

УДК 577

Аптамеры: проблемы, пути их решения и перспективы

А. В. Лахин*, В. З. Тарантул, Л. В. Генинг

Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Курчатова, 2

*E-mail: lahin9@mail.ru

Поступила в редакцию 05.03.2013

РЕФЕРАТ Аптамеры – короткие одноцепочечные олигонуклеотиды, способные с высокой аффинностью и специфичностью связываться с молекулами различной природы. Когда почти четверть века назад была разработана технология получения аптамеров, сразу же предположили, что она может послужить революционизирующим началом для решения многих проблем диагностики и терапии разнообразных заболеваний. Многочисленные попытки практического использования аптамеров, хотя и были иногда успешными, однако в целом результаты оказались значительно скромнее, чем ожидалось. Настоящий обзор посвящен главным образом не успехам в использовании аптамеров, а тем проблемам, которые затрудняют их широкое применение в терапии и диагностике, и тем подходам, которые могут существенно повлиять на расширение областей применения аптамеров.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА SELEX, аптамер, диагностика, терапия, проблемы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИОП – исходный олигонуклеотидный пул; миРНК – малые интерферирующие РНК; НК – нуклеиновая кислота; PEG – полиэтиленгликоль; SELEX – Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment.

ВВЕДЕНИЕ

Долгое время нуклеиновые кислоты (НК) рассматривались лишь как химические соединения, основными функциями которых являются хранение наследственной информации (ДНК) и передача этой информации от гена к белку (РНК). Однако со временем начали появляться сведения о способности НК к выполнению других специфических функций, таких, как ферментативный катализ (рибозимы) и регуляция процессов транскрипции. Подобных примеров обнаруживалось все больше и больше, что заставило ученых пересмотреть свое первоначальное отношение к функциям НК. В результате на основании имеющихся данных была сформулирована теория мира РНК («The RNA world theory») [1, 2]. Согласно этой теории, НК потенциально способны к выполнению самых разнообразных функций и, вероятно, обеспечивали все необходимые каталитические реакции во времена зарождения жизни [3]. Весомым вкладом в подтверждение многофункциональности НК стало и обнаружение олигонуклеотидов, способных специфически связываться с разнообразными молекулами-мишенями. Эти олигонуклеотиды получили название аптамеры [4, 5].

Аптамеры представляют собой небольшие (обычно от 20 до 60 нуклеотидов) одноцепочечные молекулы РНК или ДНК, способные с высокой аффинностью и специфичностью связываться

с молекулой-мишенью. К настоящему моменту получено большое количество аптамеров к самым разным мишеням, начиная от простых неорганических молекул и заканчивая сложными белковыми комплексами и целыми клетками. По сути, аптамеры представляют собой нуклеотидные аналоги антител, однако, получение аптамеров – процесс значительно более простой и существенно менее дорогостоящий, чем получение антител [6, 7]. Кроме того, аптамеры не обладают иммуногенностью и токсичностью [8]. Все это делает аптамеры идеальными кандидатами для применения в терапии, диагностике, очистке молекул-мишеней из сложных смесей, создании биосенсоров и др. [9, 10]. Области применения аптамеров настолько обширны и разнообразны, что новые работы, посвященные их применению, публикуются почти каждый день. Для систематизации огромного объема получаемой информации создана специализированная база данных, позволяющая быстро найти всю необходимую информацию по многим известным аптамерам (<http://aptamer.icmb.utexas.edu>).

Основы современной технологии получения аптамеров были впервые описаны более 20 лет назад [11, 12]. Обычно аптамеры отбирают из олигонуклеотидного пула, называемого исходным олигонуклеотидным пулом (ИОП), который содержит 10^{14} – 10^{15} вариантов олигонуклеотидов. Довольно часто ИОП называют комбинаторной библиотекой, что не со-

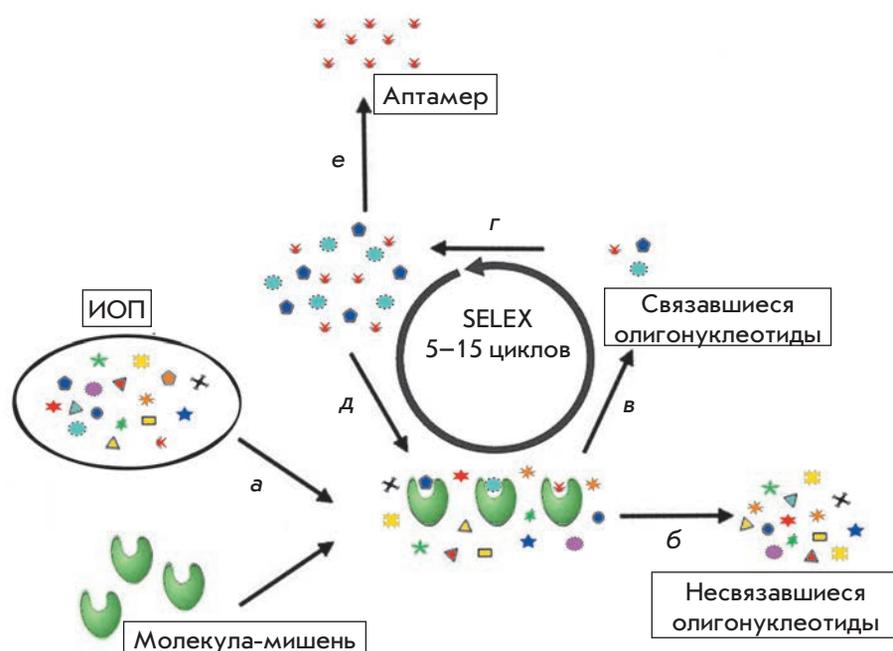


Рис. 1. Схема процедуры отбора аптамеров SELEX: а – инкубация исходного пула олигонуклеотидов с молекулой-мишенью; б – удаление несвязавшихся олигонуклеотидов; в – отделение связавшихся олигонуклеотидов от молекулы-мишени; г – амплификация элюированных олигонуклеотидов в ходе не-симметричной ПЦР (ДНК-SELEX) или ОТ-ПЦР с последующей транскрипцией (РНК-SELEX); д – инкубация обогатившегося пула с молекулой-мишенью; е – клонирование аптамеров, полученных после проведения 5–15 раундов SELEX

всем корректно, поскольку библиотека, по определению содержащая набор всех возможных вариантов олигонуклеотидов, слишком огромна для практического использования (в относительно небольшой библиотеке это как минимум 10^{18} вариантов олигонуклеотидов). ИОП представляет собой аликвоту химически синтезированной комбинаторной библиотеки и содержит определенным образом подготовленные для связывания с молекулой-мишенью олигонуклеотиды в виде одноцепочечных ДНК или РНК. Олигонуклеотиды в составе ИОП включают в себя переменный участок длиной 30–50 нуклеотидов (в каждом положении может находиться любой из четырех нуклеотидов). Переменный участок фланкирован константными участками, позволяющими осуществлять с олигонуклеотидами все необходимые манипуляции, такие, как амплификация и транскрипция. Следует отметить, что РНК-аптамеры по сравнению с ДНК-аптамерами обеспечивают образование значительно большего структурного разнообразия, хотя их применение и сопряжено с определенными трудностями (молекулы РНК легко деградируют под воздействием разнообразных факторов, таких, как РНКазы, высокая температура, щелочная среда и т.д.) [13, 14].

