

УДК 577.271.34

Эскорт-аптамеры: новые инструменты для направленной доставки лекарственных препаратов в клетки

А. С. Давыдова, М. А. Воробьева*, А. Г. Веньямина

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

*E-mail: maria.vorobjeva@gmail.com

Поступила в редакцию 08.07.2011 г.

РЕФЕРАТ Эскорт-аптамеры – фрагменты ДНК или РНК, которые обладают высоким сродством к определенным белкам на клеточной поверхности и могут использоваться для адресной доставки различных агентов в клетки конкретного типа. В обзоре обсуждены характерные особенности получения эскорт-аптамеров методом SELEX, рассмотрены методы селекции эскорт-аптамеров с использованием в качестве мишеней отдельных белков клеточной поверхности, фрагментов клеток, живых эукариотических клеток, бактерий. Отдельное внимание уделено дизайну и химическим модификациям эскорт-аптамеров. Описаны различные аспекты применения эскорт-аптамеров: направленная доставка малых интерферирующих РНК (siRNA), наночастиц, токсинов, фотореагентов и др.; идентификация специфических клеточных маркеров; детекция или выделение клеток определенного типа. Обсуждаются перспективы использования эскорт-аптамеров при разработке новых лекарственных средств и диагностических систем.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА метод SELEX, НК-аптамеры, эскорт-аптамеры, специфическое связывание с клетками, направленная доставка в клетки, детекция клеток.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ дцДНК – двухцепочечная ДНК; оцДНК – одноцепочечная ДНК; ПСМА – простат-специфичный мембранный антиген; ПЦР – полимеразная цепная реакция; IC_{50} – концентрация препарата, необходимая для подавления роста 50% клеток; K_d – кажущаяся константа диссоциации комплекса аптамер–мишень; LNA (Locked Nucleic Acids) – конформационно ограниченные нуклеиновые кислоты; SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения; siRNA (small interfering RNA) – малые интерферирующие РНК.

ВВЕДЕНИЕ

Аптамеры (от лат. *aptus* – подходить) – одноцепочечные молекулы ДНК и РНК, способные специфически узнавать определенные соединения благодаря уникальной пространственной структуре. Методы селекции *in vitro*, позволяющие получать нуклеиновые кислоты с заданными свойствами, были описаны независимо тремя группами исследователей в 1990 г. В работе А. Ellington и J. Szostak [1] получена молекула РНК, способная специфично связывать органический краситель. С. Tuerk и L. Gold описали селекцию молекул РНК, способных связывать ДНК-полимеразу фага Т4, и назвали разработанный метод SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения) [2], а D. Robertson и G. Joyce использовали селекцию *in vitro* для конверсии рибозима группы I из рибону-

клеазы в дезоксирибонуклеазу [3]. В течение следующих двух десятилетий эта область стремительно развивалась, совершенствовались методы отбора аптамеров и подходы к их дизайну. В настоящее время получено большое количество аптамеров, способных высокоспецифично связывать самые разнообразные мишени (см. обзоры [4–7]). Благодаря своим уникальным свойствам – высокой аффинности и селективности связывания молекулы-мишени – аптамеры находят широкое применение в разнообразных областях исследований. В частности, на их основе могут быть получены высокоэффективные специфичные ингибиторы белков-мишеней, которые могут использоваться для создания новых лекарственных средств. На данный момент ряд аптамеров проходит различные стадии клинических испытаний [8], а препарат Macugen (компании «Eyetechnics Pharmaceuticals» и «Pfizer») на основе аптамера, связывающего

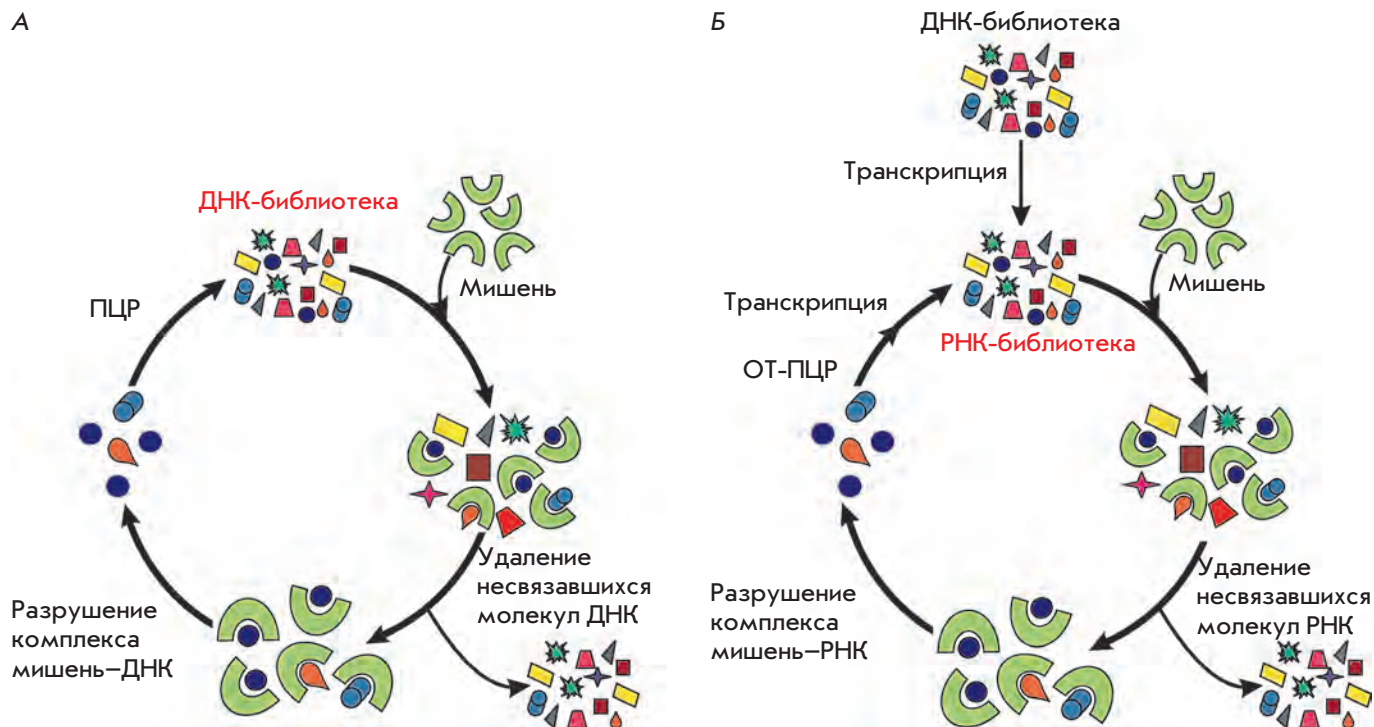


Рис. 1. Общая схема отбора аптамеров методом SELEX с использованием ДНК- (А) и РНК-библиотек (Б).

человеческий фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), утвержден в качестве средства, эффективного при возрастной макулодистрофии [9, 10].

Одно из наиболее интересных и перспективных направлений в этой области – создание аптамеров, способных специфично узнавать клетки определенного типа благодаря связыванию с теми или иными доминантами на их поверхности. В обзоре В. Nicke и соавт. [11] такие соединения были названы *эскорт-аптамерами*. Использование эскорт-аптамеров в качестве «адресующей» части открывает широкие возможности для направленной доставки агентов различной природы в клетки определенного типа. В настоящее время получено большое число эскорт-аптамеров, направленных на самые разнообразные клетки-мишени, и описан широкий спектр их приложений для специфического воздействия на клетки, диагностики и выделения клеток. Представленный обзор посвящен селекции, дизайну и различным аспектам применения эскорт-аптамеров.

ПОЛУЧЕНИЕ АПТАМЕРОВ МЕТОДОМ СЕЛЕКЦИИ *in vitro*

Общая схема метода SELEX

ДНК- и РНК-аптамеры получают селекцией *in vitro* из комбинаторных библиотек нуклеиновых кислот.

Классическая библиотека представляет собой набор олигонуклеотидов с рандомизированной областью из 20–60 нуклеотидов, фланкированной константными участками, необходимыми для связывания с праймерами и амплификации ДНК с помощью ПЦР. В настоящее время при отборе аптамеров широко используют как оцДНК-, так и РНК-библиотеки. РНК-аптамеры за счет 2'-ОН-групп способны образовывать больше разнообразных пространственных структур, чем ДНК-аптамеры. Однако при этом РНК-аптамеры более чувствительны к действию клеточных нуклеаз и нуждаются во введении дополнительных защитных групп [12].

оцДНК-библиотеки получают стандартными методами химического синтеза олигодезоксирибонуклеотидов, используя при синтезе рандомизированного участка смесь всех четырех мономеров. Для получения РНК-библиотеки сначала проводят химический синтез оцДНК-библиотеки, содержащей в 5'-концевой области промоторную последовательность для Т7-РНК-полимеразы, а затем на матрице оцДНК получают дцДНК, которую используют для синтеза РНК методом транскрипции *in vitro*. Общая схема метода SELEX для ДНК-библиотек состоит из следующих стадий: инкубирование библиотеки с мишенью, отделение комплексов олигонуклеотид–мишень от несвязавшихся олигонуклеотидов, разрушение

комплексов олигонуклеотид–мишень и амплификация связавшихся молекул (рис. 1А). При отборе РНК-аптамеров в SELEX включаются дополнительные стадии наработки РНК-библиотеки по матрице ДНК, обратной транскрипции связавшихся молекул РНК для получения кДНК и ее последующей амплификации (рис. 1Б).

В процессе отбора происходит обогащение библиотеки последовательностями, имеющими повышенное сродство к мишени. Как правило, для получения аптамеров проводят от 5 до 15 раундов селекции в зависимости от значений константы диссоциации комплекса аптамер–мишень. После того как константа диссоциации перестает снижаться (т.е. сродство библиотеки к мишени перестает увеличиваться), обогащенную библиотеку клонируют и определяют последовательности индивидуальных аптамеров. Затем анализируют гомологию между индивидуальными аптамерами, по результатам анализа аптамеры группируют в несколько классов и оценивают их способность взаимодействовать с мишенью. Для дальнейших исследований отбирают последовательности с максимальным сродством к мишени. Вторичную структуру аптамеров изучают с использованием анализа консервативных мотивов, компьютерного моделирования, химического и ферментативного пробинга. На следующем этапе определяют минимальный размер аптамера, необходимый для специфичного узнавания мишени. С этой целью синтезируют серию укороченных вариантов аптамера и определяют их способность связываться с мишенью.

Как правило, аптамеры обладают высоким сродством к своим мишеням. Характерные значения константы диссоциации (K_d) для белковых мишеней лежат в наномолярном и субнаномолярном диапазоне (1×10^{-10} – 1×10^{-7} М). По своей аффинности и специфичности аптамеры сравнимы с моноклональными антителами, но при этом они обладают целым рядом выгодных отличий (см. табл. 1), среди которых стоит особо выделить возможность химического синтеза и химической модификации аптамеров.

Химические модификации аптамеров

Введение в состав эскорт-аптамеров различных модификаций позволяет существенно повысить их стабильность в биологических средах, а также дает возможность дополнительной функционализации аптамеров. Наиболее распространенная модификация, используемая для повышения устойчивости аптамеров, – введение различных заместителей по 2'-положению рибозы (рис. 2), позволяет защитить аптамеры от расщепления эндонуклеазами. Как правило,

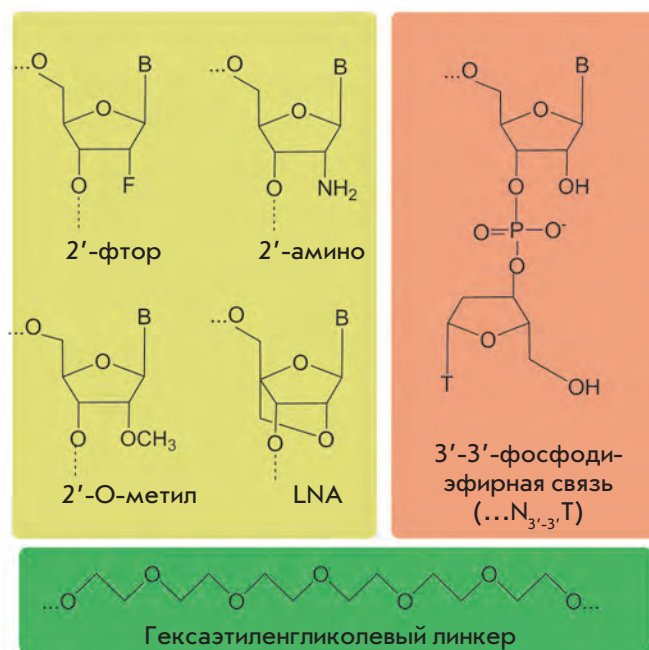


Рис. 2. Химические модификации рибозофосфатного остова, используемые для повышения устойчивости эскорт-аптамеров в биологических средах.

