differentiation marker. *Adv. Anat. Pathol.* **6**, 12–18.
26. Sztramska A., Dymerska D., Chwirot B.W. 2008. Skin layer-specific Melan-A expression during progression of human cutaneous melanoma: implications for diagnostic applications of the marker. *Melanoma Res.* **18**, 259–267.
27. Kwon B.S., Halaban R., Ponnazhagan S., Kim K., Chintamaneni C., Bennett D., Pickard R.T. 1995. Mouse silver mutation is caused by a single base insertion in the putative cytoplasmic domain of Pmel 17. *Nucleic Acids Res.* **23**, 154–158.
28. Chakraborty A.K., Platt J.T., Kim K.K., Kwon B.S., Bennett D.C., Pawelek J.M. 1996. Polymerization of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin by

- the pmel 17/silver locus protein. *Eur. J. Biochem.* **236**, 180–188.
29. Berson J.F., Harper D.C., Tenza D., Raposo G., Marks M.S. 2001. Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 3451–3464.
 30. Ohsie S.J., Sarantopoulos G.P., Cochran A.J., Binder S.W. 2008. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J. Cutan. Pathol.* **35**, 433–444.
 31. de Plaen E., Arden K., Traversari C., et al. 1994. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics.* **40**, 360–369.
 32. Boel P., Wildmann C., Sensi M.L., Bresseur R., Renaud J.C., Coulie P., Boon T., van der Bruggen P. 1995. BAG1: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity.* **2**, 167–175.
 33. van den Eynde B., Peeters O., de Backer O., Gaugler B., Lucas S., Boon T. 1995. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J. Exp. Med.* **182**, 689–698.
 34. Bresseur F., Rimoldi D., Lienard D., et al. 1995. Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer.* **63**, 375–380.
 35. Takahashi K., Shichijo S., Noguchi M., Hirohata M., Itoh K. 1995. Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. *Cancer Res.* **55**, 3478–3482.
 36. Chomez P., Williams R., de Backer O., Boon T., Vennstrom B. 1996. The SMAGE gene family is expressed in post-meiotic spermatids during mouse germ cell differentiation. *Immunogenetics.* **43**, 97–100.
 37. Haas G.G., Jr., D’Cruz O.J., de Bault L.E. 1988. Distribution of human leukocyte antigen-ABC and -D/DR antigens in the unfixed human testis. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* **18**, 47–51.
 38. Barrow C., Browning J., MacGregor D., Davis I.D., Sturrock S., Jungbluth A.A., Cebon J. 2006. Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin. Cancer Res.* **12**, 764–771.
 39. Velazquez E.F., Jungbluth A.A., Yancovitz M., et al. 2007. Expression of the cancer/testis antigen NY-ESO-1 in primary and metastatic malignant melanoma (MM)—correlation with prognostic factors. *Cancer Immun.* **7**, 11.
 40. Rimoldi D., Rubio-Godoy V., Dutoit V., et al. 2000. Efficient simultaneous presentation of NY-ESO-1/LAGE-1 primary and nonprimary open reading frame-derived CTL epitopes in melanoma. *J. Immunol.* **165**, 7253–7261.
 41. Aarnoudse C.A., van den Doel P.B., Heemskerk B., Schrier P.I. 1999. Interleukin-2-induced, melanoma-specific T cells recognize CAMEL, an unexpected translation product of LAGE-1. *Int. J. Cancer.* **82**, 442–448.
 42. Gure A.O., Tureci O., Sahin U., Tsang S., Scanlan M.J., Jager E., Knuth A., Pfreundschuh M., Old L.J., Chen Y.T. 1997. SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int. J. Cancer.* **72**, 965–971.
 43. Tureci O., Sahin U., Schobert I., Koslowski M., Scmitt H., Schild H.J., Stenner F., Seitz G., Rammensee H.G., Pfreundschuh M. 1996. The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40. *Cancer Res.* **56**, 4766–4772.