Классическая процедура получения аптамеров, названная SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment), условно состоит из двух чередующихся этапов (рис. 1). Первый этап заключается в амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) имеющихся олигонуклеотидов до нужной концентрации. В случае отбора РНК-

аптамеров пул одноцепочечных олигорибонуклеотидов получают в результате транскрипции *in vitro* двухцепочечной ДНК с использованием Т7-РНК-полимеразы. При отборе ДНК-аптамеров пул одноцепочечных олигодезоксирибонуклеотидов получают разделением цепей двухцепочечных продуктов ПЦР. На втором этапе амплифицированный пул инкубируют с молекулой-мишенью и олигонуклеотиды, образовавшие с ней комплекс, используют для первого этапа следующего цикла SELEX [7, 15].

Отбор олигонуклеотидов с большей аффинностью и отделение несвязавшихся с молекулой-мишенью олигонуклеотидов с меньшей аффинностью происходит благодаря жесткой конкуренции за место связывания. С каждым раундом SELEX давление отбора увеличивается, в результате в среднем через 5–15 циклов образуется максимально обогащенный пул, содержащий аптамеры с наибольшим сродством к молекуле-мишени [16, 17]. Технология SELEX применима не только для отбора аптамеров, способных связываться с молекулой-мишенью, но и для отбора олигонуклеотидов, обладающих определенной ферментативной активностью. В данном случае критерием отбора служит способность аптамера катализировать такую реакцию [18, 19].

ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АПТАМЕРОВ И ПУТИ ИХ ПРЕОДОЛЕНИЯ

С использованием аптамеров связан ряд проблем, на что и обращено основное внимание в нашем обзоре. Рассмотрим основные трудности, мешающие широкому практическому применению аптамеров.

Проблема № 1. Деградация аптамеров

Серьезной проблемой использования аптамеров для практических целей (особенно РНК-аптамеров) является их быстрая деградация нуклеазами в биологических средах, в частности в сыворотке крови. Так, для распада олигонуклеотида в крови требуется в среднем от нескольких минут до нескольких десятков минут в зависимости от конформационной структуры олигонуклеотида и его концентрации. Поскольку данный промежуток времени мал и неприемлем для большинства терапевтических целей, то разработан ряд приемов, направленных на защиту аптамера от деградации нуклеазами.

Один из стандартных способов получения устойчивых к нуклеазам аптамеров – проведение процедуры SELEX с олигонуклеотидами, в состав которых входят модифицированные нуклеотиды (рис. 2). В основе получения таких олигонуклеотидов лежит применение специальных ДНК- или РНК-полимераз, способных в качестве субстрата использовать, например, модифицированные по 2'-положению сахара нуклеозидтрифосфаты. В настоящий момент с этой целью успешно применяют 2'-аминопиримидиннуклеозиды [20, 21], 2'-фторпиримидиннуклеозиды [22, 23], 2'-О-метилпурииннуклеозиды и 2'-О-метилпиримидиннуклеозиды [24, 25]. Наглядным примером использования некоторых модификаций нуклеотидов может служить единственный разрешенный к применению в медицинской практике аптамер, известный как Macugen (рис. 3) [26]. Модификация нуклеотидов может быть проведена и после процедуры SELEX непосредственно в составе аптамера, но в этом случае дополнительные функциональные группы могут повлиять на специфичность и аффинность связывания аптамера. Тем не менее некоторые модификации способны увеличивать устойчивость аптамеров к нуклеазам и при этом не влиять на параметры связывания с молекулой-мишенью. Самой распространенной и эффективной модификацией подобного рода является модификация терминальных 3'- и 5'-нуклеотидов в олигонуклеотидах [27]. Аптамеры, вообще не содержащие модифицированных нуклеотидов, иногда также могут проявлять очень хорошую устойчивость к деградации нуклеазами в сыворотке крови [28]. Это свойство, по-видимому, обусловлено образованием специфических трехмерных структур, экранирующих 3'- и 5'-концы аптамера от доступа к ним экзонуклеаз.

Хорошей устойчивостью к нуклеазному расщеплению обладают замкнутые в кольцо аптамеры, полученные в ходе лигирования 3'- и 5'-концов одного и того же аптамера. Замыкаться могут и несколько различных аптамеров, что обеспечивает множественную специфичность такой конструкции [29, 30].

Модификация 5'-конца
(устойчивость к 5'-экзонуклеазам)



Рис. 2. Основные модификации нуклеотидов в аптамерах, обеспечивающие устойчивость аптамеров к деградации нуклеазами

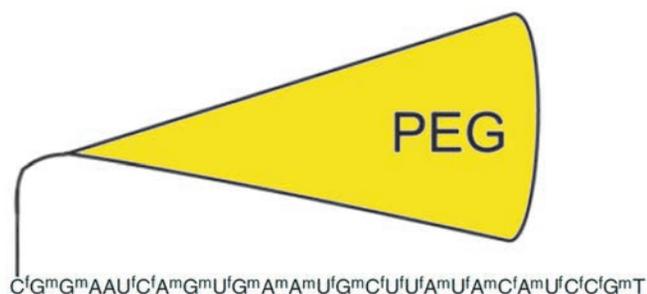
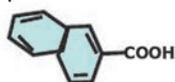


Рис. 3. Структура первого разрешенного к клиническому применению аптамера Macugen. Используются следующие модификации нуклеотидов: f – 2'-фторнуклеотид, m – 2'-О-метилнуклеотид. Чтобы избежать быстрого выведения аптамера через почки, к нему на 5'-конце добавлен PEG массой 40 кДа [26]

Подобный подход создания кольцевых аптамеров оптимален в тех случаях, когда может потребоваться систематическое введение в организм больших доз аптамера. Связано это с тем, что аптамеры, содержащие некоторые модификации нуклеотидов, при деградации потенциально могут образовывать вещества, обладающие определенной токсичностью [31].

