

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

на правах рукописи

Антипова Ольга Михайловна

**Аптамеры к поверхностным антигенам CD133 и EGFR
для тераностики глиом**

1.4.9. Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва — 2025

Диссертация подготовлена на кафедре химии природных соединений
химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Научный
руководитель**

Копылов Алексей Михайлович
доктор химических наук, профессор

**Официальные
оппоненты**

Тишков Владимир Иванович
доктор химических наук, профессор,
ФГБУ ВО «Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова»,
химический факультет,
профессор кафедры химической энзимологии

Коваль Ольга Александровна
доктор биологических наук,
ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной
медицины Сибирского отделения РАН,
ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии

Антипова Надежда Викторовна

кандидат биологических наук,
ФГБУН Государственный научный центр Институт
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН,
старший научный сотрудник лаборатории мембранных и
биоэнергетических систем

Защита диссертации состоится «25» ноября 2025 г. в 15 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.014.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, НИИ ФХБ им А.Н. Белозерского, аудитория 501.

E-mail: agapkina@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3602>

Автореферат разослан «___» 2025 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Ю.Ю. Агапкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Глиомы — это опухоли головного мозга с крайне неблагоприятным прогнозом. Около трети из них составляют глиобластомы (ГБ) - самый агрессивный класс глиом.

Современные терапевтические методы: хирургия, радио- и химиотерапия, по-прежнему малоэффективны и обеспечивают среднюю продолжительность жизни пациентов около года. Эффективность противоопухолевой терапии сдерживается рядом факторов, в числе которых популяционная гетерогенность опухоли, в том числе существование опухолевых стволовых клеток (ОСК).

Клетки основной массы опухоли удаляют хирургическим путем. Действие радио- и химиотерапии направлено на активные быстро делящиеся клетки; при этом страдают и здоровые клетки. Группа ОСК резистентна к воздействиям, поскольку эти «спящие» клетки обладают замедленным метаболизмом и редко делятся; их наличие определяет дальнейшие рецидивы.

Перспективным направлением онкотерапии является тераностика - комбинация диагностики и терапии. Целевую группу опухолевых клеток идентифицируют по характерным маркерам с помощью молекулярных узнавающих элементов (МУзЭлей): антител, аптамеров, проч., а затем пролиферацию этих клеток блокируют с помощью тех же (или аналогичных) МУзЭлей, либо их производных.

Рецептор эпидерmalного фактора роста (англ. Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR, ErbB-1) является одной из главных мишней тераностики ГБ, поскольку активный глиомагенез часто сопровождается сверхсинтезом EGFR. Кроме того, для эффективной тераностики ГБ необходимо детектировать ОСК, количество которых гораздо меньше, чем EGFR+ клеток. Канонических маркеров для ОСК пока еще не установлено. На ранних этапах дифференцировки клеток маркером может быть белок CD133/проминин-1, который присутствует и в ГБ. В настоящей работе эти два маркера, EGFR и CD133, были выбраны для изучения возможностей использования аптамеров для тераностики ГБ.

Аптамеры часто называют "химическими антителами". Это небольшие, до 100 нт длиной, олигонуклеотиды, способные специфически взаимодействовать с мишнями. Поскольку химическая природа олигонуклеотидов (аптамеров) и белков (антител) существенно различается, для применения аптамеров в тераностике ГБ очень важно понимать особенности взаимодействия аптамеров с клетками. Этот аспект только

начинают изучать подробно, например, на стандартных линейных клетках. Взаимодействие аптамеров с клетками перевиваемых культур из ГБ пациентов (ПКГБП) не изучалось.

Цели и задачи исследования

Цель настоящей работы - анализ возможностей аптамеров для терапии глиом применительно к двум функционально и структурно различным маркерам: EGFR и CD133. Для этого необходимо оценить: предполагаемую структуру аптамеров и ее возможную минимизацию; аффинность аптамеров как к белку, так и к клеткам с маркером; возможности доставки цитотоксических агентов.

Для достижения заявленных целей были поставлены следующие задачи:

1. Провести анализ вариантов вторичной структуры известных анти-EGFR аптамеров для оценки возможности минимизации длины.
2. Измерить аффинности аптамеров к рекомбинантному внеклеточному домену белка EGFR человека (EGFR').
3. Изучить взаимодействие анти-EGFR и анти-CD133 аптамеров со стандартными линейными клетками EGFR_{max} и EGFR_{min}, а также CD133_{max} и CD133_{min}, соответственно.
4. Изучить взаимодействие анти-EGFR и анти-CD133 аптамеров с клетками ПКГБП.
5. Изучить сборку аптамерной конструкции с комплементарным олигонуклеотидом и с ее помощью оценить возможности анти-EGFR аптамеров для доставки терапевтического агента в клетки ПКГБП.

Объекты исследования

Объектами исследования являются анти-EGFR аптамеры: 2'F-Pyr-PHK-аптамеры ME07, CL4; ДНК-аптамеры U2, U2s, Gol1, U31, GR20; и анти-CD133 аптамеры: 2'F-Pyr-PHK-аптамеры A15, B19; ДНК-аптамеры Cs1, Cs5, Ap1M, Ap2; рекомбинантный внеклеточный домен EGFR человека (EGFR'); стандартные линии клеток EGFR_{max}: A431, U87 и EGFR_{min} MCF7; а также CD133_{max}: Caco-2, HCT116, и CD133_{min}: DF1; клетки ПКГБП 107, G01, Sus/fP2 из Биобанка НМИЦ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко.