 44. dos Santos N.R., Torensma R., de Vries T.J., Schreurs M.W., de Bruijn D.R., Kater-Baats E., Ruitter D.J., Adema G.J., van Muijen G.N., van Kessel A.G. 2000. Heterogeneous expression of the SSX cancer/testis antigens in human melanoma lesions and cell lines. *Cancer Res.* **60**, 1654–1662.
 45. Blesch A., Bosserhoff A.K., Apfel R., Behl C., Hessdoerfer B., Schmitt A., Jachimczak P., Lottspeich F., Buettner R., Bogdahn U. 1994. Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA. *Cancer Res.* **54**, 5695–5701.
 46. Stoll R., Renner C., Zweckstetter M., et al. 2001. The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold. *EMBO J.* **20**, 340–349.
 47. Bosserhoff A.K., Kaufmann M., Kaluza B., Bartke I., Zirngibl H., Hein R., Stolz W., Buettner R. 1997. Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer Res.* **57**, 3149–3153.
 48. Bosserhoff A.K., Echtenacher B., Hein R., Buettner R. 2001. Functional role of melanoma inhibitory activity in regulating invasion and metastasis of malignant melanoma cells in vivo. *Melanoma Res.* **11**, 417–421.
 49. Stahlecker J., Gauger A., Bosserhoff A., Buettner R., Ring J., Hein R. 2000. MIA as a reliable tumor marker in the serum of patients with malignant melanoma. *Anticancer Res.* **20**, 5041–5044.
 50. van Groningen J.J., Bloemers H.P., Swart G.W. 1995. Identification of melanoma inhibitory activity and other differentially expressed messenger RNAs in human melanoma cell lines with different metastatic capacity by messenger RNA differential display. *Cancer Res.* **55**, 6237–6243.
 51. Bosserhoff A.K., Lederer M., Kaufmann M., Hein R., Stolz W., Apfel R., Bogdahn U., Buettner R. 1999. MIA, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Anticancer Res.* **19**, 2691–2693.
 52. Bosserhoff A.K., Moser M., Hein R., Landthaler M., Buettner R. 1999. *In situ* expression patterns of melanoma-inhibiting activity (MIA) in melanomas and breast cancers. *J. Pathol.* **187**, 446–454.
 53. Perez R.P., Zhang P., Bosserhoff A.K., Buettner R., Abu-Hadid M. 2000. Expression of melanoma inhibitory activity in melanoma and nonmelanoma tissue specimens. *Hum. Pathol.* **31**, 1381–1388.
 54. Bosserhoff A.K., Hein R., Bogdahn U., Buettner R. 1996. Structure and promoter analysis of the gene encoding the human melanoma-inhibiting protein MIA. *J. Biol. Chem.* **271**, 490–495.
 55. Bosserhoff A.K., Kondo S., Moser M., Dietz U.H., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N. A., Buettner R., Sandell L.J. 1997. Mouse CD-RAP/MIA gene: structure, chromosomal localization, and expression in cartilage and chondrosarcoma. *Dev. Dyn.* **208**, 516–525.
 56. Deichmann M., Benner A., Bock M., Jackel A., Uhl K., Waldmann V., Naher H. 1999. S100-Beta, melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive American Joint Committee on Cancer stage IV melanoma. *J. Clin. Oncol.* **17**, 1891–1896.

57. Godet Y., Moreau-Aubry A., Guilloux Y., Vignard V., Khammari A., Dreno B., Jotereau F., Labarriere N. 2008. MELOE-1 is a new antigen overexpressed in melanomas and involved in adoptive T cell transfer efficiency. *J. Exp. Med.* **205**, 2673–2682.
58. Godet Y., Moreau-Aubry A., Mompelat D., Vignard V., Khammari A., Dreno B., Lang F., Jotereau F., Labarriere N. 2009. An additional ORF on meloe cDNA encodes a new melanoma antigen, MELOE-2, recognized by melanoma-specific T cells in the HLA-A2 context. *Cancer Immunol. Immunother.* **59**, 431–439.