Оригинальным подходом к решению проблемы нуклеазной деградации аптамеров стало получение зеркально отображенных аптамеров – шпигельмеров (Spiegelmer), в которых олигонуклеотидный остов полностью состоит из L-рибозы (РНК-шпигельмеры) или L-дезоксирибозы (ДНК-шпигельмеры). Их создание основано на том факте, что нуклеа-

Низкомолекулярное
соединение



Аптамер



Белок-мишень

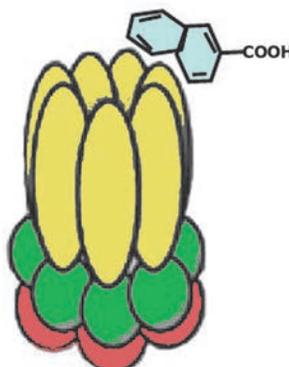


Рис. 4. Метод поиска веществ, вытесняющих аптамер из места связывания (aptamer displacement screening). В ходе данной процедуры из большого количества разнообразных низкомолекулярных соединений отбираются молекулы, способные конкурировать с аптамером за место связывания

зы способны эффективно расщеплять только *D*-, а не *L*-олигонуклеотиды, которые в природе не встречаются. Однако, если аптамер с известной первичной структурой просто синтезировать из *L*-нуклеотидов, то такой аптамер будет способен связываться лишь с несуществующим в природе энантиомерным белком, содержащим *D*-аминокислоты. Для решения данной проблемы предложено сначала отбирать аптамеры, в состав которых входят *D*-нуклеотиды к синтезированному (*D*)-белку. Затем, определив первичную структуру полученных аптамеров, их можно синтезировать в виде шпигельмеров, которые будут связываться уже с (*L*)-белком-мишенью, встречающимся в организме. Такие шпигельмеры обладают крайне высокой стабильностью и почти не поддаются ферментативной деградации [32, 33].

Избежать проблем с деградацией аптамеров позволяет и недавно разработанный метод «aptamer displacement screening», заключающийся в скрининге низкомолекулярных соединений, способных вытеснять аптамер из места его связывания с белком-мишенью (рис. 4). Предполагается, что отобранное в результате этой процедуры вещество будет обладать той же специфичностью и аффинностью. Показано, что полученные таким образом низкомолекулярные соединения часто оказывают такое же ингибирующее действие на белок-мишень, как и аптамеры [34, 35].

Проблема № 2. Выведение аптамеров из кровотока в результате почечной фильтрации

Серьезную проблему для применения аптамеров в терапии представляет их удаление из кровотока в ходе

почечной фильтрации. Поскольку масса большинства аптамеров находится в пределах 5–15 кДа (15–50 нуклеотидов), то они быстро выводятся почками, способными удалять вещества массой до 30–50 кДа. Самым распространенным решением данной проблемы является конъюгирование аптамеров с полиэтиленгликолем (PEG) массой 20 или 40 кДа (рис. 3). В настоящее время конъюгирование с PEG широко применяется для увеличения времени циркуляции в кровотоке не только олигонуклеотидов, но и белков, пептидов и низкомолекулярных соединений [36, 37]. Показано, что конъюгированные с PEG аптамеры выводятся из кровотока значительно медленнее (до нескольких дней) и при этом не теряют свою специфичность. Кроме того, такие конъюгированные аптамеры более эффективно распределяются по тканям и органам [38, 39]. Альтернативный вариант решения проблемы почечной фильтрации – конъюгирование аптамеров с молекулами холестерина, что также значительно увеличивает время их циркуляции в кровотоке [40].

Проблема № 3. Контроль времени действия аптамеров

Крайне важным условием применения любого препарата в терапии является его фармакокинетика и, в частности, время действия, всегда обусловленное многочисленными факторами, такими, как деградация, вовлеченность в различные метаболические процессы, выведение почками и т.д. Все эти факторы должны учитываться перед назначением препарата, что порой сильно ограничивает его применение. Использование аптамеров в качестве терапевтических

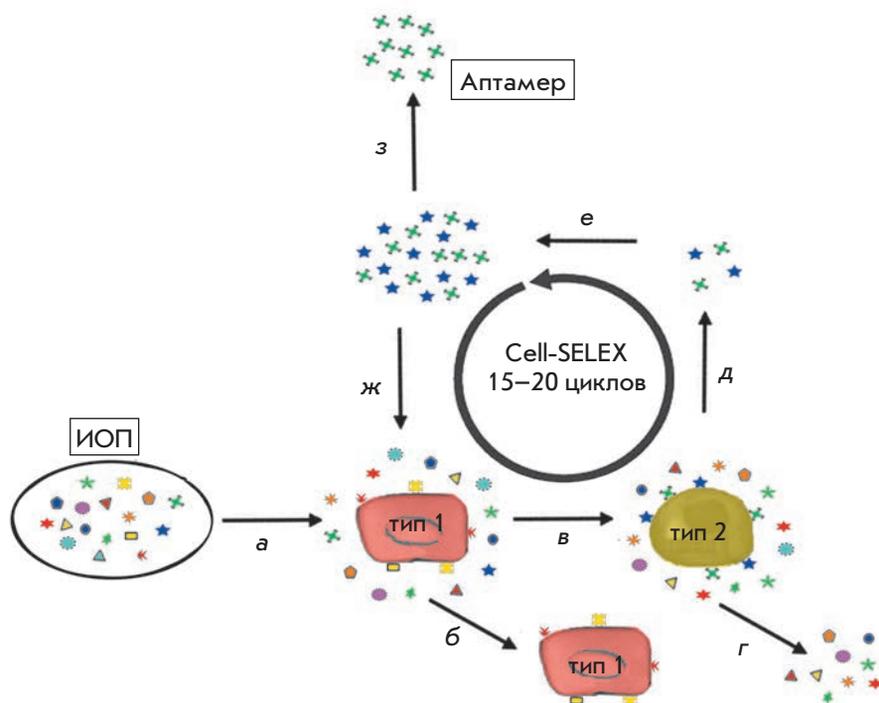


Рис. 6. Схема Cell-SELEX: а – инкубация ИОП с клетками типа 1, с которыми полученные аптамеры не должны связываться – негативная селекция; б – удаление связавшихся с клетками типа 1 олигонуклеотидов; в – инкубация олигонуклеотидов, не связавшихся с клетками типа 1, с клетками типа 2 – позитивная селекция; г – удаление не связавшихся с клетками типа 2 олигонуклеотидов; д – отделение связавшихся олигонуклеотидов от клеток типа 2; е – амплификация элюированных олигонуклеотидов в ходе несимметричной ПЦР (ДНК-SELEX) или ОТ-ПЦР с последующей транскрипцией (РНК-SELEX); ж – инкубация обогащенного пула с клетками типа 1; з – клонирование аптамеров, полученных после проведения 15–20 раундов Cell-SELEX

зываемых также интрамерами) можно не только за счет высокого уровня экспрессии, обеспечиваемого сильным промотором, но и в результате снижения скорости нуклеазной деградации интрамера (экранирование 3'- и 5'-концов с помощью таких дополнительных структурных элементов, как, например, шпильки) [50].