Предмет исследования

Предметом исследования являются процессы/эффекты/особенности взаимодействия анти-EGFR и анти-CD133 аптамеров с клетками ПКГБП 107, G01, Sus/fP2, в сравнении со стандартными линиями клеток EGFR_{max}: A431, U87 и EGFR_{min}: MCF7; а также CD133_{max}: Caco-2, HCT116 и CD133_{min}: DF1. Для анти-EGFR аптамеров предметом исследования была возможная структура аптамеров и аффинность к EGFR'.

Научная новизна исследования

Впервые комплексно исследованы семейства аптамеров к двум важным маркерам клеток глиомы: EGFR и CD133. Такие исследования не проводили даже для отдельных семейств аптамеров к отдельным маркерам, не говоря об исследовании свойств аптамеров для разных маркеров. Впервые сравнили 2'F-Pyr-RHK- и ДНК-аптамеры, обнаружили различия в их свойствах, которые можно объяснить большей гидрофобностью сахарофосфатной цепи 2'F-Pyr-RHK.

Впервые показано, что укороченные анти-EGFR ДНК-аптамеры U2s (49 нт), GR20 (46 нт) и предложенный Головиным А.В. Gol1 (49 нт) демонстрируют аффинность как к EGFR' в растворе, так и к EGFR+ клеткам. Оказалось, что концентрация полунасыщения аптамера для EGFR+ клеток на порядок превосходит K_D комплекса аптамера с белком в растворе.

Впервые изучено взаимодействие аптамеров с клетками ПКГБП. Впервые обнаружено два типа взаимодействия анти-EGFR и анти-CD133 2'F-Руg-РНК- и ДНК-аптамеров с клетками ПКГБП 107, G01 и Sus/fP2: рецептор-опосредованное и мембранные. Сигнал клеток с аптамером в методе проточной цитофлуориметрии (ПЦФ), среднее значение интенсивности флуоресценции (СЗИФ), определяется свойствами самих клеток, на которые влияет уровень транскрипции гена-маркера.

Впервые на качественном и количественном уровне охарактеризована сборка аптамерной конструкции с комплементарным олигонуклеотидом GR20hh'. Впервые показана доставка противоопухолевого препарата доксорубицина (ДОКСО) в составе GR20hh' в клетки ПКГБП.

Научная и практическая значимость исследования

Научная значимость работы заключается в разработке подходов и критериев для стандартного описания свойств аптамеров на основании сравнительного исследования различных аптамеров к различным мишениям. В отсутствии таких работ Международное общество по аптамерам (INSOAP) видит основное препятствие для развития всей области изучения аптамеров. Обычно изучение аптамеров отдельными группами исследователей ограничивается узконаправленными утилитарными подходами для конкретной мишени. Систематическое использование семейств аптамеров, включая сгенерированные искусственно, позволяет оценить качество результатов для конкретного метода. Изучение двух и более различных мишеней в данном контексте помогает использовать наиболее продуктивный подход для выбора аптамера.

Практическая значимость исследования определяется тем, что оба молекулярных маркера, EGFR и CD133, являются значимыми для прогрессии ГБ. Уникальная возможность использования клеток ПКГБП из Биобанка НМИЦ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко позволяет разрабатывать подходы для развития аптараностики глиом и трансляции аптамеров в биомедицинские исследования.

Методология диссертационного исследования

Технология выполнения работ и решения поставленных задач включает в себя следующие средства, методы, способы и приемы, соответствующие мировым стандартам проведения подобного рода исследований.

Моделирование вторичных структур аптамеров проводилось с помощью алгоритмов работы с последовательностями нуклеиновых кислот: ViennaRNA¹ и RNAstructure². Структура аптамеров исследована с помощью ¹Н ЯМР спектрометров «Bruker AVANCE III HD 300» (300,1 МГц) и Bruker AVANCE 600 (Bruker, США). Аффинность аптамеров к белку и константы скоростей комплексообразования и диссоциации были определены методом интерферометрии биослоев (ИБС) на приборе Octet R2 (Forte-Bio, США).

Взаимодействие аптамеров с клетками линий человека: A431 (эпидермальная аденокарцинома), U87 (gliобластома), MCF7 (рак груди), Caco-2 (аденокарцинома толстой кишки), HCT116 (карцинома толстой кишки) и клеток ПКГБП Sus/fP2, G01,

¹ ViennaRNA Web Services. URL: <http://rna.tbi.univie.ac.at/> (дата обращения 29.08.2025).

² University of Rochester Medical Center. URL: <https://rna.urmc.rochester.edu/> (дата обращения 29.08.2025).

107 анализировали методом проточной цитофлуориметрии на приборах CytoFlex (Beckman Coulter, Канада) и Accuri C6 (BD Biosciences, Австрия). Апта- и иммуноанализ проводили с помощью Cy5- и FAM-меченых аптамеров, а также коммерческих антител к EGFR (H11, Merck Millipore, США) в сэндвич-варианте с флуоресцентно-меченными вторичными антителами (Cy2-меченные антитела козы к IgG мыши, Jackson Immunoresearch, Великобритания) и антител к CD133 (APC-меченные антитела, клон W6B3C1, Elabscience Biotechnology Inc., США).