59. Godet Y., Desfrancois J., Vignard V., Schadendorf D., Khammari A., Dreno B., Jotereau F., Labarriere N. 2010. Frequent occurrence of high affinity T cells against MELOE-1 makes this antigen an attractive target for melanoma immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* **40**, 1786–1794.
60. Rothfels H., Paschen A., Schadendorf D. 2003. Evaluation of combined gene regulatory elements for transcriptional targeting of suicide gene expression to malignant melanoma. *Exp. Dermatol.* **12**, 799–810.
61. Smalley K.S., Nathanson K.L., Flaherty K.T. 2009. Genetic subgrouping of melanoma reveals new opportunities for targeted therapy. *Cancer Res.* **69**, 3241–3244.
62. Marquette A., Bagot M., Bensussan A., Dumaz N. 2007. Recent discoveries in the genetics of melanoma and their therapeutic implications. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **55**, 363–372.
63. Woodman S.E., Davies M.A. 2010. Targeting KIT in melanoma: a paradigm of molecular medicine and targeted therapeutics. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 568–574.
64. Kwong L., Chin L., Wagner S.N. 2007. Growth factors and oncogenes as targets in melanoma: lost in translation? *Adv. Dermatol.* **23**, 99–129.
65. Okuyama R., Tagami H., Aiba S. 2008. Notch signaling: its role in epidermal homeostasis and in the pathogenesis of skin diseases. *J. Dermatol. Sci.* **49**, 187–194.
66. O'Connell M.P., Weeraratna A.T. 2009. Hear the Wnt Ror: how melanoma cells adjust to changes in Wnt. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 724–739.
67. Chhajlani V., Wikberg J.E. 1992. Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett.* **309**, 417–420.
68. Gantz I., Konda Y., Tashiro T., Shimoto Y., Miwa H., Munzert G., Watson S.J., DelValle J., Yamada T. 1993. Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 8246–8250.
69. Schwahn D.J., Xu W., Herrin A.B., Bales E.S., Medrano E.E. 2001. Tyrosine levels regulate the melanogenic response to alpha-melanocyte-stimulating hormone in human melanocytes: implications for pigmentation and proliferation. *Pigment Cell Res.* **14**, 32–39.
70. Roberts D.W., Newton R.A., Beaumont K.A., Helen Leonard J., Sturm R.A. 2006. Quantitative analysis of MC1R gene expression in human skin cell cultures. *Pigment Cell Res.* **19**, 76–89.
71. Siegrist W., Solca F., Stutz S., Giuffre L., Carrel S., Girard J., Eberle A.N. 1989. Characterization of receptors for alpha-melanocyte-stimulating hormone on human melanoma cells. *Cancer Res.* **49**, 6352–6358.
72. Salazar-Onfray F., Lopez M., Lundqvist A., et al. 2002. Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. *Br. J. Cancer.* **87**, 414–422.
73. Star R.A., Rajora N., Huang J., Stock R.C., Catania A., Lipton J.M. 1995. Evidence of autocrine modulation of macrophage nitric oxide synthase by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 8016–8020.
74. Thornwall M., Dimitriou A., Xu X., Larsson E., Chhajlani V. 1997. Immunohistochemical detection of the melanocortin 1 receptor in human testis, ovary and placenta using specific monoclonal antibody. *Horm. Res.* **48**, 215–218.
75. Bhardwaj R., Becher E., Mahnke K., Hartmeyer M., Schwarz T., Scholzen T., Luger T.A. 1997. Evidence for the differential expression of the functional alpha-melanocyte-stimulating hormone receptor MC-1 on human monocytes. *J. Immunol.* **158**, 3378–3384.
76. Lopez M.N., Pereda C., Ramirez M., Mendoza-Naranjo A., Serrano A., Ferreira A., Poblete R., Kalergis A.M., Kiessling R., Salazar-Onfray F. 2007. Melanocortin 1 receptor is expressed by uveal malignant melanoma and can be considered a new target for diagnosis and immunotherapy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 1219–1227.
77. Ren G., Pan Y., Cheng Z. 2010. Molecular probes for malignant melanoma imaging. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **11**, 590–602.