такого рода модификации используют для защиты эскорт-РНК-аптамеров, в то время как эскорт-ДНК-аптамеры чаще применяют без дополнительных модификаций. Основным путем деградации РНК-аптамеров в биологических средах является их расщепление пиримидиновыми эндорибонуклеазами, поэтому уже на стадии конструирования комбинаторных РНК-библиотек для отбора эскорт-аптамеров пиримидиновые нуклеозиды в их составе заменяют их 2'-фтор- и 2'-амино-аналогами, используя при синтезе библиотеки соответствующие модифицированные нуклеозидтрифосфаты. Для их включения в растущую цепь РНК может быть использована Т7-РНК-полимераза [13] или ее мутантная версия, способная включать эти 2'-модифицированные нуклеозидтрифосфаты в РНК с большей эффективностью [14]. Существует также мутантная РНК-полимераза, включающая в РНК 2'-О-метил-аналоги нуклеозидтрифосфатов [15, 16], однако из-за проблем, связанных с реакцией обратной транскрипции 2'-О-метилсодержащих РНК, использование 2'-О-метил-РНК-библиотек непосредственно в процессе селекции пока не получило широкого распространения [4].

Для получения 2'-О-метилсодержащих аптамеров часть рибонуклеотидов в составе РНК-аптамера заменяют их 2'-О-метил-аналогами уже после отбора

Таблица 1. Сравнение свойств НК-аптамеров и моноклональных антител

	Аптамеры	Моноклональные антитела
Способ отбора	Селекция <i>in vitro</i>	Гибридная технология, включающая иммунизацию животных
Способ синтеза	Химический или ферментативный синтез	Производство с использованием клеточных культур или лабораторных животных
Ограничения на молекулы-мишени	Отсутствуют	Невозможно получить антитела на неиммунные или токсичные соединения
Сродство к мишени	$K_d \approx 10^{-10} - 10^{-7}$ М	$K_d \approx 10^{-10} - 10^{-7}$ М
Специфичность	Высокая	Высокая
Стабильность	Могут ренатурировать после нагревания, возможно длительное хранение	Необратимая денатурация при нагревании, более чувствительны к условиям хранения
Иммуногенность	Не показана	Высокая
Возможности введения химических модификаций	Широкие	Ограниченные

аптамеров и установления их нуклеотидной последовательности. Также для повышения устойчивости аптамеров с уже известной последовательностью в их состав вводят 2'-О, 4'-С-метиленбициклические нуклеотиды (LNA, locked nucleic acids), причем эту модификацию используют как в РНК- [17], так и в ДНК-аптамерах [18]. С целью минимизации длины аптамеров и одновременного повышения их устойчивости к эндонуклеазам может быть использована замена части нуклеотидов гибким линкером на основе этиленгликоля [18, 19]. Для защиты аптамеров от расщепления 3'-экзонуклеазами используют кепирование 3'-конца дополнительным остатком тимидина, присоединенным 3'-3'-фосфодиэфирной связью [17, 19].

Для введения в состав аптамеров дополнительных функциональных групп в ходе селекции используют либо модифицированные нуклеозидтрифосфаты, либо модифицируют уже «готовые» аптамеры (см. обзор [4]). В случае эскорт-аптамеров наиболее распространено введение на 5'- или 3'-конец аптамера алифатической амино- или сульфгидрильной группы, что позволяет синтезировать разнообразные конъюгаты аптамеров с токсинами, антибиотиками, флуоресцентными или фотореакционноспособными группами, наночастицами и др. (см. раздел «Применение эскорт-аптамеров»).

Необходимо учитывать, что введение модификаций в уже «готовый» аптамер может привести к значительным изменениям конформации молекулы и понизить сродство аптамера к мишени. Поэтому в каждом случае надо тщательно выбирать вид и положение таких модификаций и дополнительно

исследовать их влияние на сродство аптамера к мишени.

ПОЛУЧЕНИЕ ЭСКОРТ-АПТАМЕРОВ

В качестве мишеней при отборе эскорт-аптамеров методом селекции *in vitro* используют индивидуальные белки клеточной поверхности или же целые клетки. Использование клеток в качестве мишеней обладает рядом преимуществ по сравнению с использованием очищенных белков:

- отсутствует необходимость наработки чистого белка, служащего мишенью;
- полученные аптамеры обладают высоким сродством к целевым клеткам;
- можно проводить селекцию на клетку в целом, даже если конкретный поверхностный белок-мишень заранее не известен;
- появляется возможность идентификации новых, ранее неизвестных специфических маркеров на поверхности клеток.

Для протокола клеточной селекции эскорт-аптамеров характерны свои особенности. Одну из ключевых проблем при использовании клеток в качестве мишеней представляет огромное число поверхностных доминант – как уникальных для данного типа клеток, так и общих для клеток многих типов. Чтобы исключить из отбора неспецифические аптамеры, связывающиеся с общими для многих типов клеток молекулярными мишенями, в SELEX вводят дополнительную стадию контрселекции, или негативной селекции. Так, при отборе аптамеров, способных связываться с тем или иным белком на поверхности клеток, используют две клеточных линии, одна

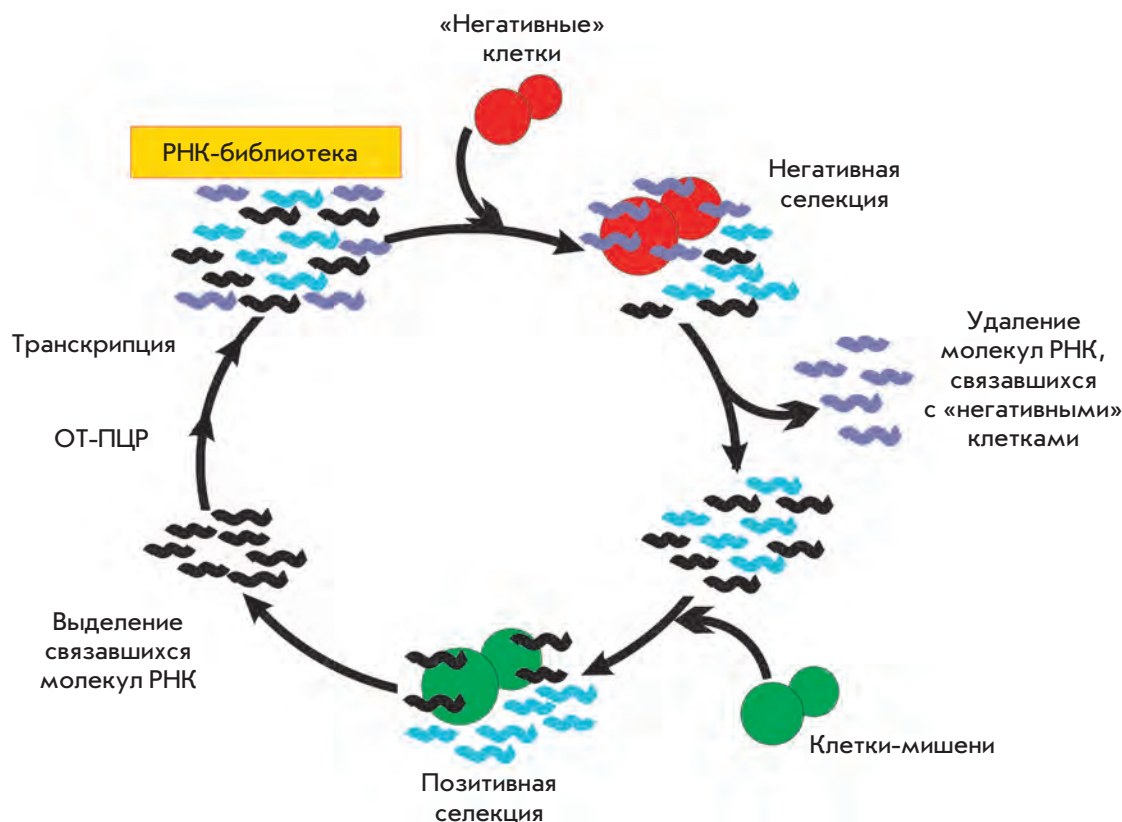


Рис. 3. Схема селекционной стратегии *in vitro* на клетки с использованием стратегии негативной селекции на примере РНК-библиотеки.

из которых (клетки-мишени) экспрессирует нужный белок, а вторая (контрольные «негативные» клетки) представляет собой клетки того же типа, не экспрессирующие этот белок. Последовательная инкубация библиотеки нуклеиновых кислот с контрольными клетками и клетками-мишенями позволяет отобрать те последовательности, которые связывают на поверхности клеток только нужный белок.

Общая схема клеточной селекции эскорт-аптамеров (на примере РНК-библиотеки) представлена на рис. 3. Исходную библиотеку олигонуклеотидов инкубируют с контрольными клетками, отделяют несвязавшиеся молекулы, затем инкубируют их с клетками-мишенями и снова отделяют несвязавшиеся молекулы. После этого клетки разрушают, выделяют связавшиеся аптамеры, амплифицируют их и используют на следующем раунде селекции.

Впервые использование клеток в качестве мишеней для селекции *in vitro* описано в работе К. Morris и соавт. [20], в которой получены ДНК-аптамеры, узнающие тени эритроцитов человека – клетки, лишенные гемоглобина, но сохраняющие мембрану той же формы, что и нативные эритроциты. Для получения аптамеров оцДНК-библиотеку инкубировали с клетками-мишенями, связавшиеся последовательности отделяли с помощью фильтрования на нитроцеллюлозных фильтрах, а затем получен-

ный набор молекул ДНК амплифицировали и использовали в следующем раунде селекции. После 25 раундов селекции два аптамерных мотива составляли около 25% от всего числа клонов. С использованием фотоактивируемых фенилазидных группировок, введенных в состав этих двух аптамеров, показано, что они связывают различные молекулярные мишени на клеточной поверхности. Эта работа стала первым примером использования комбинаторных библиотек нуклеиновых кислот для отбора аптамеров на такие сложные объекты, как клеточная мембрана.

Аптамеры, узнающие злокачественные клетки

подавляющее большинство работ по отбору аптамеров к живым клеткам посвящено поиску последовательностей, способных специфично связываться со злокачественными клетками. Так, в работе S. Lupold и соавт. [21] описано получение 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров, способных связывать простатспецифичный мембранный антиген (ПСМА). Этот белок, расположенный на поверхности клеточной мембраны, является маркером опухолевых клеток предстательной железы. Клетки здоровых тканей характеризуются очень низким уровнем ПСМА, а при развитии злокачественных опухолей его уровень значительно возрастает. В качестве мишени при получении аптамеров использовали не це-

лые опухолевые клетки, а рекомбинантный белок, соответствующий внеклеточному домену ПСМА. Уже после шести раундов селекции обогащенная библиотека на 95% состояла из двух последовательностей РНК (**A9** и **A10**). В результате минимизации длины аптамера **A10** получен 56-звенный аптамер **A10-3**, на 3'-конец которого для защиты от экзонуклеаз через 3'-3'-фосфодиэфирную связь введен дополнительный остаток тимидина. Показано, что этот аптамер специфически связывается с раковыми клетками LNCaP, экспрессирующими ПСМА, и не связывается с клетками РС-3 рака предстательной железы, в которых этот белок не экспрессируется.