Другой подход к решению проблемы взаимодействия аптамеров с внутриклеточными молекулами-мишенями – проникновение аптамеров в клетки из кровотока в результате рецептор-зависимого эндоцитоза [55, 56]. Например, аптамеры, связывающиеся с простат-специфичным мембранным антигеном (prostate-specific membrane antigen, PSMA), позволяют за счет их эндоцитоза эффективно и избирательно доставлять конъюгированные терапевтические агенты в клетки опухолей, содержащих на своей поверхности такие антигены [57, 58].

Проблема № 5. Получение аптамеров к неочищенным белкам-мишеням

В большинстве случаев для получения аптамеров необходимо присутствие очищенных молекул-мишеней. Если этой молекулой-мишенью является белок, то его необходимо экспрессировать в культуре клеток, а затем очистить из экстракта в ходе таких процедур, как аффинная хроматография. Все это весьма трудоемко и требует много времени, что негативно сказывается на скорости получения

аптамеров. Кроме того, некоторые белки в силу их физико-химических свойств крайне сложно выделить. Существуют также данные, указывающие на то, что аптамеры, подобранные к экспрессированным в клетках прокариот белкам-мишеням, не всегда способны взаимодействовать с теми же белками, но синтезированными в эукариотических клетках. Это связано с тем, что многие эпитопы эукариотических белков вследствие посттрансляционных модификаций могут быть недоступны для взаимодействия с аптамерами, полученными к белкам в прокариотической клетке [59].

Если белок-мишень находится на поверхности клеток, то одним из подходов к решению этой проблемы может быть модификация процедуры SELEX, позволяющая вести отбор к целым клеткам – Cell-SELEX [60, 61] (рис. 6). В этом варианте отбирают аптамеры на специфические белковые маркеры, расположенные непосредственно на поверхности живых клеток. Можно отбирать аптамеры и на специфические маркеры целых организмов. Например, получены аптамеры, позволяющие избирательно выявлять присутствие в организме тех или иных паразитов, таких, как трипаносомы [62, 63]. В основе Cell-SELEX лежит дополнительный этап процедуры отбора аптамеров – негативная селекция, проводимая к мишени (как правило, родственная клеточная линия), с которой не должны связываться финальные аптамеры. Одно из преи-

мушеств Cell-SELEX состоит в том, что для отбора аптамеров не нужна информация по белковым маркерам, специфичным для клеток данного типа. Если негативный отбор ведется на нормальных клетках, а позитивный – на тех же клетках, только трансформированных, то все получаемые аптамеры будут связываться с маркерными белками опухолевых клеток этого типа. Данное достижение очень важно, поскольку одна из главнейших задач настоящего времени – разработка методов ранней диагностики опухолевых клеток.

В основе онкологических заболеваний лежат генетические изменения, которые возникают в результате мутаций и приводят к изменениям сначала на молекулярном (паттерны экспрессии белков) и лишь затем на морфологическом уровне. Классические методы диагностики рака основаны преимущественно на изменениях в морфологии клеток и тканей, что часто не позволяет выявлять онкологические заболевания на ранних стадиях. С данной задачей способны эффективно справиться аптамеры, полученные к опухолевым клеткам в результате Cell-SELEX. Такие аптамеры, размещенные на микрочипах, позволяют обнаруживать в крови даже крайне незначительное содержание злокачественных клеток [64, 65]. Аптамеры, отобранные на конкретные белковые опухолевые маркеры и конъюгированные с частицами золота, эффективно применяются в качестве контрастных агентов для выявления определенных типов рака [66, 67].

Разработаны также подходы к отбору аптамеров к внутриклеточным белкам-мишеням, находящимся в экстрактах клеток [68, 69]. Если относительное содержание интересующего белка в исходном экстракте мало, то в процедуру SELEX обязательно должна быть включена стадия негативного отбора с экстрактами близкородственных клеток, в которых данный белок отсутствует. В результате олигонуклеотидный пул будет обогащаться только теми аптамерами, которые связываются с белками, представленными в исходном экстракте, но отсутствуют в экстракте негативного контроля. Кроме того, если содержание целевого белка в экстракте высоко и составляет 1–10% от всех белков, то SELEX может не включать стадию негативного отбора, что существенно упрощает получение аптамеров [68, 69]. Такая модификация процедуры SELEX потенциально позволяет в минимальные сроки получить аптамеры к уникальным для исследуемого типа клеток внутриклеточным белкам. Затем с помощью аптамеров и аффинной хроматографии можно выделить из экстрактов целевые белки в нативном виде и охарактеризовать их [70]. Это может оказаться полезным при изучении свойств очищенных ферментов, по-

скольку в рекомбинантных белках дополнительные части (GST-, His-теги и др.) могут непредсказуемо сказаться на свойствах белка [71].

Одним из наиболее новых и перспективных подходов к решению проблемы получения аптамеров к белкам-мишеням, специфичным для конкретной ткани, является *in vivo* SELEX [72]. В ходе данной процедуры устойчивый к нуклеазному расщеплению пул олигонуклеотидов вводится непосредственно в кровотоки организма, содержащего ткань определенного типа, например опухоль. Спустя заданное время эту ткань извлекают и экстрагируют из нее олигонуклеотиды, которые амплифицируют и затем снова вводят в целевой организм. Эту процедуру повторяют несколько раз и в результате получают набор аптамеров, способных специфично в условиях *in vivo* мигрировать и накапливаться в тканях определенного типа. Многие аптамеры, полученные таким способом, обладают также способностью проникать в клетки и связываться с внутриклеточными мишенями [72]. Огромным преимуществом *in vivo* SELEX является то, что в результате отбираются только те аптамеры, которые не только специфически связываются с определенной тканью, но и способны избежать неспецифического связывания с белками клеточных стенок и компонентами сложной белковой смеси в крови.

Проблема № 6. Кросс-реактивность аптамеров

Несмотря на потенциально высокую специфичность, аптамеры к определенным молекулам-мишеням могут связываться и с некоторыми другими структурно родственными молекулами. Так, в нашей лаборатории получены четыре аптамера к ДНК-полимеразе β [73], которые, помимо связывания с самой ДНК-полимеразой β и ингибирования ее активности, связывались также с ДНК-полимеразой k , принадлежащей другому семейству эукариотических ДНК-полимераз, и также ингибировали ее активность. Кросс-реактивность может стать серьезным препятствием для использования аптамеров в терапии из-за возможного побочного действия, обусловленного взаимодействием аптамеров с другими белками. Тем не менее можно предположить, что более продуманная процедура SELEX, включающая, например, этапы негативного отбора к родственным молекулам, вполне способна обеспечить создание аптамеров с необходимой специфичностью. Отчасти данное предположение подтверждают результаты, полученные в нашей лаборатории. С использованием более жесткого проведения SELEX получен аптамер к ДНК-полимеразе ι , обладающий высокой специфичностью и не связывающийся ни с ДНК-полимеразой k , ни с ДНК-полимеразой β [74].