78. Chmielowiec J., Borowiak M., Morkel M., Stradal T., Munz B., Werner S., Wehland J., Birchmeier C., Birchmeier W. 2007. c-Met is essential for wound healing in the skin. *J. Cell Biol.* **177**, 151–162.
79. Mascarenhas J.B., Littlejohn E.L., Wolsky R.J., Young K.P., Nelson M., Salgia R., Lang D. 2010. PAX3 and SOX10 activate MET receptor expression in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 225–237.
80. Christensen J.G., Burrows J., Salgia R. 2005. c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Lett.* **225**, 1–26.
81. Li G., Schaidler H., Satyamoorthy K., Hanakawa Y., Hashimoto K., Herlyn M. 2001. Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene.* **20**, 8125–8135.
82. Kuba K., Matsumoto K., Date K., Shimura H., Tanaka M., Nakamura T. 2000. HGF/NK4, a four-kringle antagonist of hepatocyte growth factor, is an angiogenesis inhibitor that suppresses tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Res.* **60**, 6737–6743.
83. Burgess T., Coxon A., Meyer S., et al. 2006. Fully human monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor with therapeutic potential against hepatocyte growth factor/c-Met-dependent human tumors. *Cancer Res.* **66**, 1721–1729.
84. Naka D., Shimomura T., Yoshiyama Y., Sato M., Sato M., Ishii T., Hara H. 1993. Internalization and degradation of hepatocyte growth factor in hepatocytes with down-regulation of the receptor/c-Met. *FEBS Lett.* **329**, 147–152.
85. Hotz-Wagenblatt A., Shalloway D. 1993. Gap junctional communication and neoplastic transformation. *Crit. Rev. Oncog.* **4**, 541–558.
86. Mesnil M., Crespin S., Avanzo J.L., Zaidan-Dagli M.L. 2005. Defective gap junctional intercellular communi-

- cation in the carcinogenic process. *Biochim. Biophys. Acta.* **1719**, 125–145.
87. Johnson J.P. 1999. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* **18**, 345–357.
 88. Haass N.K., Smalley K.S., Li L., Herlyn M. 2005. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* **18**, 150–159.
 89. Shih I. M., Elder D.E., Speicher D., Johnson J.P., Herlyn M. 1994. Isolation and functional characterization of the A32 melanoma-associated antigen. *Cancer Res.* **54**, 2514–2520.
 90. Kraus A., Masat L., Johnson J.P. 1997. Analysis of the expression of intercellular adhesion molecule-1 and MUC18 on benign and malignant melanocytic lesions using monoclonal antibodies directed against distinct epitopes and recognizing denatured, non-glycosylated antigen. *Melanoma Res.* 7 Suppl 2, S75–81.
 91. Ouhitit A., Gaur R.L., Abd Elmageed Z.Y., Fernando A., Thouta R., Trappey A.K., Abdraboh M.E., El-Sayyad H.I., Rao P., Raj M.G. 2009. Towards understanding the mode of action of the multifaceted cell adhesion receptor CD146. *Biochim. Biophys. Acta.* **1795**, 130–136.
 92. Xie S., Luca M., Huang S., Gutman M., Reich R., Johnson J.P., Bar-Eli M. 1997. Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* **57**, 2295–2303.
 93. Mills L., Tellez C., Huang S., Baker C., McCarty M., Green L., Gudas J.M., Feng X., Bar-Eli M. 2002. Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Res.* **62**, 5106–5114.
 94. Rathjen F.G., Schachner M. 1984. Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO J.* **3**, 1–10.
 95. Thies A., Schachner M., Moll I., Berger J., Schulze H.J., Brunner G., Schumacher U. 2002. Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur. J. Cancer.* **38**, 1708–1716.
 96. Talantov D., Mazumder A., Yu J.X., Briggs T., Jiang Y., Backus J., Atkins D., Wang Y. 2005. Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions. *Clin. Cancer Res.* **11**, 7234–7242.