Использование в качестве мишеней фрагментов индивидуальных поверхностных белков описано и в работах С. Ferreira и соавт. [22–24], посвященных отбору ДНК-аптамеров к опухолевому маркеру – поверхностному гликопротеину муцину (MUC1), гиперэкспрессия которого характерна для раковых клеток. Мишенями для отбора служили иммуногенные синтетические пептиды – фрагменты муцина, иммобилизованные на колонке с функционализированной сефарозой. После 10 раундов селекции получили 12 аптамерных последовательностей, одна из которых (аптамер **S1.3/S2.2**) обладала способностью связываться с опухолевыми клетками, продуцирующими муцин [23]. Этим же способом, но с использованием в качестве мишени рекомбинантного муцина, получены еще четыре ДНК-аптамера [22]. Наиболее удачным оказался третий вариант, отобранный на миметик муцина, O-гликозилированный пептид [24]. Полученный этим способом ДНК-аптамер **5TRG2**, обладающий наиболее высоким сродством к пептиду-мишени ($K_d = 18.6$ нМ), был способен не только селективно связываться с муцином на поверхности клеток, но и проникать внутрь клеток за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Надо отметить, что более надежным и эффективным способом получения аптамеров, способных связываться с белками на клеточной поверхности, считается селекция на целые клетки. Так, в работе D. Daniels и соавт. [25] описана селекция ДНК-аптамеров, способных связываться с поверхностью клеток глиобластомы U251. После 21 раунда селекции был отобран аптамер **GBI-10**, который вместе со своими гомологами составлял около 10% от всего количества отобранных последовательностей. Методом аффинной очистки клеточного экстракта с использованием иммобилизованного на магнитных частицах аптамера **GBI-10** было установлено, что его мишенью является тенасцин С (TN-C) – белок, локализованный преимущественно во внеклеточном матриксе, гиперэкспрессия которого характерна для широкого спектра опухолей. Селекцию вели при 4°C, чтобы

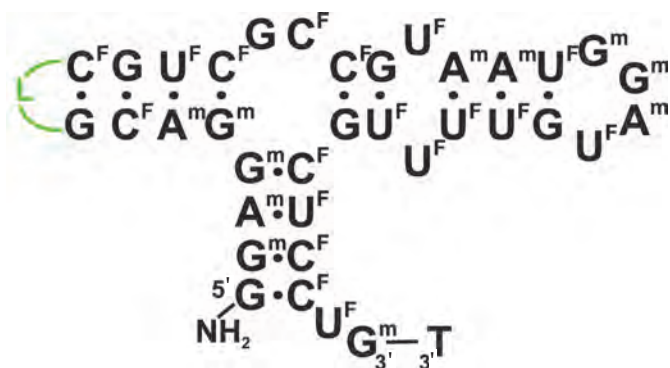


Рис. 4. Предполагаемая вторичная структура модифицированного аптамера **TTA1**, связывающегося с тенасцином С [19]. Обозначения: N^F – 2'-фтор-2'-дезоксирибонуклеотид, N^m – 2'-О-метилрибонуклеотид, NH₂ – остаток аминоксанола, L – гексаэтиленгликольфосфатный линкер.

избежать проникновения аптамеров внутрь клеток, а также снизить степень деградации аптамеров. Кажущаяся константа диссоциации комплекса аптамер–тенасцин С в этих условиях составляла 150 нМ, а при повышении температуры от 4 до 37°C значение K_d увеличивалось примерно на порядок.

Образующие значительно более стабильные комплексы 2'-F-РНК-аптамеры к тенасцину С были получены с применением трех параллельных протоколов селекции *in vitro*. В первом случае в качестве мишени использовали рекомбинантный белок, во втором – клетки глиобластомы U251, а в третьем случае использовали перекрестную селекцию, в рамках которой после 9 раундов селекции на клетки глиобластомы проводили два дополнительных раунда селекции на белок TN-C [19]. Для повышения устойчивости в биологических средах все пиримидиновые нуклеозиды в составе РНК-библиотеки заменили их 2'-F-аналогами. Аптамеры, отобранные всеми тремя способами, обладали достаточно высоким сродством к TN-C ($K_d = 1–10$ нМ), причем аптамеры, полученные селекцией на индивидуальный белок, и аптамеры, полученные селекцией на клетки, содержали сходные последовательности. 55-Звенный аптамер **TN-9** был укорочен на 16 нуклеотидов, а в его состав ввели ряд дополнительных химических модификаций: заменили несколько нуклеотидов гексаэтиленгликолевым линкером, большинство пуриновых остатков 2'-О-метил-аналогами, кепировали 3'-конец остатком тимидина, присоединенного 3'-3'-фосфодиэфирной связью, и ввели на 5'-конец аминогруппы для создания биоконъюгатов. Полученный модифицированный аптамер **TTA1** (рис. 4) сохранял высокое сродство к белку-мишени ($K_d = 5$ нМ) и обладал высокой биологической стабильностью.

W. Tan с сотр. получили ДНК-аптамеры, связывающиеся с клетками CCRF-CEM Т-клеточного лейкоза [26]. В качестве контрольных клеток на стадии контрселекции использовали В-клетки лимфомы Беркитта (так называемые Ramos-клетки). Полученные высокоаффинные аптамеры были способны не только селективно связывать клетки-мишени CCRF-CEM, но и распознавать их в смеси с опухолевыми клетками других линий, а также с клетками костномозговой жидкости здоровых людей [27]. Оказалось, что 88-звенный аптамер *sgc8*, обладающий наибольшим сродством к клеткам-мишеням ($K_d = 0.8$ нМ), связывается на их поверхности с тирозиновой протеинкиназой 7 (РТК-7) [28], которая участвует в процессах передачи сигнала при развитии и метастазировании злокачественных опухолей. Кроме того, аптамер *sgc8* способен проникать внутрь клеток CCRF-CEM, где он затем локализуется в эндосомах [29]. В результате минимизации нуклеотидной последовательности аптамера *sgc8* и введения в его структуру химических модификаций (рис. 5) получен содержащий 33 нуклеотида и линкер аптамер **C8FL**, обладающий исключительной устойчивостью к нуклеазам сыворотки и высоким сродством к клеткам-мишеням ($K_d = 1.53$ нМ) [18].

В 2009 г. A. Ellington с сотр. [30] изучили специфичность связывания ряда клеточных аптамеров и, в частности, показали, что аптамеры к клеткам CCRF-CEM способны узнавать злокачественные клетки других типов, для которых характерна способность формировать монослой. Авторы предположили, что полученные в работах W. Tan с сотр. [26–29] аптамеры специфично узнают не клетки лейкоза определенного типа, а клетки, способные к адгезии. В пользу этого предположения приведены следующие аргументы: 1) тирозиновая протеинкиназа 7 (РТК-7) участвует в процессах клеточной адгезии; 2) в ходе селекции мишенями служили клетки CCRF-CEM, способные к образованию монослоя, а негативным контролем для контрселекции – Ramos-клетки, которые монослой не образуют, т.е. потенциально существовала возможность отбора аптамеров к клеткам, способным к адгезии. Надо отметить, однако, что в описанных выше опытах использовали не аптамер *sgc8*, а гомологичный ему *sga16*, сродство которого к клеткам-мишеням на порядок ниже, чем у *sgc8*. Таким образом, нельзя однозначно утверждать, что все полученные в работах W. Tan с сотр. [26–29] аптамеры неспецифичны по отношению к клеткам CCRF-CEM.

Ramos-клетки W. Tan с сотр. [31, 32] использовали не только в качестве контрольных клеток, но и как мишени для отбора, причем в этом случае стадия контрселекции в цикл SELEX не входила [31].

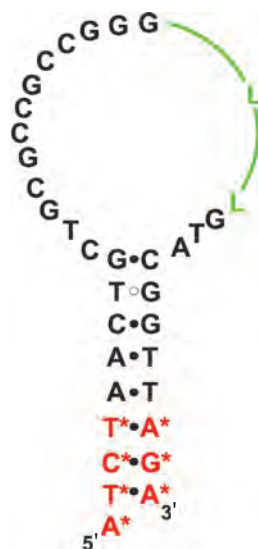


Рис. 5. Предполагаемая вторичная структура модифицированного аптамера **C8FL** к клеткам CCRF-CEM [18]. Обозначения: **L** – гексаэтиленгликольфосфат, **N*** – LNA-нуклеотиды.

Было показано, что молекулярной мишенью аптамеров на поверхности Ramos-клеток служит связанная с мембраной тяжелая цепь иммуноглобулина М [32]. Существенным недостатком этих аптамеров была их способность связываться с клетками-мишенями только при пониженных температурах (селекцию проводили при 4°C), а также потенциальная возможность связывания не только IgM на клеточной поверхности, но и растворимых IgM в плазме крови. Для решения этих проблем проведена минимизация структуры аптамера **TD05** (укорочение нуклеотидной последовательности с 48 до 37 нуклеотидов) в сочетании с заменой четырех дезоксирибонуклеотидов с 3'-конца их LNA-аналогами [33], а затем на основе «укороченных» модифицированных аптамеров **TD05.17** созданы три- и тетрамерные конструкции, в которых аптамерные последовательности соединены ненуклеотидными полиэтиленгликолевыми вставками (см., например, рис. 6). Полученные мультимеры специфично связывались с Ramos-клетками при 37°C ($K_d = 256$ нМ для тримера и 272 нМ для тетрамера), узнавая тяжелые цепи IgM на клеточной поверхности, и не взаимодействовали с растворимыми IgM.

W. Tan с сотр. получили также ДНК-аптамеры, способные различать две близкородственные линии клеток острого миелоидного лейкоза [34], клетки мелкоклеточного и немелкоклеточного рака легкого [35], а также клетки рака печени и нормальные гепатоциты [36].

M. Blank и соавт. [37] получены ДНК-аптамеры, которые селективно узнают микрососуды опухоли головного мозга крысы и не связываются со здоровыми сосудами. В ходе исследования ДНК-библиотеку инкубировали сначала с контрольными клетками –

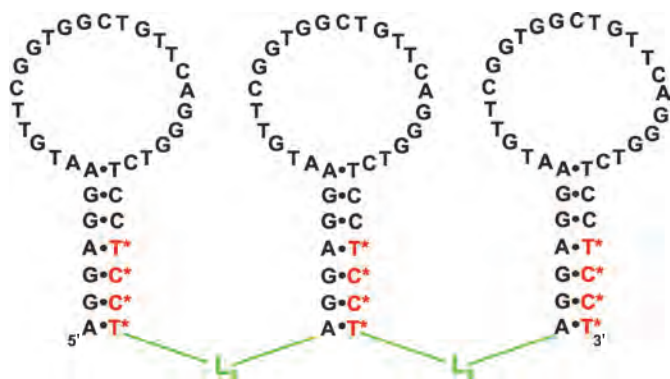


Рис. 6. Предполагаемая вторичная структура тримера на основе модифицированного аптамера **TD05.17** к Ramos-клеткам [33]. Обозначения: **L** – гексаэтиленгликольфосфат, **N*** – LNA-нуклеотиды.

микроглиальными клетками N-9 (моноциты мозга), а затем с клетками-мишенями – иммортализованными эндотелиальными клетками YPEN-1 крысы, трансформированными гибридным вирусом SV40. После селекции *in vitro* определяли специфичность связывания клеток-мишеней и контрольных клеток каждым клоном и проводили гистохимическое окрашивание опухолевых сосудов. Оказалось, что молекулярной мишенью наиболее активного аптамера **III.1** (рис. 7) является эндотелиальный белок *rigren*, синтез которого усиливается в мигрирующих и активно делящихся эндотелиальных клетках. По мнению авторов, этот белок можно рассматривать в качестве нового диагностического маркера ангиогенеза, а также потенциальной молекулярной мишени для блокирования ангиогенеза опухолей.

В 2011 г. опубликована работа E. Zueva и соавт. [38], посвященная поиску аптамеров, способных отличать высокоподвижные метастазирующие злокачественные клетки от злокачественных клеток с низкой подвижностью. Для отбора 2'-F-содержащих РНК-аптамеров использовали две линии трансформированных фибробластов сирийского хомячка: контрольную линию с низкой подвижностью и линию клеток-мишеней с высокой подвижностью. Аптамеры **E10** и **E37** специфично и с высоким сродством связывались с метастазирующими клетками (значения K_d составили 37 и 50 нМ соответственно) и в концентрации 100 нМ подавляли миграцию клеток, а в случае аптамера **E10** – и клеточную инвазию. Показана способность аптамера **E37** проникать внутрь клеток.

В работе J. Mi и соавт. [39] описан отбор аптамеров к клеткам метастазов колоректального рака в печень. Примечательно, что в процессе отбора использовали не культуру клеток, а модельных животных:

2'-F-содержащую РНК-библиотеку внутривенно вводили мышам с предварительно привитой опухолью печени, а затем из печени выделяли связавшиеся 2'-F-РНК. Полученный аптамер **14-16** после внутривенного введения мышам селективно связывался с внутрипеченочными опухолями. Этот аптамер обладал способностью проникать внутрь опухолевых клеток и связываться в ядре и цитоплазме с геликазой р68, гиперэкспрессия которой характерна для колоректального рака. На данный момент эта работа является единственным примером отбора аптамеров с использованием многоклеточных организмов.