Проблема № 7. Автоматизация получения аптамеров

Несмотря на внешне относительную методическую простоту, процесс получения аптамеров достаточно трудоемкий и длительный. Кроме того, довольно часто возможен отбор не самых аффинных и специфичных аптамеров, что случается из-за недостаточной оптимизации некоторых этапов SELEX. Для решения данных проблем предпринимаются довольно успешные попытки полностью автоматизировать SELEX [75, 76]. В результате у исследователя появляется возможность получения аптамеров с заданными свойствами в течение всего лишь нескольких дней.

Кроме того, разработаны методики, позволяющие получать аптамеры всего за один раунд отбора. Эта процедура получила название CE-SELEX (capillary electrophoresis SELEX), в основе которой лежит модифицированная стадия отделения связанных с белком-мишенью аптамеров от несвязанных. Фракционирование происходит в результате неравновесного капиллярного электрофореза равновесных смесей (nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures, NECEEM) и позволяет не только ускорить всю процедуру отбора до 1–2 дней, но также получить аптамеры со строго заданными параметрами связывания, такими, как K_d , K_{off} и K_{on} [77, 78].

СОВРЕМЕННОЕ ПОЛОЖЕНИЕ АПТАМЕРОВ В ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ

Моно- и поликлональные антитела в настоящее время являются незаменимыми инструментами в диагностике разнообразных заболеваний. Однако во многих случаях, когда требуется эффективное и специфичное взаимодействие с молекулой-мишенью (диагностируемым маркером), аптамеры уже сейчас успешно заменяют антитела [79, 80]. Например, разработаны протоколы, позволяющие с помощью аптамеров со значительно большей эффективностью, чем при использовании антител в Вестерн-блоттинге, детектировать иммобилизованные на мембране белки [81, 82]. Использование аптамеров вместо антител в процедурах типа ELISA не только упрощает обнаружение белка, но и обеспечивает гораздо большую чувствительность [83, 84]. С помощью иммобилизованных аптамеров, как и с помощью антител, можно выделять белки-мишени [85, 86]. Одно из преимуществ аптамеров над антителами состоит в том, что аптамеры можно отбирать к неиммуногенным или высокотоксичным веществам [87, 88].

Аптамеры также применяются при создании биосенсоров в качестве распознающих элементов [89, 90]. Небольшой размер аптамеров (в 10–100 раз меньше антител) позволяет разместить на поверх-

ности биосенсоров значительно большее их количество на меньшей площади. Это увеличивает эффективность обнаружения различных белков-биомаркеров при использовании значительно меньшего количества диагностируемой жидкости, такой, например, как сыворотка крови. Кроме того, биосенсоры на основе аптамеров могут использоваться не один раз, а многократно, без потери чувствительности [91, 92], что обусловлено присущей всем нуклеиновым кислотам способностью к денатурации и ренатурации.

Низкая стоимость производства, отсутствие иммуногенности и возможность проводить различные модификации сделали аптамеры крайне перспективными кандидатами для применения в качестве терапевтических средств. Основа использования аптамеров в данной области – способность ингибировать ферментативную активность того белка-мишени, с которым связался аптамер. Ингибирование ферментативной активности может быть обусловлено как взаимодействием аптамера с активным центром фермента, так и в результате спровоцированных взаимодействием с аптамером конформационных изменений в структуре белка [93, 74]. Однако взаимодействие с аптамером не всегда приводит к ингибированию фермента. Иногда наблюдается обратная ситуация: фермент переходит из неактивной формы в активную [94, 95], что обусловлено сходством действия аптамера и активирующего лиганда по отношению к белку.

Аптамеры активно пытаются использовать и для лечения вирусных инфекций. К настоящему моменту получены аптамеры ко многим белкам таких вирусов, как вирус иммунодефицита человека, вирусы гепатита С, гриппа и др. [96, 97]. Несмотря на эффективность связывания и ингибирования многих жизненно важных вирусных белков (обратные транскриптазы, интегразы и др.), не до конца решенной остается проблема эффективной доставки аптамера или аптамерэкспрессирующего вектора в клетку. Иная ситуация наблюдается при применении аптамеров, связывающихся с белками вирусного капсида. Показано, что такое связывание приводит к подавлению способности вируса взаимодействовать с рецепторными белками клетки и, следовательно, проникать внутрь клетки [98, 99]. В данном случае возможная профилактика или терапия вирусной инфекции сильно упрощается и может заключаться либо в обработке участков кожи, через которые проникает вирус, аптамерсодержащим раствором или мазью (так называемые микробициды), либо во внутривенном введении аптамера.

Конъюгирование аптамеров, полученных к белковым маркерам клеток определенного типа, с те-

рапевтическим агентом также предоставляет ряд уникальных возможностей. Одна из таких возможностей – доставка лекарственного средства непосредственно к тому типу клеток, который несет на поверхности специфические белковые маркеры. В качестве терапевтического агента могут быть применены:

а) крайне токсичные вещества, не позволяющие применять их в высоких терапевтических дозах. Конъюгированные с аптамером и введенные в низких концентрациях, токсины будут накапливаться строго в определенном месте (например, в опухоли) и создавать в этом месте необходимую терапевтическую концентрацию. К этой группе можно отнести радиоактивные и высокотоксичные вещества [100, 101];

б) быстро деградирующие и быстро выводятся вещества, такие, как миРНК. Доставка миРНК в ткань определенного типа за счет аптамера способна решить одно из главных ограничений их применения в терапии [102, 103];

в) наночастицы, активно исследуемые в качестве потенциальных переносчиков лекарственных средств в район опухоли. На животных моделях показана низкая эффективность доставки лекарственных средств в опухолевую ткань с использованием конъюгированных наночастиц с антителами. Это связано с тем, что в кровотоке такие крупные конъюгаты быстро поглощаются фагоцитарной системой и, кроме того, проявляют низкую способность к проникновению в твердые опухоли. Эти проблемы могут быть решены при использовании аптамеров, конъюгированных с наночастицами, за счет их гораздо меньшего размера и соответственно большей проникающей способности [104, 105]. Применение аптамеров, конъюгированных с липосомами, для направленной доставки терапевтических средств в опухолевые клетки представляется наиболее перспективным направлением в данной области, и к настоящему моменту в некоторых случаях оно показало свою высокую эффективность [106, 107];

г) эндогенные ферменты. Конъюгирование ферментов с аптамерами может оказаться крайне полезным для доставки в те клетки, в которых эти ферменты либо отсутствуют, либо не работают должным образом, с последующим потенциальным восстановлением функций клеток [108].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аптамеры представляют собой особый класс соединений, обладающих набором уникальных свойств, они характеризуются преимуществами, присущими как низкомолекулярным агентам, так и агентам белковой природы. Например, аптамеры обладают аффинностью и специфичностью, не уступающей

моноклональным антителам. В то же время благодаря малому размеру аптамеры проявляют высокую проникающую способность и не обладают иммуногенностью, что присуще низкомолекулярным веществам. Тем не менее аптамеры до сих пор не получили широкого применения. За двадцать с лишним лет, прошедшие со времени разработки процедуры SELEX, разрешение на использование в медицинской практике получил лишь один аптамер, известный как Macugen, или Pegaptanib (рис. 3). Этот аптамер связывается с фактором роста сосудистого эндотелия (VEGF), блокируя рост аномальных кровеносных сосудов глаза и предотвращая кровоизлияния и потерю зрения [26, 109].