 97. Montgomery A.M., Becker J.C., Siu C.H., Lemmon V.P., Cheresch D.A., Pancook J.D., Zhao X., Reisfeld R.A. 1996. Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. *J. Cell Biol.* **132**, 475–485.
 98. Voura E.B., Ramjeesingh R.A., Montgomery A.M., Siu C.H. 2001. Involvement of integrin alpha(v)beta(3) and cell adhesion molecule L1 in transendothelial migration of melanoma cells. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 2699–2710.
 99. Meier F., Busch S., Gast D., Goppert A., Altevogt P., Maczey E., Riedle S., Garbe C., Schittek B. 2006. The adhesion molecule L1 (CD171) promotes melanoma progression. *Int. J. Cancer.* **119**, 549–555.
 100. Degen W.G., van Kempen L.C., Gijzen E.G., van Groningen J.J., van Kooyk Y., Bloemers H.P., Swart G.W. 1998. MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human melanoma cell lines, is identical to ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule). *Am. J. Pathol.* **152**, 805–813.
 101. Patel D.D., Wee S.F., Whichard L.P., Bowen M.A., Pesando J.M., Aruffo A., Haynes B.F. 1995. Identification and characterization of a 100-kD ligand for CD6 on human thymic epithelial cells. *J. Exp. Med.* **181**, 1563–1568.
 102. van Kempen L.C., van den Oord J.J., van Muijen G.N., Weidle U.H., Bloemers H.P., Swart G.W. 2000. Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am. J. Pathol.* **156**, 769–774.
 103. Klein W.M., Wu B.P., Zhao S., Wu H., Klein-Szanto A.J., Tahan S.R. 2007. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod. Pathol.* **20**, 102–107.
 104. van de Stolpe A., van der Saag P.T. 1996. Intercellular adhesion molecule-1. *J. Mol. Med.* **74**, 13–33.
 105. Johnson J.P., Stade B.G., Holzmann B., Schwable W., Riethmuller G. 1989. *De novo* expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 641–644.
 106. Schadendorf D., Gawlik C., Haney U., Ostmeier H., Suter L., Czarnetzki B.M. 1993. Tumour progression and metastatic behaviour in vivo correlates with integrin expression on melanocytic tumours. *J. Pathol.* **170**, 429–434.
 107. Natali P., Nicotra M.R., Cavaliere R., Bigotti A., Romano G., Temponi M., Ferrone S. 1990. Differential expression of intercellular adhesion molecule 1 in primary and metastatic melanoma lesions. *Cancer Res.* **50**, 1271–1278.
 108. Natali P.G., Hamby C.V., Felding-Habermann B., Liang B., Nicotra M.R., di Filippo F., Giannarelli D., Temponi M., Ferrone S. 1997. Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res.* **57**, 1554–1560.
 109. Miele M.E., Bennett C.F., Miller B.E., Welch D.R. 1994. Enhanced metastatic ability of TNF-alpha-treated malignant melanoma cells is reduced by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) antisense oligonucleotides. *Exp. Cell Res.* **214**, 231–241.
 110. Becker J.C., Termeer C., Schmidt R.E., Brocker E.B. 1993. Soluble intercellular adhesion molecule-1 inhibits MHC-restricted specific T cell/tumor interaction. *J. Immunol.* **151**, 7224–7232.
 111. Shafren D.R., Dorahy D.J., Greive S.J., Burns G.F., Barry R.D. 1997. Mouse cells expressing human intercellular adhesion molecule-1 are susceptible to infection by coxsackievirus A21. *J. Virol.* **71**, 785–789.
 112. Shafren D.R., Au G.G., Nguyen T., Newcombe N.G., Haley E.S., Beagley L., Johanson E.S., Hersey P., Barry R.D. 2004. Systemic therapy of malignant human melanoma tumors by a common cold-producing enterovirus, coxsackievirus a21. *Clin. Cancer Res.* **10**, 53–60.
 113. Au G.G., Lindberg A.M., Barry R.D., Shafren D.R. 2005. Oncolysis of vascular malignant human melanoma tumors by Coxsackievirus A21. *Int. J. Oncol.* **26**, 1471–1476.