Аптамеры, связывающиеся с поверхностными рецепторами клеток

Клеточные рецепторы считаются привлекательной терапевтической мишенью. Они могут быть нейтрализованы с помощью аптамеров, блокирующих лиганд-индуцируемую активацию. Создание аптамеров, способных специфически блокировать определенные рецепторы и «выключать» тем самым соответствующие сигнальные пути, дает возможность как изучения молекулярных механизмов их функционирования, так и диагностики и терапии различных заболеваний. Нескольким исследовательским группам удалось получить аптамеры, способные связываться с клеточными рецепторами.

В качестве мишеней для получения рецепторузнающих аптамеров в ряде случаев использовали рекомбинантные белки, соответствующие внеклеточным доменам рецепторов. Этим способом получили 2'-фторсодержащие РНК-аптамеры, способные узнавать рецепторы CD4 крысы [40] и человека [41], а также рецептор CTLA-4 мыши [42]. С. Chen и соавт.

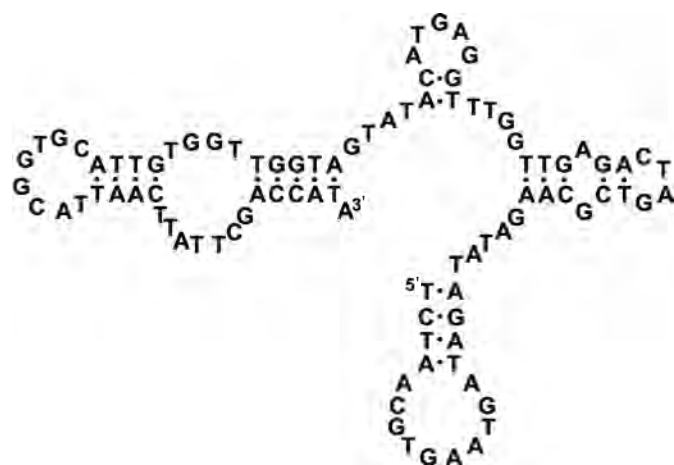


Рис. 7. Предполагаемая вторичная структура ДНК-аптамера **III.1** к микрососудам опухоли мозга крысы [37].

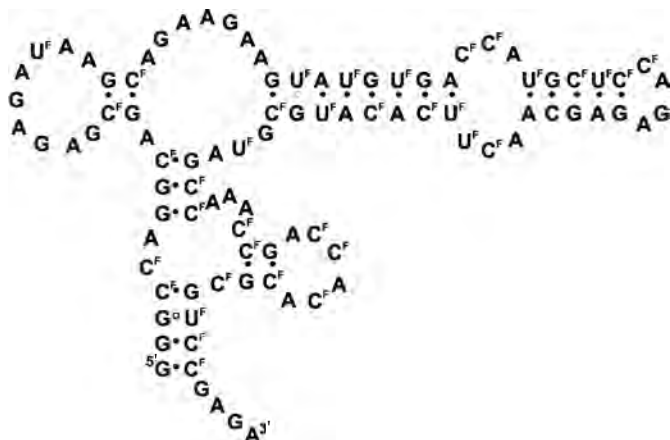


Рис. 8. Предполагаемая вторичная структура РНК-аптамера **A07** к рецептору трансформирующего фактора роста человека [44]. Обозначения: N^F – 2'-фтор-2'-дезоксирибонуклеотид.

[43] описано получение аптамеров к трансферриновому рецептору мыши. На примере флуоресцентно меченных конъюгатов РНК- и ДНК-аптамеров со стрептавидином показана способность аптамеров проникать в клетки путем эндоцитоза. При этом связывание аптамеров с трансферриновым рецептором не влияло на взаимодействие с этим рецептором самого трансферрина, т.е. такие аптамеры могут использоваться для доставки лекарственных средств без блокирования функций рецептора, необходимого для жизнедеятельности клеток.

С применением метода SELEX на целые клетки, включающего стадию контрсеlections, были отобраны 2'-F-содержащие РНК-аптамеры на рецептор трансформирующего фактора роста человека β (TGF- β) типа III (TbRIII), экспрессированный на поверхности клеток яичника китайского хомячка (CHO) [44]. На стадии негативного отбора в этой работе использовали «родительские» клетки CHO, не экспрессирующие данный белок. После селекции получили аптамер **A07** (рис. 8), специфически связывающийся с рецептором TbRIII и образующий с ним прочный комплекс ($K_d = 2.47$ нМ). Показано также, что данный аптамер способен ингибировать ассоциацию рецептора TbRIII и его лиганда TGF- β_2 .

В работе L. Cerchia и соавт. [45] описана селекция 2'-F-РНК-аптамеров, связывающихся с мутантной димерной формой рецепторной тирозинкиназы человека RET^{C634Y}, присутствие которой характерно для множественной эндокринной неоплазии типа II. В процессе отбора библиотеку инкубировали с клетками, экспрессирующими мутантную форму рецеп-

тора RET^{C634Y} (PC12/MEN2A). На стадии контрсеlections библиотеку олигонуклеотидов инкубировали с контрольными клетками двух типов – «родительскими» PC12, не экспрессирующими белок-мишень, и клетками PC12/MEN2B, которые имели сходную с PC12/MEN2A морфологию, но экспрессировали мономерную форму рецепторной тирозинкиназы RET^{M918T}. Аптамеры **D4** и **D24**, полученные после 15 раундов селекции, эффективно связывались с клетками-мишенями ($K_d = 40$ нМ) и в концентрации 200 нМ подавляли активность RET на 70%. Необходимо отметить, что аптамер **D4** связывался и с клетками PC12/MEN2B, хотя степень связывания была значительно меньше (примерно в 2.5 раза по сравнению с клетками-мишенями PC12/MEN2A).

Использование метода перекрестной селекции для получения аптамеров на рецептор RET^{C634Y} (семь раундов отбора на клетки PC12/MEN2A и четыре раунда отбора на очищенный рекомбинантный белок [46]), к сожалению, не привело к лучшему результату. Полученный таким способом аптамер **E38** значительно отличался по своей структуре от аптамеров на клетки-мишени, характеризовался более низким сродством к клеткам PC12/MEN2A ($K_d = 100$ нМ) и не ингибировал активность рецепторной тирозинкиназы.

Аптамеры, способные узнавать недифференцированные клетки

Интересную задачу представляет получение аптамеров, связывающихся с недифференцированными клетками. Так, в работе С. Wang и соавт. [47] отбирали ДНК-аптамеры, способные различать дифференцированные клетки PC12 и «родительские» недифференцированные клетки, использованные в качестве контрольных на стадии контрсеlections. Шести раундов селекции оказалось достаточно для того, чтобы полученные аптамеры узнавали дифференцированные клетки и не связывались с недифференцированными. Аптамеры на недифференцированные типы клеток, например, на стволовые клетки, можно использовать для выделения и очистки клеток в такой быстро развивающейся области, как регенеративная медицина. Созданию ДНК-аптамеров для выделения и иммобилизации клеток посвящены работы К. Guo и соавт. [48, 49]. В частности, получены ДНК-аптамеры [49], связывающие зрелые мезенхимные стволовые клетки. После 12 раундов отбора без контрсеlections получены аптамеры, способные селективно узнавать клетки-мишени среди других костномозговых клеток, и показана возможность их использования для выделения стволовых клеток из костного мозга. J. Hoffmann и соавт. [50] получили ДНК-аптамеры, способные связываться с предше-

стенниками эндотелиальных клеток свиньи, которые затем использовали для иммобилизации клеток на поверхности дисков из политетрафторэтилена или полидиметилсилоксана (см. раздел «Применение эскорт-аптамеров»).

Идентификация новых биомаркеров в результате клеточной селекции аптамеров

Селекция аптамеров *in vitro* с использованием живых клеток позволяет после отбора аптамеров и обнаружения поверхностных белков, с которыми они связываются, идентифицировать новые биомаркеры, характерные для клеток определенного типа. Существующие в настоящее время методы поиска биомаркеров (Вестерн-блоттинг, скрининг мРНК с использованием количественной ПЦР или чипов, двумерный электрофорез в сочетании с масс-спектроскопией) недостаточно эффективны, и их общий недостаток – возможность как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов. Стратегия поиска биомаркеров при помощи аптамеров (AptaBiD, Aptamer-facilitated Biomarker Discovery), сформулированная в общем виде в работе M.V. Berezovski и соавт. [51], позволяет решить эти проблемы. Вероятность ложноположительных результатов снижается в результате многочисленных раундов селекции, которые исключают влияние на отбор случайных факторов, таких, как стохастические различия между клетками одного и того же типа, а также случайные вариации на всех стадиях обработки клеток. В то же время экспоненциальное обогащение библиотеки в процессе селекции дает возможность выявить даже незначительные различия между контрольными клетками и клетками-мишенями, если они сохраняются от раунда к раунду, а это снижает вероятность получения ложноотрицательных результатов. Чтобы подтвердить перспективность стратегии AptaBiD, ее использовали для поиска биомаркеров, определяющих различия между зрелыми и незрелыми дендритными клетками. В результате обнаружили как ранее известные биомаркеры дендритных клеток, так и шесть новых биомаркеров незрелых дендритных клеток. Надо отметить, что особенность этого метода состоит в отсутствии стадий клонирования и секвенирования – для поиска биомаркеров используют не индивидуальные аптамеры, а обогащенные библиотеки, что позволяет сделать процесс более быстрым и менее затратным.

Аптамеры, узнающие поверхностные белки микроорганизмов

В качестве мишеней для клеточной селекции можно использовать не только культивируемые клетки, но и патогенные микроорганизмы. Полученные таким

способом аптамеры в дальнейшем могут применяться в диагностике и терапии инфекционных заболеваний, а также для количественного определения микроорганизмов.

В работе M. Homann и H. Göringer [52] получены РНК-аптамеры, способные связываться с живыми трипаносомами *Trypanosoma brucei* – паразитическими простейшими, возбудителями сонной болезни. В качестве мишеней для отбора использовали два штамма *Tr. brucei*. РНК-библиотеку инкубировали с паразитами, находящимися на стадии кровяного русла (bloodstream-stage), а несвязавшиеся молекулы удаляли центрифугированием. Полученные аптамеры связывались с особями обоих штаммов на стадии кровяного русла ($K_d = 60$ нМ) и не узнавали *Tr. brucei* на других стадиях развития. Методами фотоаффинной модификации и флуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентно меченного аптамера **2-16** установлено, что его мишенью служит белок с молекулярной массой 42 кДа, находящийся в жгутиковом кармане трипаносомы. После связывания с этим белком аптамер проникает в трипаносому путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, а затем локализуется в эндосомах. На примере конъюгата аптамера **2-16** с биотином показана возможность использования таких аптамеров для доставки других соединений внутрь трипаносом [53]. Для повышения устойчивости аптамера **2-16** в биологических средах пиримидиновые нуклеозиды заменили их 2'-амино- или 2'-фтор-аналогами. Аптамер, содержащий 2'-NH₂-группы, в результате модификации полностью утратил способность связываться с трипаносомами, в то время как 2'-F-модифицированный аптамер сохранял к ним сродство ($K_d = 70$ нМ), обладая при этом высокой устойчивостью к нуклеазам сыворотки [54]. Более удачным оказалось использование в ходе селекции модифицированных РНК-библиотек, содержащих 2'-фтор- или 2'-аминопиримидиновые нуклеотиды. При отборе 2'-аминосодержащих РНК-аптамеров в качестве мишени использовали живых трипаносом. Полученный аптамер обладал практически таким же сродством к трипаносомам, как и **2-16** ($K_d = 70$ нМ), и связывался с ними в ограниченной области вокруг жгутика [55]. Для получения 2'-F-содержащих РНК-аптамеров, способных связываться со всей поверхностью трипаносомы ($K_d = 70$ нМ), использовали селекцию на очищенный поверхностный белок sVSG [56, 57].