Принимая во внимание все достоинства аптамеров, странной может показаться незначительная их доля среди современных терапевтических препаратов. Однако стоит учитывать, что аптамеры представляют собой довольно новый класс веществ, а разработка всевозможных протоколов, направленных на адаптацию аптамеров к тем или иным задачам, занимает много времени. Подобная ситуация наблюдалась и в случае широко распространенных сегодня антител. Моноклональные антитела были получены в 1975 году, но лишь в 1986 году первый препарат на основе антител был одобрен Управлением по контролю за продуктами и лекарственными средствами (FDA, Food and Drug Administration, США). В 1994 году поступил в продажу второй препарат и только после этого начался их широкомасштабный выпуск (сейчас разрешено применение в терапии порядка двух десятков антител). Выходу любого препарата в продажу всегда предшествует этап всевозможных клинических испытаний, часто продолжающийся более 10 лет. Проведение многочисленных клинических испытаний требует огромных затрат и может быть обеспечено лишь очень крупными фармакологическими компаниями, способными затрачивать сотни миллионов долларов на исследования. Однако стоит отметить, что за первый же год после появления препарата Macugen на рынке (2005 г.) его было продано на сумму свыше 200 млн долларов. Этот факт служит хорошим стимулом для интенсификации исследований и создания новых лекарственных препаратов на основе аптамеров.

Применение аптамеров в диагностике имеет значительно меньшие ограничения, чем в терапии, поскольку отсутствует непосредственная угроза здоровью людей. На наш взгляд, основным препятствием широкому распространению аптамеров в данной области является отсутствие стандартизации аптамеров в разрабатываемых протоколах. Так, полученные в разных лабораториях аптамеры к одной и той же молекуле-мишени, помимо различий в первичной

структуре, почти наверняка будут различаться и такими параметрами, как аффинность, специфичность и другие кинетические характеристики. Поэтому разработанный протокол при использовании одного аптамера может давать полностью адекватные результаты, в случае второго аптамера результаты могут быть менее достоверными. Это особенно актуально в диагностике различных заболеваний человека, где некорректные результаты анализов могут привести к весьма нежелательным последствиям. В условиях постоянно снижающейся стоимости химического синтеза нуклеиновых кислот и наличия баз данных аптамеров ко все возрастающему числу молекул-мишеней оптимальной стратегией становится не получение нового аптамера, а синтез и использование уже описанного. Можно надеяться, что выявление

конкретной молекулы-мишени с помощью только одного аптамера с наилучшими параметрами связывания в скором будущем обусловит широкое применение аптамеров в диагностике.

К настоящему моменту найдено то или иное решение почти всех проблем, возникающих при работе с аптамерами. Поэтому можно предположить, что благодаря ряду уникальных свойств аптамеры в скором времени займут достойное место как в наборе инструментов современного ученого, так и среди терапевтических и диагностических препаратов. ●