Относительное количество мРНК EGFR и CD133 определяли методом количественной ПЦР на приборе LightCycler 96 (Roche, Франция). Выживаемость клеток исследовали с использованием флуоресцентного ридера (Tecan, Швейцария). Эксклюзационную высокоэффективную жидкостную хроматографию выполняли с использованием хроматографической колонки «TSKgel G2000SWXL» (Tosoh Bioscience Inc., Япония) на ВЭЖХ-системе «Agilent 1200» (Agilent Technologies Inc., США). Спектрофотометрические исследования проводили с использованием «BioPhotometer plus» (Eppendorf Co., Германия) и УФ-спектрофотометра Hitachi U-2900 (Hitachi, Япония) с термоэлектрическим контроллером SPR-10.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Анти-EGFR 2'F-Pyr-РНК- и ДНК-аптамеры одинаково хорошо взаимодействуют с рекомбинантным внеклеточным доменом EGFR.
2. Анти-EGFR 2'F-Pур-РНК-аптамер ME07 связывается с линейными клетками в соответствии с относительным количеством мРНК EGFR.
3. Взаимодействие анти-EGFR и анти-CD133 2'F-Pyr-РНК- и ДНК-аптамеров с клетками, количество мРНК целевого маркера в которых выше порогового значения, носит целевой характер.
4. Анти-CD133 ДНК-аптамеры способны выявлять гетерогенность клеточной популяции культуры глиобластомы пациента.
5. Возможно создание аптамерной конструкции с комплементарным олигонуклеотидом, пригодной для работы с клетками. Доксорубицин в комплексе с аптамерной конструкцией попадает в клетки ПКГБП.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов настоящего исследования подтверждается воспроизводимостью экспериментальных результатов и статистической обработкой

данных. Все экспериментальные процедуры соответствуют поставленным целям и задачам. Результаты получены на современном научном оборудовании с использованием реактивов, произведенных ведущими мировыми компаниями. Публикации и выступления прошли экспертизу и аprobацию международного уровня.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на конференциях и научных форумах: АРТАMERS-2025, АРТАMERS-2024, Оксфорд, Великобритания; в России: II школа молодых учёных «Современные вызовы молекулярной биологии», 2025 г., Шерегеш, XXXVII Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 2025 г. Москва, V Всероссийская конференция «Физико-химическая биология» 2024 г., Новосибирск; 77-я Международная школа-конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», 2024 г., Нижний Новгород; XXXVI Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 2024 г., Москва; VIII Всероссийская конференция по молекулярной онкологии, 2023 г., Москва; «Развитие биобанкинга биологических образцов человека в России и его роль в современных технологиях», 2023 г., Москва.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 статей, из них 3 - в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия.

Личный вклад автора

Все экспериментальные данные в рамках диссертационного исследования получены лично автором или при его непосредственном участии.

Автором проделана экспериментальная работа, включая моделирование возможных вторичных структур аптамеров, анализ связывания аптамеров с белками, с клетками линий и ПКГБП в работах [1-2]. В обзорной работе [3] по анализу роли маркера CD133 в ГБ, Антипова О.М. обсуждала схемы дифференцировки опухолевых клеток. Для обзорной статьи [4] Антипова О.М. собирала и анализировала данные о различных подходах к селекции и химической модификации аптамеров. В работе [5]

выполнен дизайн, качественный и количественный анализ эффективности сборки аптамерной конструкции, определена ее аффинность к белку.

Структура и объём работы

Диссертационная работа изложена на 182 страницах и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Заключение», «Список литературы», «Приложения». Диссертация содержит 48 рисунков и 9 таблиц. Список литературы включает 183 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В настоящей работе изучались аптамеры к двум типам молекулярных клеточных маркёров: рецептору эпидермального фактора роста EGFR, который относится к тирозин-киназам, и CD133, который относится к маркёрам ранней дифференцировки.

EGFR — это трансмембранный тирозин-киназа; связывание природного лиганда EGF активирует каскад передачи сигнала, что приводит к росту и пролиферации клеток. Клетки некоторых ГБ характеризуются сверхсинтезом EGFR, поэтому необходимо создавать молекулярные элементы, узнающие EGFR, например, с помощью анти-EGFR аптамеров.

Маркёр CD133 — трансмембранный белок, имеющий два неструктурированных внеклеточных домена. Точная функция этого белка в клетке в настоящее время не установлена, он экспрессируется на ранних этапах дифференцировки. Гетерогенная опухоль содержит небольшую долю опухолевых стволовых клеток (ОСК), и именно они могут инициировать рецидивы. Иммунодетекция CD133-положительных клеток затруднена из-за различий в гликозилировании белка CD133. Возможно, что аптамеры будут более эффективны, поскольку их размеры на порядок меньше. Исследования взаимодействия анти-CD133 аптамеров с белковой мишенью осложняются невозможностью получения рекомбинантного внеклеточного домена, поэтому функцию анти-CD133 аптамеров можно изучать только на клеточном уровне.

Разработка аптамеров для терапии глиом требует выполнения ряда этапов. Во-первых, какова структура аптамеров? Установление полной трехмерной структуры аптамера — это сложное и трудоёмкое исследование. На начальных этапах можно обойтись построением моделей предполагаемых вторичных структур.

Следующий этап – определение аффинности аптомеров к рекомбинантному белку. Более сложным представляется изучение взаимодействия аптомера с белком в составе клетки. При этом аффинность аптомеров к белку в растворе и в составе клетки может различаться. И, наконец, изучение возможности доставки цитотоксического агента в целевые клетки с помощью аптомеров.