Получены также 2'-F-РНК-аптамеры к другому виду трипаносом – *Tr. cruzi*, возбудителю болезни Шагаса [58]. На стадии трипомастиготы *Tr. cruzi* связываются с клетками хозяина и проникают в них за счет взаимодействия с внеклеточными матриксными белками клеток хозяина. В концентрации

1 мкМ 2'-Ф-пиримидинсодержащие РНК-аптамеры на 50–80% блокировали проникновение паразитов в клетки.

Большой интерес вызывают аптамеры, способные связываться с бактериями различных видов. Так, проведена селекция ДНК-аптамеров к возбудителю туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* [59]. Однократное введение 0.8 мкг полученного аптамера **NK2** приводило к снижению количества микобактерий у инфицированных туберкулезом мышей, смягчало проявления заболевания и увеличивало продолжительность жизни [59]. Предполагается, что аптамер **NK2** может использоваться в терапии туберкулеза. Получены также аптамеры, способные специфично связываться с поверхностью спор возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis* [60] и кристаллообразующих бактерий *B. thuringiensis* [61], сальмонелл *Salmonella enterica* [62] и *S. typhi* [63], стафилококка *Staphylococcus aureus* [64], молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* [65], кишечной палочки *Escherichia coli* [66, 67] и бактерий *Campylobacter jejuni* [68].

Отдельно стоит выделить эскорт-аптамеры, способные связываться с «чужими» белками, представленными на поверхности зараженных клеток. А. Varfod и соавт. [69] получили аптамеры к белку PfEMP1, который экспрессируется на поверхности эритроцитов, зараженных малярийным плазмодием *Plasmodium falciparum*. Этот белок способствует слипанию эритроцитов (образование так называемых розеток) и прилипанию зараженных эритроцитов к стенкам мелких сосудов. В качестве мишени для селекции 2'-Ф-пиримидинсодержащих РНК-аптамеров использовали рекомбинантный белок DBL1 α – полуконсервативный N-концевой домен белка PfEMP1, ответственный за образование розеток. Полученные аптамеры в концентрации 387 нМ (12 мкг/мл) вызывали практически полное разрушение розеток в культуре клеток, что позволяет рассматривать их как потенциальные противомаларийные средства.

Методом селекции на рекомбинантный белок получены 2'-Ф-РНК-аптамеры к gp120 – белку оболочки вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), способные связываться с gp120 на поверхности инфицированных вирусом клеток (см. обзор [7]).

В работе F. Chen и соавт. [70] описано получение ДНК-аптамеров к экспрессированному на поверхности клеток белку E2 – белку оболочки вируса гепатита С. Для контрселекции использовали не экспрессирующие этот белок клетки той же линии. В результате отбора получили серию аптамеров, из которых наибольшим сродством к поверхностному белку обладал аптамер **ZE2** ($K_d = 1$ нМ) (рис. 9).

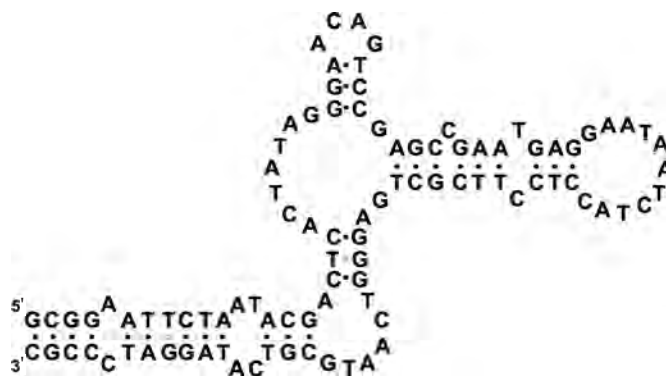


Рис. 9. Предполагаемая вторичная структура ДНК-аптамера **ZE2** к белку оболочки вируса гепатита С [70].

Этот аптамер в концентрации 100 нМ обладал способностью связываться с вирусными частицами и блокировать слияние вирусных частиц с клетками. Эти результаты позволили предположить, что в перспективе аптамер **ZE2** может использоваться как для диагностики гепатита С, так и для лечения больных этим заболеванием, а также при изучении взаимодействия вируса с клетками.

Создание на основе эскорт-аптамеров систем для доставки лекарственных препаратов в клетки, диагностики различных заболеваний и определения патогенных микроорганизмов в окружающей среде и в пищевых продуктах описано в следующем разделе.

ПРИМЕНЕНИЕ ЭСКОРТ-АПТАМЕРОВ

На основе эскорт-аптамеров создано большое количество мультифункциональных конструкций, в которых аптамер выступает в качестве направляющего компонента, обеспечивающего специфическое узнавание клеток или тканей-мишеней. Аптамеры, способные после связывания с поверхностными белками проникать внутрь клеток путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, могут быть использованы в качестве основы для создания высоко-специфичных лекарственных средств, адресно воздействующих на определенные клетки. Другое активно развивающееся направление применения эскорт-аптамеров – создание на их основе высокоточных диагностических систем, позволяющих детектировать клетки-мишени среди других клеток организма. На рис. 10 схематично изображены основные типы конъюгатов эскорт-аптамеров, применяемых в настоящее время для доставки в клетки лекарственных средств и специфической детекции клеток. Данные по применению эскорт-аптамеров кратко суммированы в табл. 2.

Таблица 2. Эскорт-аптамеры и их использование для доставки различных препаратов в клетки и специфической детекции клеток

Аптамер	Мишень	Способ отбора	Применение
2'-F-РНК	Простат-специфичный мембранный антиген (ПСМА)	Селекция на рекомбинантный белок – внеклеточный домен ПСМА [21]	Доставка в опухолевые клетки LNCaP гелонина [71] и доксорубина [72]. Доставка в клетки LNCaP siRNA [74–77]. Доставка в клетки LNCaP наночастиц, содержащих противоопухолевый препарат доцетаксел [82–84]. Визуализация клеток LNCaP с использованием присоединенных к аптамерам наночастиц золота [92] или люминесцентных кристаллов CdSe и CdTe [90]. Электрохимическая детекция клеток рака предстательной железы с использованием аптамера, иммобилизованного на Au-электроде [91]. Детекция ПСМА на поверхности клеток LNCaP методом лигирования сближенных проб [96]
ДНК	Тирозиновая протеинкиназа 7 (РТК-7)	Селекция на предшественники Т-клеточного острого миелобластного лейкоза CCRF-CEM [26]	Доставка в клетки CCRF-CEM доксорубина [73], Au/Ag-наностержней [80, 81], дендримеров на основе полиамидамина [87]. Исследование распределения рецепторов РТК-7 на клеточной поверхности с использованием конъюгатов аптамеров с флуоресцеином [93]. Обратимое флуоресцентное мечение клеток CCRF-CEM с использованием конъюгатов аптамеров с квантовой точкой Qdot525 [94]
2'-F-РНК	CD4-рецептор крысы	Селекция на рекомбинантный белок [40]	Доставка в клетки siRNA [78]
2'-F-РНК	Белок оболочки ВИЧ-1	Селекция на рекомбинантный белок gp120 [79]	Доставка siRNA в клетки, инфицированные ВИЧ-1 [7, 79]
ДНК	Муцин (MUC1)	Селекция на синтетические пептиды – фрагменты муцина [23, 24]	Фотодинамическая терапия с использованием фотореакционноспособных конъюгатов аптамера с хлорином e6 [24]. Визуализация опухолей с использованием радиоактивных изотопов (⁹⁹ Tc) [88]
ДНК, РНК	Трансферриновый рецептор мыши (TfR)	Селекция на рекомбинантный белок – внеклеточный домен TfR [43]	Доставка в клетки лизосомных ферментов для лечения лизосомных болезней накопления [43]
2'-F-РНК	Тенасцин С	Перекрестная селекция с использованием рекомбинантного белка и клеток U251 [19]	Визуализация опухолей с использованием радиоактивных изотопов (⁹⁹ Tc) [89]
ДНК	Связанная с мембраной тяжелая цепь иммуноглобулина М	Селекция на В-клетки лимфомы Беркитта (Ramos-клетки) [31]	Мицеллы для доставки в клетки различных препаратов [86]. Тест-полоски для обнаружения Ramos-клеток в образцах крови на основе аптамеров TD05 и TE02 [95]
ДНК	Бактерии <i>B. thuringiensis</i>	Селекция на споры <i>B. thuringiensis</i> [61]	Детекция спор <i>B. thuringiensis</i> с использованием конъюгатов аптамеров с квантовыми точками CdSe-ZnS [61]
РНК	Бактерии <i>E. coli</i>	Селекция на штамм <i>E. coli</i> DH5α [67]	Потенциометрическая детекция <i>E. coli</i> с использованием аптамеров, присоединенных к углеродным нанотрубкам [67]. Детекция <i>E. coli</i> методом количественной ОТ-ПЦР РНК-аптамеров, связавшихся с бактериями [98]
РНК	Бактерии <i>S. typhi</i>	Селекция на основной белок микроворсинок <i>S. typhi</i> [63]	Потенциометрическая детекция <i>S. typhi</i> с использованием аптамеров, присоединенных к углеродным нанотрубкам [97]
ДНК	Мезенхимные стволовые клетки	Селекция на свиные мезенхимные стволовые клетки [49]	Выделение стволовых клеток из костного мозга с использованием аптамеров, иммобилизованных на магнитных частицах, сортировка клеток с использованием флуоресцентных конъюгатов аптамеров [49]
ДНК	Предшественники клеток эндотелия свиньи	Селекция на CD31-положительные клетки из крови свиньи [50]	Иммобилизация, рост и дифференциация предшественников эндотелиальных клеток на поверхности дисков с иммобилизованными аптамерами – модели сосудистых имплантатов [50]

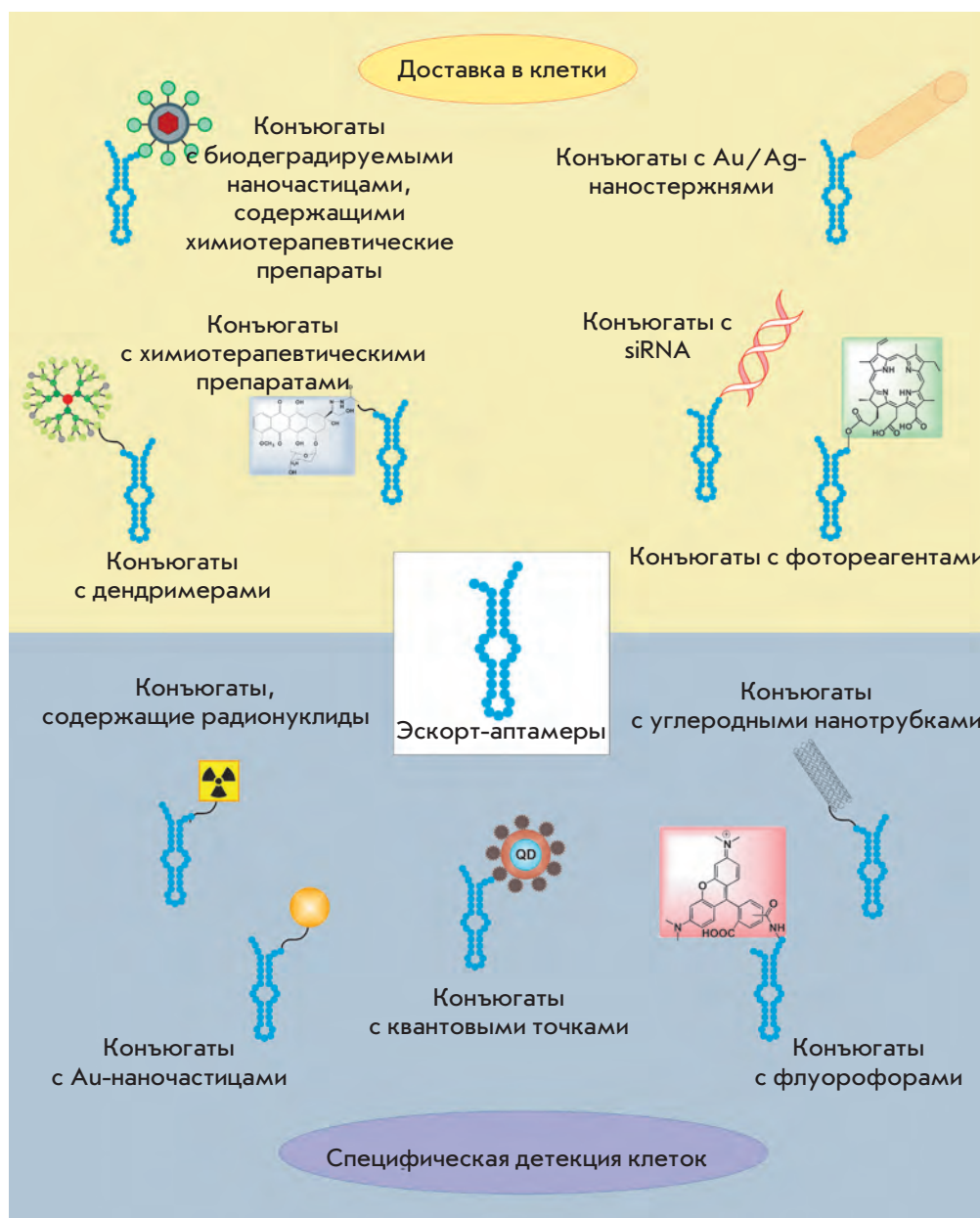


Рис. 10. Основные типы конъюгатов эскорт-аптамеров, используемых для адресной доставки терапевтических препаратов в клетки и для специфической детекции клеток.