114. Au G.G., Lincz L.F., Enno A., Shafren D.R. 2007. Oncolytic Coxsackievirus A21 as a novel therapy for multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **137**, 133–141.
115. Brummer J., Ebrahimnejad A., Flayeh R., Schumacher U., Loning T., Bamberger A. M., Wagener C. 2001. cis Interaction of the cell adhesion molecule CEACAM1 with integrin beta(3). *Am. J. Pathol.* **159**, 537–546.
116. Ebrahimnejad A., Streichert T., Nollau P., Horst A. K., Wagener C., Bamberger A.M., Brummer J. 2004. CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells. *Am. J. Pathol.* **165**, 1781–1787.
117. Thies A., Moll I., Berger J., Wagener C., Brummer J., Schulze H.J., Brunner G., Schumacher U. 2002. CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease. *J. Clin. Oncol.* **20**, 2530–2536.
118. Thies A., Berlin A., Brunner G., Schulze H.J., Moll I., Pfuller U., Wagener C., Schachner M., Altevogt P., Schumacher U. 2007. Glycoconjugate profiling of primary melanoma and its sentinel node and distant metastases: implications for diagnosis and pathophysiology of metastases. *Cancer Lett.* **248**, 68–80.
119. Pacifico M.D., Grover R., Richman P.I., Daley F.M., Buffa F., Wilson G.D. 2005. Development of a tissue array for primary melanoma with long-term follow-up: discovering melanoma cell adhesion molecule as an important prognostic marker. *Plast. Reconstr. Surg.* **115**, 367–375.
120. Pearl R.A., Pacifico M.D., Richman P.I., Wilson G.D., Grover R. 2008. 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.* **61**, 265–271.
121. Melnikova V.O., Bar-Eli M. 2006. Bioimmunotherapy for melanoma using fully human antibodies targeting MCAM/MUC18 and IL-8. *Pigment Cell Res.* **19**, 395–405.
122. Kamiguchi H., Long K.E., Pendergast M., Schaefer A.W., Rapoport I., Kirchhausen T., Lemmon V. 1998. The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J. Neurosci.* **18**, 5311–5321.
123. Muro S., Wiewrodt R., Thomas A., Koniaris L., Albelda S.M., Muzykantov V.R., Koval M. 2003. A novel endocytic pathway induced by clustering endothelial ICAM-1 or PECAM-1. *J. Cell Sci.* **116**, 1599–1609.
124. Piazza T., Cha E., Bongarzone I., Canevari S., Bolognesi A., Polito L., Bargellesi A., Sassi F., Ferrini S., Fabbi M. 2005. Internalization and recycling of AL-CAM/CD166 detected by a fully human single-chain recombinant antibody. *J. Cell Sci.* **118**, 1515–1525.
125. Bogoevska V., Horst A., Klampe B., Lucka L., Wagener C., Nollau P. 2006. CEACAM1, an adhesion molecule of human granulocytes, is fucosylated by fucosyltransferase IX and interacts with DC-SIGN of dendritic cells via Lewis x residues. *Glycobiology.* **16**, 197–209.
126. Campoli M.R., Chang C.C., Kageshita T., Wang X., McCarthy J.B., Ferrone S. 2004. 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.* **24**, 267–296.
127. Mittelman A., Chen Z.J., Yang H., Wong G.Y., Ferrone S. 1992. Human high molecular weight melanoma-associated antigen (HMW-MAA) mimicry by mouse anti-idiotypic monoclonal antibody MK2-23: induction of humoral anti-HMW-MAA immunity and prolongation of survival in patients with stage IV melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 466–470.
128. Goto Y., Arigami T., Murali R., et al. 2010. High molecular weight-melanoma-associated antigen as a biomarker of desmoplastic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 137–140.
129. Nishi H., Inoue Y., Kageshita T., Takata M., Ihn H. 2010. The expression of human high molecular weight melanoma-associated antigen in acral lentiginous melanoma. *Biosci. Trends.* **4**, 86–89.