I. Анти-EGFR аптомеры

Предполагаемые вторичные структуры анти-EGFR аптомеров

Из множества известных анти-EGFR аптомеров на основании анализа литературы и предварительных экспериментальных данных по связыванию EGFR' были выбраны несколько: 2'F-Pyr-PHK-аптомеры: ME07 (48 нт) и CL4 (39 нт); и ДНК-аптомеры: серия U31 (76 нт), GR20 (46 нт) и серия U2 (76 нт), U2s (49 нт), Gol1 (49 нт) (рис. 1).

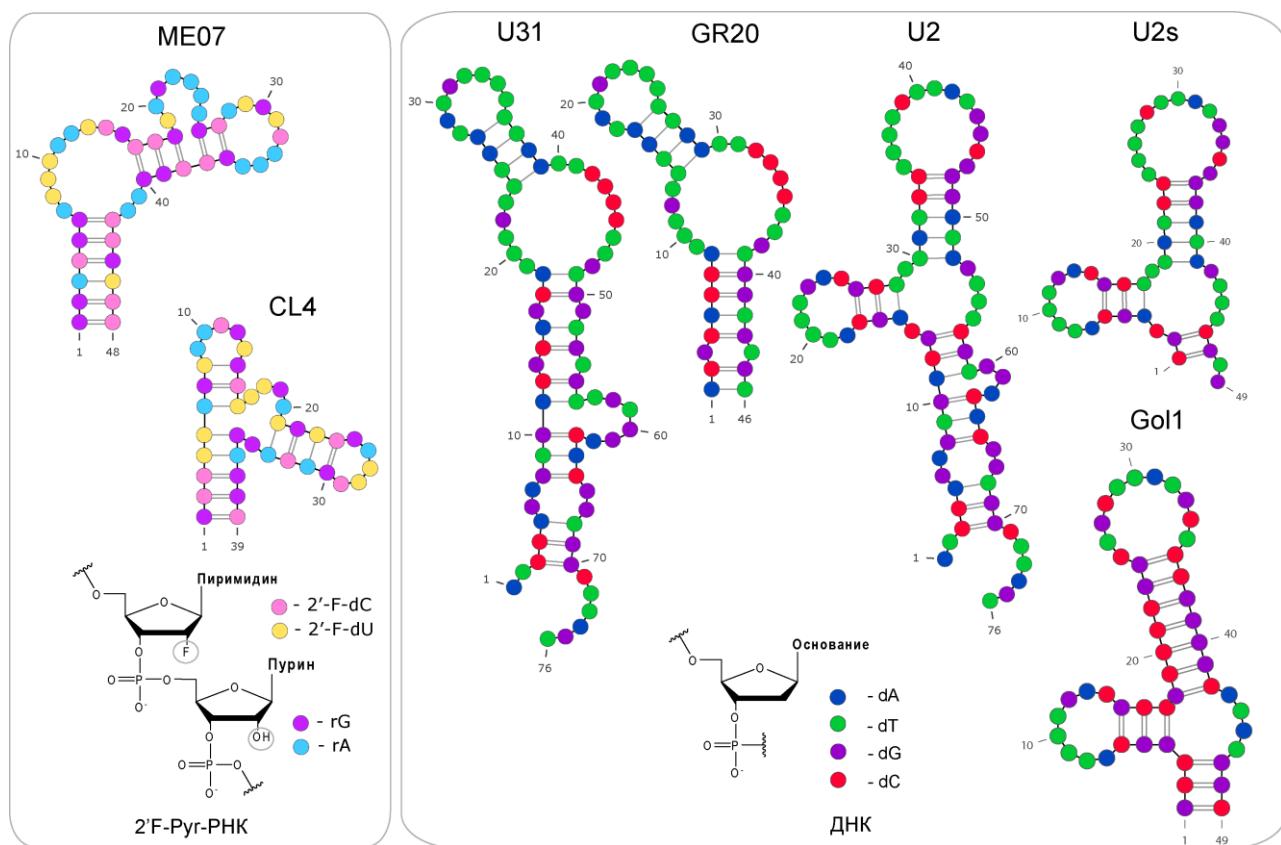


Рисунок 1 - Предполагаемые вторичные структуры 2'F-Pyr-PHK- и ДНК-аптомеров, полученные с помощью алгоритмов ViennaRNA и RNAStructure

Теоретический анализ возможных вторичных структур аптомеров, проведенный с помощью алгоритмов ViennaRNA и RNAStructure, позволил предположить следующие вторичные структуры аптомеров (рис. 1). Возможные вторичные структуры 2'F-Pyr-PHK-аптомеров ME07 и CL4 предложены впервые и согласуются с опубликованными данными экспериментов по пробингу аптомеров и поиску

узнающих мотивов. ДНК-аптамеры U31 и U2 укорачивали до GR20 (46 нт) и U2s (49 нт), соответственно, пытаясь сохранить элементы вторичной структуры. Аптамер Goll получен компьютерным дизайном: комплементарные А-Т-пары аптамера U2s заменены на Г-С аптамера Goll для максимальной стабилизации.