Использование эскорт-аптамеров для доставки в клетки различных препаратов

Одни из наиболее популярных кандидатов для создания систем доставки – анти-ПСМА-аптамеры **A9** и **A10**, которые связываются с простатспецифичным мембранным антигеном [20]. Этот белок способен проникать в клетки за счет клатрин-опосредованной интернализации [97], а его гиперэкспрессия характерна для многих опухолей. Сочетание этих факторов обусловило интерес к использованию анти-ПСМА-аптамеров в качестве адресующей части для доставки различных противоопухолевых средств в клетки. Так, конъюгирование анти-ПСМА-аптамера **A9**

с белковым токсином гелонином привело к увеличению цитотоксичности по отношению к клеткам-мишеням примерно в 180 раз по сравнению со свободным гелонином ($IC_{50} = 27$ нМ для конъюгата и 5 мкМ для гелонина) [71]. При этом в случае контрольных клеток, не экспрессирующих белок ПСМА, цитотоксичность конъюгата аптамер-гелонин была ниже, чем у свободного гелонина ($IC_{50} = 15$ мкМ), что говорит о высокой избирательности этого конъюгата. Анти-ПСМА-аптамер **A10** был использован V. Bagalkot и соавт. [72] для доставки в клетки доксорубина. Антрациклиновый антибиотик доксорубин широко применяется при целом спектре заболеваний, таких,

как лейкозы, злокачественные лимфомы, саркомы, рак различной этиологии, однако к числу его недостатков относятся побочные токсические эффекты, в частности кардиотоксичность. Для получения конъюгатов [72] использовали способность доксорубина интеркалировать между парами оснований двухцепочечных нуклеиновых кислот. В результате интеркаляции доксорубина в двухцепочечный участок аптамера **A10** получили нековалентные конъюгаты. Цитотоксичность этих конъюгатов в отношении клеток-мишеней LNCaP была такой же, как у свободного доксорубина в той же концентрации ($IC_{50} = 5 \text{ мкМ}$). На контрольных клетках РС3 цитотоксичность конъюгатов была значительно ниже. Для доставки доксорубина в клетки ССRF-СЕМ лимфобластного лейкоза человека использовали эскорт-аптамер **sgc8c** («укороченный» вариант аптамера **sgc8**). В работе Y. Huang и соавт. [73] получен конъюгат аптамера **sgc8c** с доксорубином, присоединенным к 5'-концу аптамера кислотолabileм гидразоновой связью, гидролизующейся после проникновения конъюгата в клетку. Показано, что такие конъюгаты способны селективно проникать в клетки ССRF-СЕМ путем рецептор-опосредованного эндоцитоза и обладают в отношении этих клеток такой же цитотоксичностью, как и свободный доксорубин ($IC_{50} = 0.3 \text{ мкМ}$). При этом для контрольных Ramos-клеток конъюгат аптамера с доксорубином, в отличие от свободного доксорубина, был нетоксичным. Таким образом, присоединение к химиотерапевтическим средствам эскорт-аптамеров позволяет ограничить их токсическое воздействие только опухолевыми клетками. Можно полагать, что на основе таких конъюгатов будут созданы новые средства для химиотерапии опухолей, обладающие минимальными побочными эффектами.

Эскорт-аптамеры использовали также для доставки в клетки малых интерферирующих РНК (siRNA). На основе анти-ПСМА-аптамеров разработано несколько типов конструкций для доставки siRNA. Для доставки siRNA в ПСМА-положительные опухолевые клетки использовали тетрамерный биотин-стрептавидиновый комплекс, в состав которого входили две биотинилированные цепи аптамера **A9** и две биотинилированные молекулы siRNA, направленные на мРНК генов ламина А/С или *GADPH* (рис. 11А) [74]. Такие комплексы проникали в клетки без использования трансфектантов и в концентрации 22.5 нМ подавляли экспрессию генов-мишеней на 50–80% – с той же эффективностью, что и соответствующие siRNA, доставленные в клетки при помощи олигофектамина. Созданы химерные конструкции, которые представляли собой единую нуклеотидную последовательность, содержащую аптамер **A10**

и одну из цепей siRNA с комплементарно присоединенной к ней второй цепью siRNA (рис. 11Б) [75]. Эти конструкции в концентрации 400 нМ способны проникать в ПСМА-положительные клетки без помощи трансфектантов и практически полностью подавляли экспрессию генов-мишеней *bcl2* и *plk1*. С целью оптимизации структуры химерных конструкций адресующий аптамер был укорочен с 71 до 39 нуклеотидов, что упростило химический синтез обоих компонентов конструкции. В структуру siRNA, направленной на мРНК гена *PLK1*, был введен ряд модификаций, повышающих специфичность и эффективность взаимодействия с мРНК-мишенью. К «пассажирской» цепи siRNA был присоединен остаток полиэтиленгликоля с молекулярным весом 20 кДа, что позволило увеличить период полужизни химерных конструкций в крови мышей с 35 мин до 30 ч. Полученный препарат вызывал существенную регрессию ПСМА-положительной опухоли у мышей после введения пяти доз по 0.25 нмоль [76].

Описан еще один вариант химерной конструкции, содержащей две молекулы анти-ПСМА-аптамера **A10-3**: одна из цепей siRNA, направленной на мРНК эукариотического фактора элонгации 2 (eEF2), «встроена» между двумя аптамерными последо-

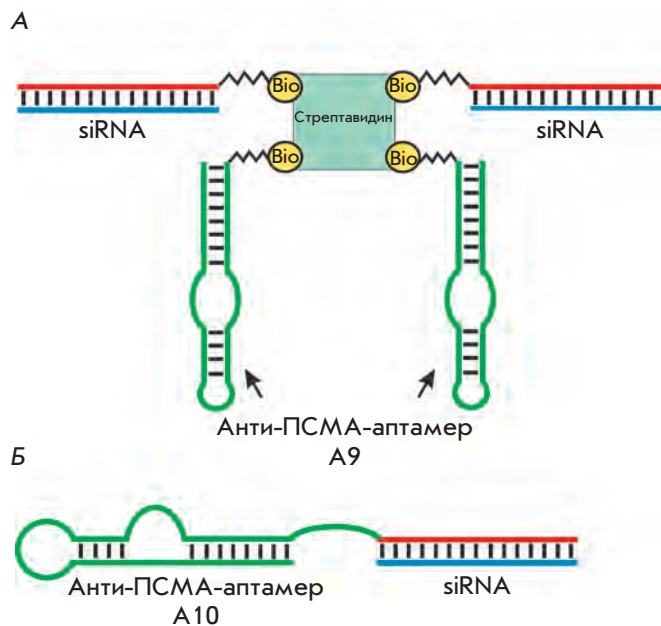


Рис. 11. Схематическое изображение химерных конструкций для доставки siRNA в ПСМА-положительные клетки. А – Конъюгат биотинилированных анти-ПСМА-аптамера и siRNA, соединенных через стрептавидин [74]. Б – Химерная РНК, состоящая из анти-ПСМА-аптамера и siRNA [75]. Bio – остаток биотина.

вательностями, а вторая присоединена к ней комплементарно [77]. Такие конъюгаты в концентрации 2 мкМ на 95% подавляли рост клеток-мишеней, не влияя при этом на рост ПСМА-отрицательных контрольных клеток.

Интересный вариант конструкций, содержащих «адресующий» аптамер и siRNA, описан в работе [78]. Для их создания использована РНК фага φ29, способная образовывать мультимерные комплексы благодаря взаимодействию петель РНК. К каждому из компонентов конструкции – к аптамеру, узнающему рецептор CD4 [40], к siRNA, направленным на мРНК различных факторов апоптоза, и к флуоресцентному красителю – присоединяли фрагмент фаговой РНК. Образующиеся в результате тримеры, содержащие аптамер, siRNA и репортерную группу, были способны проникать в CD4-положительные клетки и ингибировать экспрессию генов-мишеней при концентрации 100 нМ.

Для воздействия на инфицированные ВИЧ-1 клетки использовали химерные конструкции [7, 79], созданные по принципу, предложенному J. McNamara и соавт. [75], и состоящие из 2'-F-РНК-аптамера, узнающего на клеточной поверхности вирусный белок gp120, и siRNA, направленной на РНК *Tat/Rev* ВИЧ-1. Такие конструкции способны ингибировать репликацию ВИЧ-1 в культуре клеток (при концентрации 400 нМ) [79]. Сообщается также об их использовании для подавления репликации вируса в органах мышей [7].

Для фототермического воздействия на лейкозные клетки использовали конъюгаты аптамера **sgc8c** с золото-серебряными наностержнями [80, 81]. При облучении лазером наностержни нагреваются до 50°C, что приводит к гибели клеток от теплового шока. Конъюгаты аптамеров с наностержнями (к одному наностержню было присоединено около 80 молекул аптамера) селективно проникали в клетки-мишени, при этом около 90% клеток погибали после облучения [81].

На основе аптамеров, способных связываться с поверхностным белком муцином, созданы реакционноспособные соединения для фотодинамической терапии – ковалентные конъюгаты аптамеров с хлорином e6 [24]. Такие конъюгаты селективно проникали в опухолевые клетки, экспрессирующие муцин, и после облучения вызывали их гибель с эффективностью в 500 раз большей, чем у свободного хлорина. При этом для здоровых клеток конъюгаты были нетоксичными.

ДНК-аптамер к трансферриному рецептору мышцы использовали для доставки в клетки лизосомного фермента α -L-идуронидазы [43]. Показано, что конъюгаты аптамер-фермент проникают в фи-

бробласты мышцы с дефицитом этого фермента, а затем попадают в лизосомы, где введенный фермент способен функционировать, восстанавливая метаболизм клетки. Полученные результаты позволяют рассматривать конъюгаты аптамеров к трансферриновому рецептору с лизосомными ферментами как перспективные препараты для коррекции заболеваний, связанных с нарушением функций лизосом.

Для специфичной доставки терапевтических средств используют также различного рода носители, присоединенные к адресующим аптамерам. Так, к молекуле анти-ПСМА-аптамера **A10** ковалентно присоединяли наночастицы, состоящие из сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), с инкапсулированным в них доцетакселом [82–84]. Полученные конъюгаты специфически связывались с клетками LNCaP, экспрессирующими белок ПСМА, и проникали в них [82, 85]. На мышах с привитым раком предстательной железы было показано, что конъюгаты анти-ПСМА-аптамеров с наночастицами на основе PLGA, содержащими доцетаксел, эффективно подавляют рост опухолей и даже приводят к полной ремиссии [83].

Описано создание мицелл на основе аптамера **TD05** с присоединенным остатком стеариновой кислоты [86]. Такие мицеллы обладали повышенным по сравнению с индивидуальным аптамером **TD05** сродством к клеткам-мишеням и специфично проникали в клетки; в дальнейшем планируется использовать их для доставки в клетки лекарственных средств.

В качестве носителя лекарственных средств в работе J. Zhou и соавт. [87] предложено использовать полиамидиноаминные (РАМАМ) дендримеры. Созданные конъюгаты аптамера **sgc8c** с дендримерами были способны селективно и эффективно связываться с клетками CCRF-CEM и проникать в них. Размер конъюгата аптамер-дендример составляет около 8 нм и является оптимальным для использования таких конъюгатов в качестве основы для терапевтических средств.