130. Chan M.C., Murphy R.M. 1999. Kinetics of cellular trafficking and cytotoxicity of 9.2.27-gelonin immunotoxins targeted against the high-molecular-weight melanoma-associated antigen. *Cancer Immunol. Immunother.* **47**, 321–329.
131. Selbo P.K., Rosenblum M.G., Cheung L.H., Zhang W., Berg K. 2009. Multi-modality therapeutics with potent anti-tumor effects: photochemical internalization enhances delivery of the fusion toxin scFvMEL/rGel. *PLoS One.* **4**, e6691.
132. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* **414**, 105–111.
133. Schatton T., Frank M.H. 2008. Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **21**, 39–55.
134. La Porta C. 2009. Cancer stem cells: lessons from melanoma. *Stem Cell Rev.* **5**, 61–65.
135. Boiko A.D., Razorenova O.V., van de Rijn M., et al. 2010. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature.* **466**, 133–137.
136. 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. 2005. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* **65**, 9328–9337.
137. Dean M., Fojo T., Bates S. 2005. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer.* **5**, 275–284.
138. Frank N.Y., Margaryan A., Huang Y., Schatton T., Waaga-Gasser A.M., Gasser M., Sayegh M.H., Sadee W., Frank M.H. 2005. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res.* **65**, 4320–4333.
139. Monzani E., Facchetti F., Galmozzi E., et al. 2007. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential. *Eur. J. Cancer.* **43**, 935–946.
140. Schatton T., Murphy G.F., Frank N.Y., et al. 2008. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature.* **451**, 345–349.
141. Shmelkov S.V., Butler J.M., Hooper A.T., et al. 2008. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J. Clin. Invest.* **118**, 2111–2120.
142. Schatton T., Schutte U., Frank N.Y., et al. 2010. Modulation of T-cell activation by malignant melanoma initiating cells. *Cancer Res.* **70**, 697–708.

143. Ricci-Vitiani L., Lombardi D.G., Pilozzi E., Biffoni M., Todaro M., Peschle C., De Maria R. 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. **445**, 111–115.
144. Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D., Squire J.A., Bayani J., Hide T., Henkelman R.M., Cusimano M.D., Dirks P.B. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. **432**, 396–401.
145. Patrawala L., Calhoun T., Schneider-Broussard R., Zhou J., Claypool K., Tang D.G. 2005. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res*. **65**, 6207–6219.
146. Held M.A., Curley D.P., Dankort D., McMahon M., Muthusamy V., Bosenberg M.W. 2010. Characterization of melanoma cells capable of propagating tumors from a single cell. *Cancer Res*. **70**, 388–397.
147. Hoek K.S., Goding C.R. 2010. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. doi: 10.1111/j.1755-148X.2010.00757.
148. Jaeger J., Koczan D., Thiesen H.J., Ibrahim S.M., Gross G., Spang R., Kunz M. 2007. Gene expression signatures for tumor progression, tumor subtype, and tumor thickness in laser-microdissected melanoma tissues. *Clin. Cancer Res*. **13**, 806–815.
149. Timar J., Gyorffy B., Raso E. 2010. Gene signature of the metastatic potential of cutaneous melanoma: too much for too little? *Clin. Exp. Metastasis*. **27**, 371–387.
150. Kinsella A.R., Lepts G.C., Hill C.L., Jones M. 1994. Reduced E-cadherin expression correlates with increased invasiveness in colorectal carcinoma cell lines. *Clin. Exp. Metastasis*. **12**, 335–342.
151. Glinsky G.V., Berezovska O., Glinskii A.B. 2005. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J. Clin. Invest*. **115**, 1503–1521.
152. Berinstein N.L. 2009. Strategies to enhance the therapeutic activity of cancer vaccines: using melanoma as a model. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1174**, 107–117.