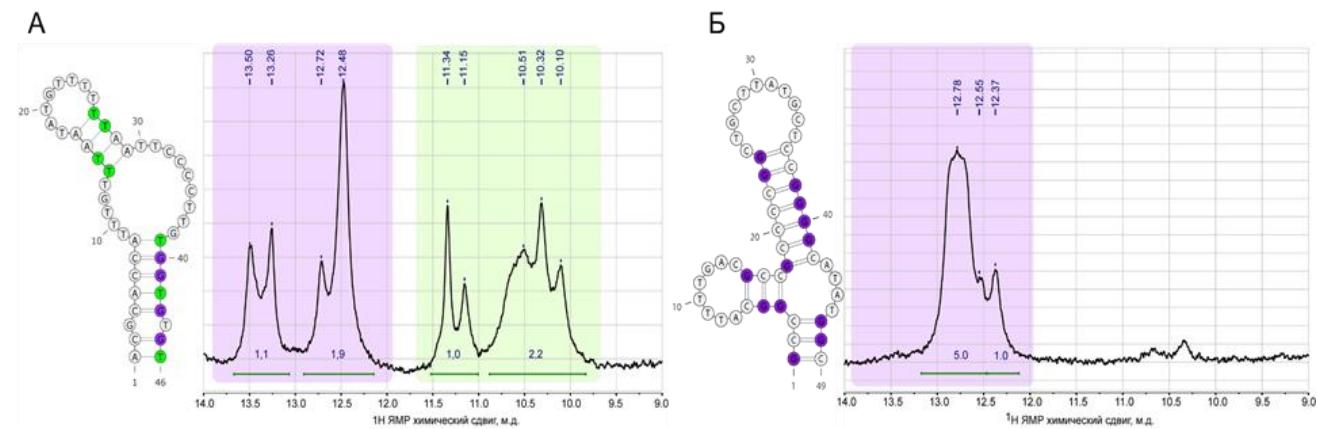
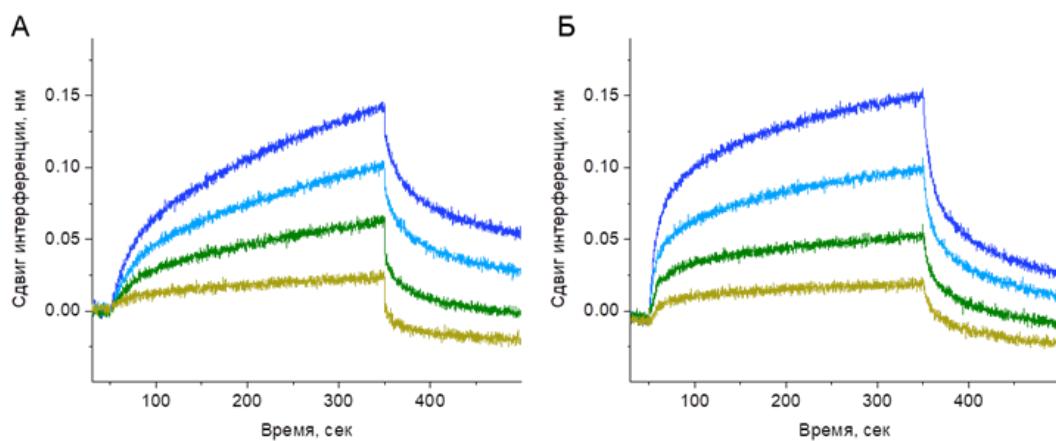


Рисунок 2 - ^1H ЯМР-спектры анти-EGFR ДНК-аптамеров при 4°C , области сигналов имино-протонов: А) GR20, Б) Goll. Исследование выполнено совместно с Р.А. Новиковым (ИМБ РАН)

Был выполнен анализ ^1H ЯМР коротких ДНК-аптамеров GR20 и Goll. Спектры содержат сигналы имино-протонов комплементарных пар А-Т и Г-С, что указывает на наличие вторичной структуры (рис.2).

Связывание анти-EGFR аптамеров с рекомбинантным внеклеточным доменом EGFR человека (EGFR')

В случае маркера EGFR внеклеточный домен структурирован, может быть клонирован и получен в виде белка. Аффинность аптамеров к EGFR' определена методом интерферометрии биослоев (ИБС). Метод использует оптический сенсор, сигнал представляет разность фаз волн белого света, отраженного от поверхности сенсора с иммобилизованным аптамером или от поверхности комплекса аптамера с мишенью, которая находится в растворе. Анализ сигнала позволяет получить кинетические характеристики взаимодействия аптамер - EGFR' в реальном времени (рис. 3, табл. 1).



**Рисунок 3 - Результаты ИБС для взаимодействия иммобилизованных ДНК-аптамеров А) GR20; Б) Gol1 с EGFR' в концентрациях от 6,5 нМ до 52 нМ, ступенчатое двукратное увеличение концентрации EGFR'
(от желтой до синей линии)**

Кинетика связывания анти-EGFR 2'F-Pyr-PHK-аптамеров ME07 и CL4 с EGFR' различается (табл. 1, фиолетовые строки). Константы скорости ассоциации k_{on} 2'F-Pyr-PHK-аптамеров ME07 и CL4 оказались максимальными (табл. 1), что определяет высокую аффинность 2'F-Pyr-PHK-аптамеров к EGFR'.