Работа поддержана программой «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН и РФФИ (гранты № 13-04-00598 и 13-04-00642).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gilbert W. // Nature. 1986. V. 319. P. 618.
- Gold L., Janjic N., Jarvis T., Schneider D., Walker J.J., Wilcox S.K., Zichi D. // Cold Spring. Harb. Perspect. Biol. 2012. V. 4. P. a003582.
- Cheng L.K., Unrau P.J. // Cold Spring. Harb. Perspect. Biol. 2010. V. 2. P. a002204.
- Song K.M., Lee S., Ban C. // Sensors (Basel). 2012. V. 12. P. 612–631.
- Burnett J.C., Rossi J.J. // Chem. Biol. 2012. V. 19. P. 60–71.
- Conrad R.C., Giver L., Tian Y., Ellington A.D. // Meth. Enzymol. 1996. V. 267. P. 336–367.
- Kulbachinskiy A.V. // Biochemistry (Moscow). 2007. V. 72. P. 1505–1518.
- Bouchard P.R., Hutabarat R.M., Thompson K.M. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2010. V. 50. P. 237–257.
- Cibieli A., Pestourie C., Ducongé F. // Biochimie. 2012. V. 94. P. 1595–1606.
- Yang L., Zhang X., Ye M., Jiang J., Yang R., Fu T., Chen Y., Wang K., Liu C., Tan W. // Adv. Drug. Deliv. Rev. 2011. V. 63. P. 1361–1370.
- Ellington A.D., Szostak J.W. // Nature. 1990. V. 346. P. 818–822.
- Tuerk C., Gold L. // Science. 1990. V. 249. P. 505–510.
- Hermann T., Patel D.J. // Science. 2000. V. 287. P. 820–825.
- Nakamura Y., Ishiguro A., Miyakawa S. // Genes Cells. 2012. V. 17. P. 344–364.
- Marimuthu C., Tang T.H., Tominaga J., Tan S.C., Gopinath S.C. // Analyst. 2012. V. 137. P. 1307–1315.
- Mascini M., Palchetti I., Tombelli S. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2012. V. 51. P. 1316–1332.
- Liu J., You M., Pu Y., Liu H., Ye M., Tan W. // Curr. Med. Chem. 2011. V. 18. P. 4117–4125.
- Feldheim D.L., Eaton B.E. // ACS Nano. 2007. V. 1. P. 154–159.
- Zaher H.S., Unrau P.J. // RNA. 2007. V. 13. P. 1017–1026.
- Yan X., Gao X., Zhang Z. // Genomics Proteomics Bioinformatics. 2004. V. 2. P. 32–42.
- Kuwahara M., Sugimoto N. // Molecules. 2010. V. 15. P. 5423–5444.
- Li N., Nguyen H.H., Byrom M., Ellington A.D. // PLoS One. 2011. V. 6. P. e20299.
- Derbyshire N., White S.J., Bunka D.H., Song L., Stead S., Tarbin J., Sharman M., Zhou D., Stockley P.G. // Anal. Chem. 2012. V. 84. P. 6595–6602.
- Lebars I., Richard T., Di Primo C., Toulmé J.J. // Blood Cells Mol. Dis. 2007. V. 38. P. 204–209.
- Hernandez F.J., Stockdale K.R., Huang L., Horswill A.R., Behlke M.A., McNamara J.O. 2nd. // Nucl. Acid Ther. 2012. V. 22. P. 58–68.
- Siddiqui M.A., Keating G.M. // Drugs. 2005. V. 65. P. 1571–1579.
- Mayer G. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2009. V. 48. P. 2672–2689.
- Nitsche A., Kurth A., Dunkhorst A., Pänke O., Sielaff H., Junge W., Muth D., Scheller F., Stöcklein W., Dahmen C., et al. // BMC Biotechnol. 2007. V. 7. P. 48.
- Mori Y., Nakamura Y., Ohuchi S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012. V. 420. P. 440–443.
- Di Giusto D.A., Knox S.M., Lai Y., Tyrelle G.D., Aung M.T., King G.C. // ChemBioChem. 2006. V. 7. P. 535–544.
- Levin A.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1489. P. 69–84.
- Eulberg D., Klussmann S. // ChemBioChem. 2003. V. 4. P. 979–983.
- Turner J.J., Hoos J.S., Vonhoff S., Klussmann S. // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. P. e147.
- Hafner M., Vianini E., Albertoni B., Marchetti L., Grune I., Gloeckner C., Famulok M. // Nat. Protoc. 2008. V. 3. P. 579–587.
- Yamazaki S., Tan L., Mayer G., Hartig J.S., Song J.N., Reuter S., Restle T., Laufer S.D., Grohmann D., Krausslich H.G., et al. // Chem. Biol. 2007. V. 14. P. 804–812.
- Pasut G., Veronese F.M. // J. Control. Release. 2012. V. 161. P. 461–472.
- Milla P., Dosio F., Cattel L. // Curr. Drug Metab. 2012. V. 13. P. 105–119.
- Tan L., Neoh K.G., Kang E.T., Choe W.S., Su X. // Macromol. Biosci. 2011. V. 11. P. 1331–1335.
- Boomer R.M., Lewis S.D., Healy J.M., Kurz M., Wilson C., McCauley T.G. // Oligonucleotides. 2005. V. 15. P. 183–195.
- Rusconi C.P., Roberts J.D., Pitoc G.A., Nimjee S.M., White R.R., Quick G. Jr., Scardino E., Fay W.P., Sullenger B.A. // Nat. Biotechnol. 2004. V. 22. P. 1423–1428.
- Rusconi C.P., Scardino E., Layzer J., Pitoc G.A., Ortel T.L., Monroe D., Sullenger B.A. // Nature. 2002. V. 419. P. 90–94.
- Bompiani K.M., Monroe D.M., Church F.C., Sullenger B.A. // J. Thromb. Haemost. 2012. V. 10. P. 870–880.
- Oney S., Lam R.T., Bompiani K.M., Blake C.M., Quick G., Heidel J.D., Liu J.Y., Mack B.C., Davis M.E., Leong K.W., et al. // Nat. Med. 2009. V. 15. P. 1224–1228.