153. Dalerba P., Ricci A., Russo V., Rigatti D., Nicotra M.R., Mottolese M., Bordignon C., Natali P.G., Traversari C. 1998. High homogeneity of MAGE, BAGE, GAGE, tyrosinase and Melan-A/MART-1 gene expression in clusters of multiple simultaneous metastases of human melanoma: implications for protocol design of therapeutic antigen-specific vaccination strategies. *Int. J. Cancer*. **77**, 200–204.
154. Hall F.L., Gordon E.M., Wu L., Zhu N.L., Skotzko M.J., Starnes V.A., Anderson W.F. 1997. Targeting retroviral vectors to vascular lesions by genetic engineering of the MoMLV gp70 envelope protein. *Hum. Gene Ther.* **8**, 2183–2192.
155. Okada Y., Okada N., Nakagawa S., Mizuguchi H., Kanehira M., Nishino N., Takahashi K., Mizuno N., Hayakawa T., Mayumi T. 2002. Fiber-mutant technique can augment gene transduction efficacy and anti-tumor effects against established murine melanoma by cytokine-gene therapy using adenovirus vectors. *Cancer Lett.* **177**, 57–63.
156. Loir B., Perez Sanchez C., Ghanem G., Lozano J.A., Garcia-Borron J.C., Jimenez-Cervantes C. 1999. Expression of the MC1 receptor gene in normal and malignant human melanocytes. A semiquantitative RT-PCR study. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **45**, 1083–1092.
157. Funasaka Y., Sato H., Chakraborty A.K., Ohashi A., Chrousos G.P., Ichihashi M. 1999. Expression of proopiomelanocortin, corticotropin-releasing hormone (CRH), and CRH receptor in melanoma cells, nevus cells, and normal human melanocytes. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **4**, 105–109.
158. Vile R.G., Hart I.R. 1993. *In vitro* and *in vivo* targeting of gene expression to melanoma cells. *Cancer Res*. **53**, 962–967.
159. Vile R.G., Hart I.R. 1993. Use of tissue-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene to inhibit growth of established murine melanomas following direct intratumoral injection of DNA. *Cancer Res*. **53**, 3860–3864.
160. Vile R.G., Nelson J.A., Castleden S., Chong H., Hart I.R. 1994. Systemic gene therapy of murine melanoma using tissue specific expression of the HSVtk gene involves an immune component. *Cancer Res*. **54**, 6228–6234.
161. Nettelbeck D.M., Rivera A.A., Balague C., Alemany R., Curiel D.T. 2002. Novel oncolytic adenoviruses targeted to melanoma: specific viral replication and cytolysis by expression of E1A mutants from the tyrosinase enhancer/promoter. *Cancer Res*. **62**, 4663–4670.
162. Xu L., Huang C.C., Huang W., Tang W.H., Rait A., Yin Y.Z., Cruz I., Xiang L.M., Pirollo K.F., Chang E.H. 2002. Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 337–346.
163. Liu Y., Tao J., Li Y., et al. 2009. Targeting hypoxia-inducible factor-1alpha with Tf-PEI-shRNA complex via transferrin receptor-mediated endocytosis inhibits melanoma growth. *Mol. Ther.* **17**, 269–277.
164. Ziello J.E., Huang Y., Jovin I.S. 2010. Cellular endocytosis and gene delivery. *Mol. Med.* **16**, 222–229.
165. Ray P., White R.R. 2010. Aptamers for Targeted Drug Delivery. *Pharmaceuticals*. **3**, 1761–1778.
166. Altaner C. 2008. Prodrug cancer gene therapy. *Cancer Lett.* **270**, 191–201.
167. Portsmouth D., Hlavaty J., Renner M. 2007. Suicide genes for cancer therapy. *Mol. Aspects Med.* **28**, 4–41.
168. Seth P. 2005. Vector-mediated cancer gene therapy: an overview. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 512–517.
169. Fillat C., Carrio M., Cascante A., Sangro B. 2003. Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr. Gene Ther.* **3**, 13–26.
170. Greco O., Dachs G.U. 2001. Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future perspectives. *J. Cell Physiol.* **187**, 22–36.