Таблица 1 - Кинетические константы скорости ассоциации и диссоциации и равновесные константы диссоциации комплексов аптомеров с EGFR'

Шифр	Химическая природа	Длина, нм	Кинетическая константа скорости диссоциации $k_{off} (*10^4) c^{-1}$	Кинетическая константа скорости ассоциации $k_{on}, (*10^5) (M \cdot c)^{-1}$	Равновесная кажущаяся константа диссоциации $K_D = k_{off}/k_{on}, нM$
ME07	2'F-Pyr-PHK	46	64 ± 2	$2,5 \pm 0,8$	26 ± 7
CL4	2'F-Pyr-PHK	39	190 ± 30	$5,1 \pm 0,7$	37 ± 6
U31	ДНК	76	18 ± 2	$0,7 \pm 0,2$	24 ± 6
GR20	ДНК	46	13 ± 3	$0,5 \pm 0,1$	26 ± 5
U2	ДНК	76	20 ± 1	$1,1 \pm 0,2$	18 ± 3
U2s	ДНК	49	23 ± 2	$0,9 \pm 0,1$	25 ± 2
Gol1	ДНК	49	22 ± 2	$1,3 \pm 0,3$	17 ± 3

Для сравнения в настоящей работе использованы антитела, узнающие EGFR: клоны C225 и C4. Константы скорости ассоциации k_{on} для антител C225 и C4 были самыми высокими и составляли $57 \cdot 10^5$ и $69 \cdot 10^5$ ($M \cdot c$) $^{-1}$, соответственно, при этом различия равновесных констант K_D антител и аптомеров определяет более высокая k_{on} антител. Константы скорости диссоциации k_{off} антител C225 и C4 были сравнимы с k_{off} ДНК-аптомеров и составляли $99 \cdot 10^{-4}$ и $20 \cdot 10^{-4}$ c^{-1} соответственно. Равновесная K_D

антител С4 составила 2,9 нМ, что на порядок меньше, чем для аптамеров; антитела С225 демонстрировали сопоставимую с аптамерами аффинность, $K_D = 17$ нМ.

ДНК-аптамеры U31 и U2 были отобраны в одной селекции³, поэтому неудивительно, что их аффинность близка, $K_D = 24$ и 18 нМ, соответственно.

Равновесные K_D для комплексов ДНК-аптамеров U31 и короткого GR20 длиной 46 нуклеотидов с EGFR' практически совпадали между собой, что согласуется с результатами, опубликованными нами ранее⁴.

Равновесные K_D для комплексов всех трёх аптамеров серии U2, U2s и Goll с EGFR' оказались в том же наномолярном диапазоне. Аффинность короткого U2s немного снижается по сравнению с родительским аптамером U2 (табл. 1, желтые строки). Равновесная K_D для искусственного аптамера Goll практически совпадает с K_D исходного длинного ДНК-аптамера U2 (табл. 1, желтые строки).

Укороченные ДНК-аптамеры оказались хорошими узнающими элементами. Константы скорости диссоциации k_{off} коротких ДНК-аптамеров GR20 и Goll были минимальными. Короткий ДНК-аптамер GR20 медленно связывается с EGFR' и медленно диссоциирует. Стабилизированный GC-парами искусственный короткий ДНК-аптамер Goll имеет равновесную K_D ниже, чем для GR20, константа скорости ассоциации у Goll выше, но выше и константа скорости диссоциации (табл. 1).

Аффинность коротких ДНК-аптамеров GR20 и Goll по сравнению с длинными родительскими U31 и U2 сохраняется. Константы скорости ассоциации и диссоциации коротких ДНК-аптамеров были ниже, чем для 2'F-Рур-РНК-аптамеров ME07 и CL4. Для 2'F-Рур-РНК-аптамеров и ДНК-аптамеров равновесные константы диссоциации были сравнимы, в диапазоне 15-40 нМ. Аффинность аптамеров была сопоставима с антителами С225.

Взаимодействие анти-EGFR 2'F-Рур-РНК- и ДНК-аптамеров с линейными клетками A431, U87, MCF7

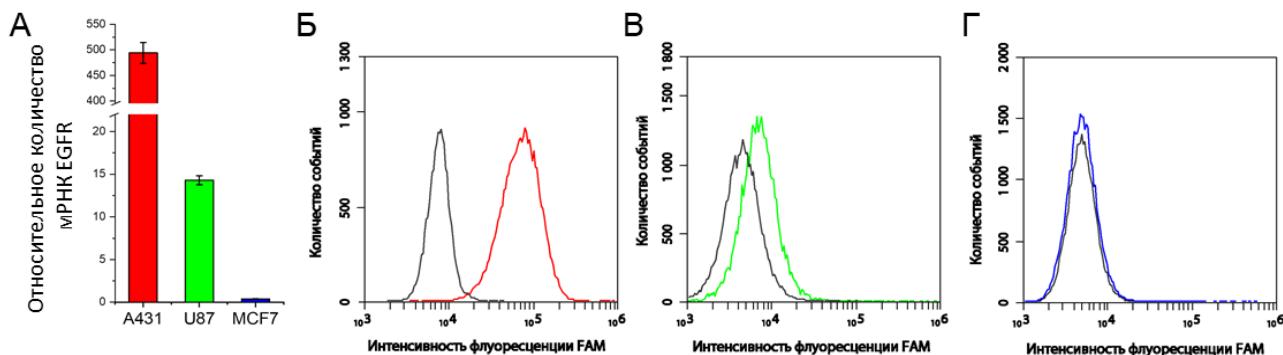
Взаимодействие флуоресцентных аптамеров с клетками исследовали методом проточной цитофлуориметрии (ПЦФ) при стандартной концентрации 1 μM .