44. Bompiani K.M., Woodruff R.S., Becker R.C., Nimjee S.M., Sullenger B.A. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2012. V. 13. P. 1924–1934.
45. Davis M.E., Pun S.H., Bellocq N.C., Reineke T.M., Popielarski S.R., Mishra S., Heidel J.D. // *Curr. Med. Chem.* 2004. V. 11. P. 179–197.
46. Mao H.Q., Leong K.W. // *Adv. Genet.* 2005. V. 53. P. 275–306.
47. Joachimi A., Mayer G., Hartig J.S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 3036–3037.
48. Buff M.C., Schäfer F., Wulffen B., Müller J., Pöttsch B., Heckel A., Mayer G. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. P. 2111–2118.
49. Brieke C., Rohrbach F., Gottschalk A., Mayer G., Heckel A. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012. V. 51. P. 8446–8476.
50. Good P.D., Krikos A.J., Li S.X., Bertrand E., Lee N.S., Giver L., Ellington A., Zaia J.A., Rossi J.J., Engelke D.R. // *Gene Ther.* 1997. V. 4. P. 45–54.
51. Ausländer D., Wieland M., Ausländer S., Tigges M., Fussenegger M. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. P. e155.
52. Chaloin L., Lehmann M.J., Sczakiel G., Restle T. // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. P. 4001–4008.
53. Mi J., Zhang X., Rabbani Z.N., Liu Y., Su Z., Vujaskovic Z., Kontos C.D., Sullenger B.A., Clary B.M. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 3577–3584.
54. Mayer G., Blind M., Nagel W., Böhm T., Knorr T., Jackson C.L., Kolanus W., Famulok M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 4961–4965.
55. Davydova A.S., Vorobjeva M.A., Venyaminova A.G. // *Acta Naturae.* 2011. V. 3. № 4(11). P. 12–29.
56. Meyer C., Eydeler K., Magbanua E., Zivkovic T., Piganeau N., Lorenzen I., Grötzinger J., Mayer G., Rose-John S., Hahn U. // *RNA Biol.* 2012. V. 9. P. 67–80.
57. Zhao Y., Duan S., Zeng X., Liu C., Davies N.M., Li B., Forrest M.L. // *Mol. Pharm.* 2012. V. 9. P. 1705–1716.
58. Min K., Jo H., Song K., Cho M., Chun Y.S., Jon S., Kim W.J., Ban C. // *Biomaterials.* 2011. V. 32. P. 2124–2132.
59. Liu Y., Kuan C.T., Mi J., Zhang X., Clary B.M., Bigner D.D., Sullenger B.A. // *Biol. Chem.* 2009. V. 390. P. 137–144.
60. Sun W., Du L., Li M. // *Curr. Pharm. Des.* 2011. V. 17. P. 80–91.
61. Ye M., Hu J., Peng M., Liu J., Liu J., Liu H., Zhao X., Tan W. // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. P. 3341–3353.
62. Göringer H.U. // *Trends Parasitol.* 2012. V. 28. P. 106–113.
63. Moreno M., González V.M. // *Curr. Med. Chem.* 2011. V. 18. P. 5003–5010.
64. Wan Y., Liu Y., Allen P.B., Asghar W., Mahmood M.A., Tan J., Duhon H., Kim Y.T., Ellington A.D., Iqbal S.M. // *Lab. Chip.* 2012. V. 12. P. 4693–4701.
65. Sheng W., Chen T., Kamath R., Xiong X., Tan W., Fan Z.H. // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. P. 4199–4206.
66. Javier D.J., Nitin N., Levy M., Ellington A., Richards-Kortum R. // *Bioconjug. Chem.* 2008. V. 19. P. 1309–1312.
67. Khan S.A., Kancharapally R., Fan Z., Beqa L., Singh A.K., Senapati D., Ray P.C. // *Chem. Commun. (Camb.)* 2012. V. 48. P. 6711–6713.
68. Kanoatov M., Javaherian S., Krylov S.N. // *Anal. Chim. Acta.* 2010. V. 681. P. 92–97.
69. Javaherian S., Musheev M.U., Kanoatov M., Berezovski M.V., Krylov S.N. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. e62.
70. Han B., Zhao C., Yin J., Wang H. // *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2012. V. 903. P. 112–117.
71. Arnau J., Lauritzen C., Petersen G.E., Pedersen J. // *Protein Expr. Purif.* 2006. V. 48. P. 1–13.
72. Mi J., Liu Y., Rabbani Z.N., Yang Z., Urban J.H., Sullenger B.A., Clary B.M. // *Nat. Chem. Biol.* 2010. V. 6. P. 22–24.
73. Gening L.V., Klincheva S.A., Reshetnjak A., Grollman A.P., Miller H. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 2579–2586.
74. Lakhin A.V., Kazakov A.A., Makarova A.V., Pavlov Y.I., Efremova A.S., Shram S.I., Tarantul V.Z., Gening L.V. // *Nucl. Acid Ther.* 2012. V. 22. P. 49–57.
75. Cox J.C., Ellington A.D. // *Bioorg. Med. Chem.* 2001. V. 9. P. 2525–2531.
76. Eulberg D., Buchner K., Maasch C., Klussmann S. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. P. e45.
77. Berezovski M., Drabovich A., Krylova S.M., Musheev M., Okhonin V., Petrov A., Krylov S.N. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 3165–3171.
78. Drabovich A.P., Berezovski M., Okhonin V., Krylov S.N. // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. P. 3171–3178.
79. Soontornworajit B., Wang Y. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 399. P. 1591–1599.
80. Hong P., Li W., Li J. // *Sensors (Basel).* 2012. V. 12. P. 1181–1193.
81. Shin S., Kim I.H., Kang W., Yang J.K., Hah S.S. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010. V. 20. P. 3322–3325.
82. Lee S., Song K.M., Jeon W., Jo H., Shim Y.B., Ban C. // *Biosens. Bioelectron.* 2012. V. 35. P. 291–296.
83. Wang Y., Xu D., Chen H.Y. // *Lab. Chip.* 2012. V. 12. P. 3184–3189.
84. Tan X., Chen W., Lu S., Zhu Z., Chen T., Zhu G., You M., Tan W. // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. P. 8272–8276.
85. Orozco J., Campuzano S., Kagan D., Zhou M., Gao W., Wang J. // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. P. 7962–7969.
86. Kökpinar O., Walter J.G., Shoham Y., Stahl F., Scheper T. // *Biotechnol. Bioeng.* 2011. V. 108. P. 2371–2379.
87. Bruno J.G., Richarte A.M., Carrillo M.P., Edge A. // *Biosens. Bioelectron.* 2012. V. 31. P. 240–243.
88. Lauridsen L.H., Shamaileh H.A., Edwards S.L., Taran E., Veedu R.N. // *PLoS One.* 2012. V. 7. P. e41702.
89. Huang Y., Zhao S., Chen Z.F., Shi M., Liang H. // *Chem. Commun. (Camb.)* 2012. V. 48. P. 7480–7482.
90. Han K., Liang Z., Zhou N. // *Sensors.* 2010. V. 10. P. 4541–4557.
91. Ocaña C., Pacios M., del Valle M. // *Sensors (Basel).* 2012. V. 12. P. 3037–3048.
92. Feng L., Chen Y., Ren J., Qu X. // *Biomaterials.* 2011. V. 32. P. 2930–2937.
93. Missailidis S., Hardy A. // *Expert. Opin. Ther. Pat.* 2009. V. 19. P. 1073–1082.
94. Huang Y.Z., Hernandez F.J., Gu B., Stockdale K.R., Nanapaneni K., Scheetz T.E., Behlke M.A., Peek A.S., Bair T., Giangrande P.H., et al. // *Mol. Pharmacol.* 2012. V. 82. P. 623–635.
95. Pastor F., Kolonias D., McNamara J.O. 2nd, Gilboa E. // *Mol. Ther.* 2011. V. 19. P. 1878–1886.
96. Zeller S.J., Kumar P. // *Yale J. Biol. Med.* 2011. V. 84. P. 301–309.
97. Binning J.M., Leung D.W., Amarasinghe G.K. // *Front. Microbiol.* 2012. V. 3. P. 29.
98. Gopinath S.C., Hayashi K., Kumar P.K. // *J. Virol.* 2012. V. 86. P. 6732–6744.
99. Mufhandu H.T., Gray E.S., Madiga M.C., Tumba N., Alexandre K.B., Khoza T., Wibmer C.K., Moore P.L., Morris L., Khati M. // *J. Virol.* 2012. V. 86. P. 4989–4999.
100. Zhang Y., Hong H., Cai W. // *Curr. Med. Chem.* 2011. V. 18. P. 4185–4194.
101. Orava E.W., Cicmil N., Gariépy J. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. V. 1798. P. 2190–2200.
102. Zhu Q., Shibata T., Kabashima T., Kai M. // *Eur. J. Med. Chem.* 2012. V. 56. P. 396–399.
103. Neff C.P., Zhou J., Remling L., Kuruvilla J., Zhang J., Li H., Smith D.D., Swiderski P., Rossi J.J., Akkina R. // *Sci. Transl. Med.* 2011. V. 3. P. 66ra6.

104. Yu B., Tai H.C., Xue W., Lee L.J., Lee R.J. // *Mol. Membr. Biol.* 2010. V. 27. P. 286–298.
105. Talekar M., Kendall J., Denny W., Garg S. // *Anticancer Drugs*. 2011. V. 22. P. 949–962.
106. Aravind A., Jeyamohan P., Nair R., Veerananarayanan S., Nagaoka Y., Yoshida Y., Maekawa T., Kumar D.S. // *Biotechnol. Bioeng.* 2012. V. 109. P. 2920–2931.
107. Kang H., O'Donoghue M.B., Liu H., Tan W. // *Chem. Commun. (Camb.)* 2010. V. 46. P. 249–251.
108. Chen C.H., Dellamaggiore K.R., Ouellette C.P., Sedano C.D., Lizadjohry M., Chernis G.A., Gonzales M., Baltasar F.E., Fan A.L., Myerowitz R., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 15908–15913.
109. Dombi T., Kwok K.K., Sultan M.B. // *BMC Ophthalmol.* 2012. V. 12. P. 37.