Таким образом, использование аптамеров для адресной доставки наночастиц с противоопухолевыми средствами в опухолевые ткани представляется перспективным направлением в разработке новых стратегий терапии опухолей.

Использование эскорт-аптамеров для специфической детекции клеток

Способность эскорт-аптамеров селективно узнавать клетки определенного типа позволяет создавать на их основе высокоспецифичные системы детекции. Введение в состав аптамеров меток различной природы позволяет использовать их для детекции клеток в культурах, в биологических образцах,

а также непосредственно в живых многоклеточных организмах. Так, аптамеры, содержащие радиоактивные метки, использовали для визуализации опухолей у мышей. Конъюгаты антитенасцинового аптамера **ТТА1** и антимуциновых аптамеров с хелатирующими агентами, способными связывать ^{99}Tc , использовали для визуализации привитых мышам ксенотрансплантатов глиобластомы и рака молочной железы [88, 89].

Разнообразные системы детекции клеток рака предстательной железы созданы на основе анти-ПСМА-аптамеров. В работе Т. Chu и соавт. [90] для визуализации ПСМА-положительных клеток получены конъюгаты анти-ПСМА-аптамера **A9** с люминесцентными кристаллами CdSe и CdTe (так называемыми квантовыми точками). Эти конъюгаты эффективно и специфично связывались с клетками LNCaP, распределенными в модельной ткани – трехмерном коллагеновом матриксе. Для электрохимической детекции двух типов клеток рака предстательной железы – содержащих на поверхности ПСМА (ПСМА(+)) и не содержащих этого белка (ПСМА(-)), использованы иммобилизованные на золотом электроде «двойные» конструкции, состоящие из анти-ПСМА-РНК-аптамера **A10** и пептидного аптамера к ПСМА(-)-клеткам [91]. В работе D. Javier и соавт. [92] для визуализации ПСМА-положительных клеток в состав анти-ПСМА-аптамеров вводили дополнительные олигонуклеотидные фрагменты, комплементарные 24-звенным олигонуклеотидам, ковалентно присоединенным к наночастицам золота. Методом детекции отраженного света с использованием конфокального микроскопа наблюдали связывание таких комплексов с ПСМА на клеточной поверхности.

Конъюгаты ДНК-аптамера **sgc8** с флуоресцеином использовали для изучения распределения рецепторов РТК-7 на клеточной поверхности методом флуоресцентной корреляционной микроскопии [93]. Предложен новый способ обратимого флуоресцентного мечения живых клеток, продемонстрированный на примере клеток CCRF-CEM [94]. Конъюгаты аптамера **sgc8** с квантовой точкой Qdot525 селективно связывались с клетками, а после обработки ДНК-азой наблюдалось полное удаление конъюгатов с клеточной поверхности, при этом клетки оставались жизнеспособными. Перспективным применением этого метода является флуоресцентная сортировка, позволяющая быстро и эффективно выделять клетки нужного типа. Флуоресцентная сортировка стволовых клеток с использованием флуоресцеиновых конъюгатов аптамеров описана также в работе К. Guo и соавт. [49].

Аптамеры **TD05** и **TE02** к Ramos-клеткам лимфомы применили [95] при создании биосенсоров в виде

тест-полосок для быстрого определения циркулирующих в крови злокачественных клеток. Тест-зона биосенсора содержит конъюгаты аптамера **TD05** с золотыми наночастицами. Эти конъюгаты образуют с Ramos-клетками окрашенные комплексы, которые затем мигрируют по полоске и удерживаются в индикаторной зоне биосенсора благодаря связыванию Ramos-клеток с иммобилизованным аптамером **TE02**. В результате образуется характерная полоса красного цвета. Такие биосенсоры могут использоваться для обнаружения клеток непосредственно в образцах крови с возможностью визуальной качественной оценки или количественного определения при помощи портативного сканера.

Для обнаружения ПСМА-белка на поверхности клеток предложено использовать так называемый метод лигирования сблизженных проб (см. рис. 12) [96]. Система состоит из аптамеров **A9**, содержащих на 3'- или 5'-конце дополнительные олигонуклеотидные фрагменты, а также комплементарные этим фрагментам ДНК-пробы и «скрепляющий» олигодезоксирибонуклеотид, частично комплементарный каждой из ДНК-проб. Поскольку ПСМА представляет собой димер, при связывании аптамеров с ПСМА на клеточной поверхности ДНК-пробы располагаются достаточно близко для соединения их «скрепляющим» олигомером через образование комплементарного комплекса. Затем происходит лигирование ДНК-проб в этом комплексе, а для детекции образовавшейся дцДНК используют ПЦР в режиме реального времени. Этот метод очень чувствителен и позволяет обнаруживать 10 клеток LNCaP (рак предстательной железы) в присутствии 10^5 клеток HeLa, которые не содержат на поверхности белок ПСМА.

Недавно было предложено использовать аптамеры, связывающиеся с бактериями, при создании биосенсоров для детекции патогенных микроорганизмов. ДНК-аптамеры с присоединенными к ним квантовыми точками CdSe-ZnS использовали для флуоресцентной детекции *B. thuringiensis* [61]. На основе РНК-аптамеров, иммобилизованных на поверхности одностенных углеродных нанотрубок, созданы потенциометрические биосенсоры для определения *E. coli* [67] и *S. typhi* [97] и показана возможность их использования для селективной детекции этих бактерий. Разработан метод детекции *E. coli*, основанный на количественной ОТ-ПЦР РНК-аптамеров, связавшихся с бактериями, иммобилизованными на магнитных частицах [98]. Новые биосенсоры на основе аптамеров могут найти применение для высокочувствительного определения бактерий в пищевых продуктах и окружающей среде, а также в диагностике инфекционных заболеваний.

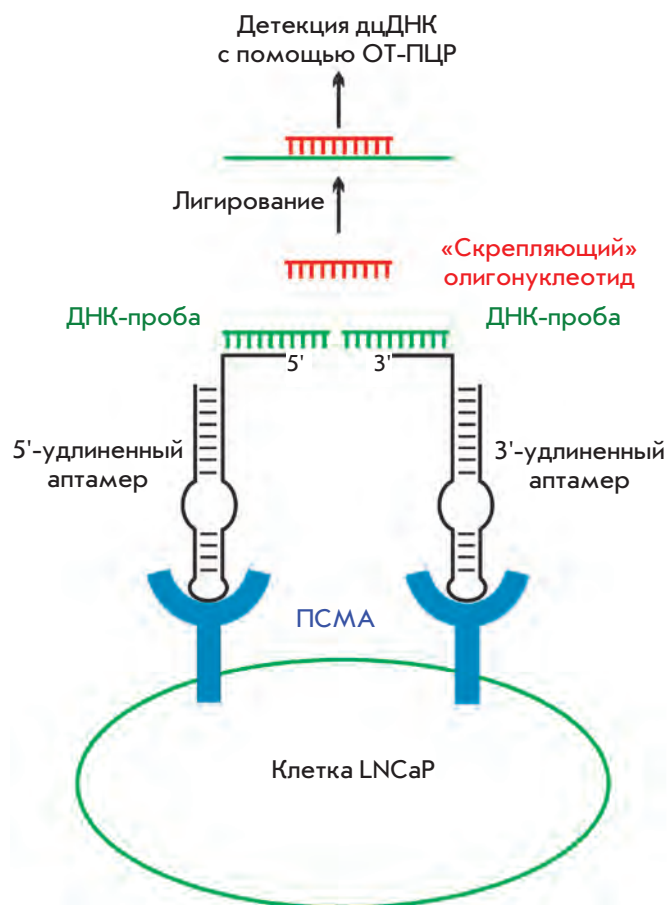


Рис. 12. Детекция ПСМА на поверхности клеток с использованием анти-ПСМА-аптамеров методом лигирования сближенных проб [96]. Метод включает следующие стадии: 1) – формирование компонентных комплексов аптамеров с ДНК-пробами; 2) – связывание аптамеров с ПСМА на клеточной поверхности, в результате которого происходит сближение двух ДНК-проб; 3) – гибридизация обеих ДНК-проб со «скрепляющим» олигонуклеотидом; 4) – лигирование ДНК-проб в образовавшемся комплексе; 5) – детекция полученной дцДНК методом ПЦР в реальном времени.

Отдельно следует выделить еще одну многообещающую область применения эскорт-аптамеров – селективное выделение клеток или их иммобилизацию. Так, присоединение к магнитным частицам аптаме-

ров, связывающихся со стволовыми клетками свиньи, позволило создать систему селективного выделения стволовых клеток из костного мозга [49]. В работе [50] ДНК-аптамеры, способные связываться с предшественниками эндотелиальных клеток свиньи, были иммобилизованы на поверхности дисков из политетрафторэтилена или полидиметилсилоксана. Оказалось, что с использованием таких покрытых аптамерами дисков можно селективно выделить из крови предшественники эндотелиальных клеток, которые затем, оставаясь связанными с дисками, дифференцируются в клетки сосудистого эндотелия. Предполагается, что в дальнейшем этот подход можно будет использовать для эпителизации сосудистых имплантатов, снижая тем самым риск их отторжения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящее время создан ряд эскорт-аптамеров, способных специфично и эффективно связываться с клетками определенного типа, разработаны подходы к повышению устойчивости эскорт-аптамеров в биологических средах. Показано, что на основе эскорт-аптамеров могут быть созданы эффективные и высокоспецифичные системы доставки терапевтических средств в клетки, детекции клеток определенного типа, сортировки клеток, избирательного блокирования поверхностных белков. С каждым годом появляется все больше работ, посвященных отбору и применению эскорт-аптамеров к самым различным клеточным мишеням, от бактерий до стволовых клеток. Необходимо отметить, что селекция аптамеров на живые клетки до сих пор остается более трудоемким и «тонким» процессом, чем отбор аптамеров к индивидуальным соединениям, однако растущий интерес к этому направлению и совершенствование методов селекции позволяют надеяться на появление в ближайшем будущем еще большего разнообразия эскорт-аптамеров, а также терапевтических и диагностических агентов на их основе. ●

*Обзор подготовлен при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных
исследований (грант № 11-04-01014-а), а также
гранта Правительства Новосибирской области
для молодых ученых 2011 г.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ellington A.D., Szostak J.W. // Nature. 1990. V. 346. P. 818–822.
2. Tuerk C., Gold L. // Science. 1990. V. 249. P. 505–510.
3. Robertson D.L., Joyce G.F. // Nature. 1990. V. 344. P. 467–468.
4. Mayer G. // Angew. Chem. Int. Ed. 2009. V. 48. P. 2672–2689.
5. Stoltenburg R., Reinemann C., Strehlitz B. // Biomol. Eng. 2007. V. 24. P. 381–403.
6. Shamah S.M., Healy J.M., Cload S.T. // Acc. Chem. Res. 2008. V. 41. P. 130–138.
7. Zhou J., Rossi J.J. // Oligonucleotides. 2011. V. 21. P. 1–10.
8. Syed M.A., Pervaiz S. // Oligonucleotides. 2010. V. 20. P. 215–224.