³ Wu X., Liang H., Tan Y., Yuan C., Li S., Li X., Li G., Shi Y., Zhang X. «Cell-SELEX aptamer for highly specific radionuclide molecular imaging of glioblastoma *in vivo*» // PLoS One. - 2014. - T.9. - №.6. - C.e90752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090752>

⁴ Zavyalova E., Turashev A., Novoseltseva A., Legatova V., Antipova O., Savchenko E., Balk S., Golovin A., Pavlova G., Kopylov A. «Pyrene-Modified DNA Aptamers with High Affinity to Wild-Type EGFR and EGFRvIII» // Nucleic Acid Ther. – 2020. – T.3. – C.175-187. <https://doi.org/doi: 10.1089/nat.2019.0830>

Использованы два типа флуоресцентных меток: зеленая, карбоксифлуоресцеин, FAM (λ возбуждения = 493 нм, λ эмиссии 517 нм), и дальняя красная, цианин-5, Cy5 (λ возбуждения = 651 нм, λ эмиссии 670 нм).

Для полуколичественной оценки взаимодействия аптамеров с EGFR_{max} и EGFR_{min} клетками использовали 2'F-Pyr-RHK-аптамер FAM-ME07. Для аптамера ME07 средние значения интенсивностей флуоресценции (СЗИФ) для стандартных линейных клеток коррелировали с относительным количеством мРНК EGFR (рис. 4). Представленность EGFR на поверхности клеток не обязательно должна коррелировать с относительным количеством мРНК; тем не менее, для экстремальных значений можно допустить, что малое относительное количество мРНК указывает на малое количество белка, а очень высокое значение может указывать на возможность сверхсинтеза EGFR.

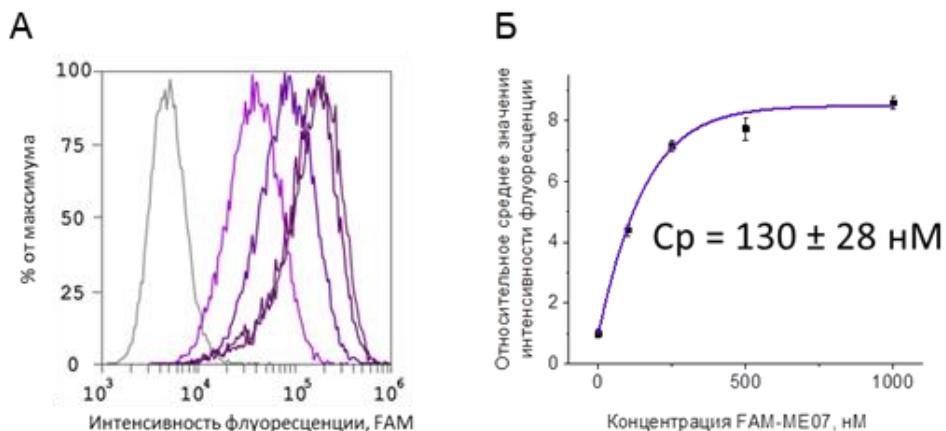


*Рисунок 4 - А) Относительное количество мРНК EGFR;
Б-Г) ПЦФ 1 μ M анти-EGFR 2'F-Pyr-RHK-аптамера FAM-ME07 инкубированного с
клетками линий Б) A-431, В) U87, Г) MCF-7,
автофлуоресценция клеток показана серым*

Клетки эпидермальной аденоциркозомы А-431 имеют максимально высокое относительное количество мРНК EGFR, что в 40 раз превосходит значение в стандартных клетках линии ГБ U87. Клетки аденоциркозомы молочной железы линии MCF-7 имеют крайне низкое относительное количество мРНК EGFR и использовались как отрицательный контроль.

Стандартные клетки экспрессируют на поверхности различное количество EGFR: клетки А-431 - до 3×10^6 молекул на клетку, клетки U87 - в сотни раз меньше (2×10^4), клетки MCF-7 - еще на порядок меньше (2×10^3 молекул на клетку) [2]. Значение СЗИФ для 2'F-Pyr-RHK-аптамера FAM-ME07 уменьшалось при уменьшении представленности EGFR в ряду А-431, U87, MCF-7. СЗИФ для клеток MCF-7 практически совпадало с автофлуоресценцией клеток, что может указывать на

нижний предел обнаружения EGFR_{\min} клеток с помощью аптамера ME07, меченного флуоресцеином (рис. 4).



Титрование клеток A431 с помощью анти-EGFR 2'F-Pyr-PHK-аптамера FAM-ME07 было проведено впервые. Результаты титрования аппроксимируются стандартной кривой связывания (рис. 5), что показывает специфичность взаимодействия аптамера ME07 с EGFR_{\max} клетками: сродство аптамера ME07 к клеткам A431 характеризовалось концентрацией полунасыщения кривой титрования $C_p=130$ нМ, что оказалось в 5 раз больше, чем равновесная константа диссоциации комплекса аптамера ME07 с рекомбинантным EGFR' $K_D=25$ нМ.