9. Chapman J.A., Beckey C. // *Ann. Pharmacother.* 2006. V. 40. P. 1322–1326.
10. Ng E.W., Shima D.T., Calias P., Cunningham E.T., Guyer D.R., Adamis A.P. // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2006. V. 5. P. 123–132.
11. Hicke B.J., Stephens A.W. // *J. Clin. Invest.* 2000. V. 106. P. 923–928.
12. Breaker R.R. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1997. V. 1. P. 26–31.
13. Fitzwater T., Polisky B. // *Meth. Enzymol.* 1996. V. 267. P. 275–301.
14. Sousa R. // *Meth. Enzymol.* 2000. V. 317. P. 65–74.
15. Chelliserrykattil J., Ellington A.D. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 1155–1160.
16. Burmeister P.E., Lewis S.D., Silva R.F., Preiss J.R., Horwitz L.R., Pendergrast P.S., McCauley T.G., Kurz J.C., Epstein D.M., Wilson C., et al. // *Chem. Biol.* 2005. V. 12. P. 25–33.
17. Schmidt K.S., Borkowski S., Kurreck J., Stephens A.W., Bald R., Hecht M., Friebe M., Dinkelborg L., Erdmann V.A. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. P. 5757–5765.
18. Shangguan D., Tang Z., Mallikaratchy P., Xiao Z., Tan W. // *ChemBiochem.* 2007. V. 8. P. 603–606.
19. Hicke B.J., Marion C., Chang Y.F., Gould T., Lynott C.K., Parma D., Schmidt P.G., Warren S. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 48644–48654.
20. Morris K.N., Jensen K.B., Julin C.M., Weil M., Gold L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 2902–2907.
21. Lupold S.E., Hicke B.J., Lin Y., Coffey D.S. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. P. 4029–4033.
22. Ferreira C., Papamichael K., Guilbault G., Schwarzacher T., Garipey J., Missailidis S. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 390. P. 1039–1050.
23. Ferreira C.S., Matthews C.S., Missailidis S. // *Tumour Biol.* 2006. V. 27. P. 289–301.
24. Ferreira C.S., Cheung M.C., Missailidis S., Bisland S., Garipey J. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. 866–876.
25. Daniels D.A., Chen H., Hicke B.J., Swiderek K.M., Gold L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 15416–15421.
26. Shangguan D., Li Y., Tang Z., Cao Z.C., Chen H.W., Mallikaratchy P., Sefah K., Yang C.J., Tan W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 11838–11843.
27. Shangguan D., Cao Z.C., Li Y., Tan W. // *Clin. Chem.* 2007. V. 53. P. 1153–1155.
28. Shangguan D., Cao Z., Meng L., Mallikaratchy P., Sefah K., Wang H., Li Y., Tan W. // *J. Proteome Res.* 2008. V. 7. P. 2133–2139.
29. Xiao Z., Shangguan D., Cao Z., Fang X., Tan W. // *Chemistry.* 2008. V. 14. P. 1769–1775.
30. Li N., Ebright J.N., Stovall G.M., Chen X., Nguyen H.H., Singh A., Syrett A., Ellington A.D. // *J. Proteome Res.* 2009. V. 8. P. 2438–2448.
31. Tang Z., Shangguan D., Wang K., Shi H., Sefah K., Mallikaratchy P., Chen H.W., Li Y., Tan W. // *Anal. Chem.* 2007. V. 79. P. 4900–4907.
32. Mallikaratchy P., Tang Z., Kwame S., Meng L., Shangguan D., Tan W. // *Mol. Cell. Proteom.* 2007. V. 6. P. 2230–2238.
33. Mallikaratchy P.R., Ruggiero A., Gardner J.R., Kuryavyi V., Maguire W.F., Heaney M.L., McDevitt M.R., Patel D.J., Scheinberg D.A. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. P. 2458–2469.
34. Sefah K., Tang Z.W., Shangguan D.H., Chen H., Lopez-Colon D., Li Y., Parekh P., Martin J., Meng L., Phillips J.A., et al. // *Leukemia.* 2009. V. 23. P. 235–244.
35. Chen H.W., Medley C.D., Sefah K., Shangguan D., Tang Z., Meng L., Smith J.E., Tan W. // *ChemMedChem.* 2008. V. 3. P. 991–1001.
36. Shangguan D., Meng L., Cao Z.C., Xiao Z., Fang X., Li Y., Cardona D., Witek R.P., Liu C., Tan W. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 721–728.
37. Blank M., Weinschenk T., Priemer M., Schluesener H. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 16464–16468.
38. Zueva E., Rubio L.I., Ducongé F., Tavitian B. // *Int. J. Cancer.* 2011. V. 128. P. 797–804.
39. 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.
40. Kraus E., James W., Barclay A.N. // *J. Immunol.* 1998. V. 160. P. 5209–5212.
41. Davis K.A., Lin Y., Abrams B., Jayasena S.D. // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 3915–3924.
42. Santuli-Marotto S., Nair S.K., Rusconi C., Sullenger B., Gilboa E. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. P. 7483–7489.
43. Chen C.-H.B., 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.
44. Ohuchi S.P., Ohtsu T., Nakamura Y. // *Biochimie.* 2006. V. 88. P. 897–904.
45. Cerchia L., Duconge F., Pestourie C., Boulay J., Aissouni Y., Gombert K., Tavitian B., de Francis V., Libri D. // *PLoS Biol.* 2005. V. 3. e123.
46. Pestourie C., Cerchia L., Gombert K., Aissouni Y., Boulay J., De Francis V., Libri D., Tavitian B., Duconge F. // *Oligonucleotides.* 2006. V. 16. P. 323–335.
47. Wang C., Zhang M., Yang G., Zhang D., Ding H., Wang H., Fan M., Shen B., Shao N. // *J. Biotechnol.* 2003. V. 102. P. 15–22.
48. Guo K., Wendel H.P., Scheideler L., Ziemer G., Scheule A.M. // *J. Cell Mol. Med.* 2005. V. 9. P. 731–736.
49. Guo K.T., Schafer R., Paul A., Gerber A., Ziemer G., Wendel H.P. // *Stem Cells.* 2006. V. 24. P. 2220–2231.
50. Hoffmann J., Paul A., Harwardt M., Groll J., Reeswinkel T., Klee D., Moeller M., Fischer H., Walker T., Greiner T., et al. // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2008. V. 84A. P. 614–621.
51. Berezovski M.V., Lechmann M., Musheev M.U., Mak T.W., Krylov S.N. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 9137–9143.
52. Homann M., Göringer H.U. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. P. 2006–2014.
53. Homann M., Göringer H.U. // *Bioorg. Med. Chem.* 2001. V. 9. P. 2571–2580.
54. Göringer H.U., Homann M., Zacharias M., Adler A. // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2006. V. 173. P. 375–393.
55. Homann M., Lorger M., Engstler M., Zacharias M., Göringer H. // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2008. V. 9. P. 491–499.
56. Göringer H.U., Homann M., Lorger M. // *Int. J. Parasitol.* 2003. V. 33. P. 1309–1317.
57. Lorger M., Engstler M., Homann M., Göringer H.U. // *Eukaryot. Cell.* 2003. V. 2. P. 84–94.
58. Ulrich H., Magdesian M.H., Alves M.J., Colli W. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 20756–20762.
59. Chen F., Zhou J., Luo F., Mohammed A.B., Zhang X.L. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 357. P. 743–748.
60. Torres-Chavolla E., Alcolija E.C. // *Biosens. Bioelectron.* 2009. V. 24. P. 3175–3182.
61. Ikanovic M., Rudzinski W., Bruno J., Allman A., Carrillo M., Dwarakanath S., Bhaadigadi S., Rao P., Kiel J., Andrews C. // *J. Fluoresc.* 2007. V. 17. P. 193–199.
62. Joshi R., Janagama H., Dwivedi H.P., Senthil Kumar T.M.A., Jaykus L.-A., Scheffers J., Sreevatsan S. // *Mol. Cell. Probes.* 2009. V. 23. P. 20–28.
63. Pan Q., Zhang X.-L., Wu H.-Y., He P.-W., Wang F., Zhang M.-S., Hu J.-M., Xia B., Wu J. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. V. 49. P. 4052–4060.
64. Cao X., Li S., Chen L., Ding H., Xu H., Huang Y., Li J., Liu N.,

- Cao W., Zhu Y., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. 4621–4628.
65. Hamula C.L.A., Zhang H., Guan L.L., Li X.-F., Le X.C. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 7812–7819.
66. Bruno J., Carrillo M., Phillips T., Andrews C. // *J. Fluoresc.* 2010. V. 20. P. 1211–1223.
67. So H.-M., Park D.-W., Jeon E.-K., Kim Y.-H., Kim B.S., Lee C.-K., Choi S.Y., Kim S.C., Chang H., Lee J.-O. // *Small.* 2008. V. 4. P. 197–201.
68. Dwivedi H., Smiley R., Jaykus L.-A. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 87. P. 2323–2334.
69. Barfod A., Persson T., Lindh J. // *Parasitol. Res.* 2009. V. 105. P. 1557–1566.
70. Chen F., Hu Y., Li D., Chen H., Zhang X.-L. // *PLoS One.* 2009. V. 4. P. e8142.
71. Chu T.C., Marks J.W., 3rd, Lavery L.A., Faulkner S., Rosenblum M.G., Ellington A.D., Levy M. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 5989–5992.
72. Bagalkot V., Farokhzad O.C., Langer R., Jon S. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2006. V. 45. P. 8149–8152.
73. Huang Y.F., Shangguan D., Liu H., Phillips J.A., Zhang X., Chen Y., Tan W. // *ChemBiochem.* 2009. V. 10. P. 862–868.
74. Chu T.C., Twu K.Y., Ellington A.D., Levy M. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. e73.
75. McNamara J.O., Andrechek E.R., Wang Y., Viles K.D., Rempel R.E., Gilboa E., Sullenger B.A., Giangrande P.H. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 1005–1015.
76. Dassie J.P., Liu X.-Y., Thomas G.S., Whitaker R.M., Thiel K.W., Stockdale K.R., Meyerholz D.K., McCaffrey A.P., McNamara J.O., Giangrande P.H. // *Nat. Biotechnol.* 2009. V. 27. P. 839–846.
77. Wullner U., Neef I., Eller A., Kleines M., Tur M.K., Barth S. // *Curr. Cancer Drug Targets.* 2008. V. 8. P. 554–565.
78. Khaled A., Guo S., Li F., Guo P. // *Nano Lett.* 2005. V. 5. P. 1797–1808.
79. Zhou J., Swiderski P., Li H., Zhang J., Neff C.P., Akkina R., Rossi J.J. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. 3094–3109.
80. Huang Y.F., Chang H.T., Tan W. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 567–572.
81. Huang Y.F., Sefah K., Bamrungsap S., Chang H.T., Tan W. // *Langmuir.* 2008. V. 24. P. 11860–11865.
82. Farokhzad O.C., Jon S., Khademhosseini A., Tran T.N., Lavan D.A., Langer R. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 7668–7672.
83. Farokhzad O.C., Cheng J., Teply B.A., Sherifi I., Jon S., Kantoff P.W., Richie J.P., Langer R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 6315–6320.
84. Cheng J., Teply B., Sherifi I., Sung J., Luther G., Gu F.X., Levy-Nissenbaum E., Radovic-Moreno A.F., Langer R., Farokhzad O.C. // *Biomaterials.* 2007. V. 28. P. 869–876.
85. Farokhzad O.C., Khademhosseini A., Jon S., Hermmann A., Cheng J., Chin C., Kiselyuk A., Teply B., Eng G., Langer R. // *Anal. Chem.* 2005. V. 77. P. 5453–5459.
86. Wu Y., Sefah K., Liu H., Wang R., Tan W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 5–10.
87. Zhou J., Soontornworajit B., Martin J., Sullenger B.A., Gilboa E., Wang Y. // *Macromol. Biosci.* 2009. V. 9. P. 831–835.
88. Perkins A.C., Missailidis S. // *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2007. V. 51. P. 292–296.
89. Hicke B.J., Stephens A.W., Gould T., Chang Y.-F., Lynott C.K., Heil J., Borkowski S., Hilger C.-S., Cook G., Warren S., et al. // *J. Nucl. Med.* 2006. V. 47. P. 668–678.
90. Chu T.C., Shieh F., Lavery L.A., Levy M., Richards-Kortum R., Korgel B.A., Ellington A.D. // *Biosens. Bioelectron.* 2006. V. 21. P. 1859–1866.
91. Min K., Song K.-M., Cho M., Chun Y.-S., Shim Y.-B., Ku J. K., Ban C. // *Chem. Commun.* 2010. V. 46. P. 5566–5568.
92. Javier D.J., Nitin N., Levy M., Ellington A., Richards-Kortum R. // *Bioconjugate Chem.* 2008. V. 19. P. 1309–1312.
93. Chen Y., Munteanu A.C., Huang Y.-F., Phillips J., Zhu Z., Mavros M., Tan W. // *Chem. Eur. J.* 2009. V. 15. P. 5327–5336.
94. Terazono H., Anzai Y., Soloviev M., Yasuda K. // *J. Nanobiotechnol.* 2010. V. 8. P. 8.
95. Liu G., Mao X., Phillips J.A., Xu H., Tan W., Zeng L. // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. P. 10013–10018.
96. Pai S.S., Ellington A.D. // *Meth. Mol. Biol.* 2009. V. 504. P. 385–398.
97. Zelada-Guillén G.A., Jordi R., Düzgün A., Rius F.X. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009. V. 48. P. 7334–7337.
98. Lee H.-J., Kim B.C., Kim K.-W., Kim Y.K., Kim J., Oh M.-K. // *Biosens. Bioelectron.* 2009. V. 24. P. 3550–3555.