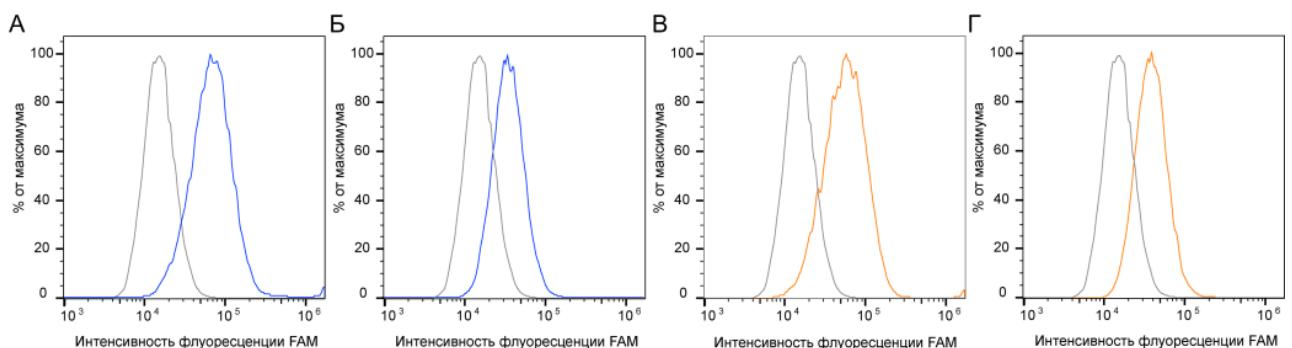


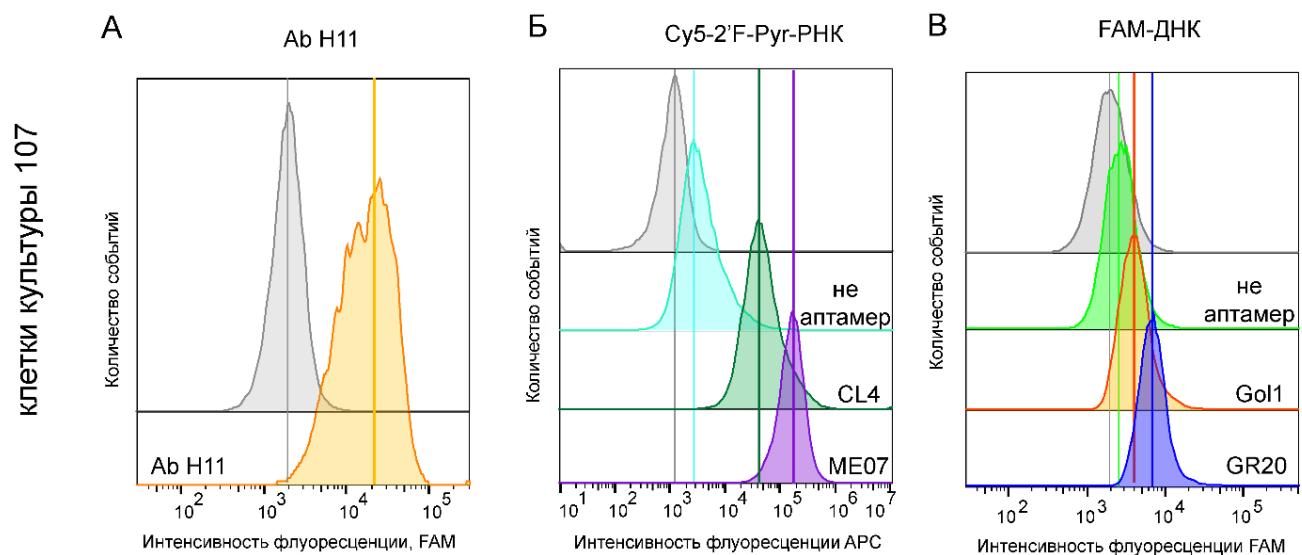
Рисунок 6 - ПЦФ клеток U87 с 1 μM FAM-мечеными ДНК-аптамеров:
А) U31, Б) GR20, В) U2, Г) Goll, автофлуоресценция клеток показана серым

ДНК-аптамеры U31 и U2 взаимодействуют с EGFR+ клетками ГБ линии U87 примерно с равной эффективностью. Короткие ДНК-аптамеры GR20 и Goll показывают несколько меньшие СЗИФ по сравнению с исходными ДНК-аптамерами U31 и U2 (рис. 6).

Из разделов 2 и 3 следует, что анти-EGFR аптамеры, будучи эффективными узнающими элементами, проявляют сродство как к белку EGFR', так и к EGFR_{\max} и EGFR+ клеткам, причем к клеткам аффинность примерно в 5 раз ниже.

Взаимодействие анти-EGFR 2'F-Pyr-RНК- и ДНК аптамеров с клетками перевиваемых культур ГБ пациентов 107, G01 и Sus/fP2

Исследовали три образца клеток ПКГБП из Биобанка МНИЦ им. ак. Н.Н. Бурденко с различным относительным количеством мРНК EGFR: в соотношении 10 : 1 : 0,1 для клеток 107, G01 и Sus/Pf2, соответственно. На клетках ПКГБП 107, в которых относительное количество мРНК EGFR приблизительно равно уровню в стандартных линейных клетках ГБ U87, исследовали взаимодействие анти-EGFR антител и аптамеров. Антитела H11 с клетками ПКГБП 107 давали сдвиг сигнала ПЦФ, что коррелировало с уровнем мРНК EGFR (рис.7А).



Взаимодействие Су5-меченых анти-EGFR 2'F-Pyr-RНК-аптамеров ME07 и CL4 с клетками ПКГБП 107 показывало различные СЗИФ с наибольшим значением для аптамера ME07 (рис. 7Б). При взаимодействии клеток ПКГБП 107 с FAM-мечеными ДНК-олигонуклеотидами сдвиги СЗИФ были гораздо меньше, чем для Су5-меченых 2'F-Pyr-RНК-олигонуклеотидов, поскольку сигналы детектировали в другом канале (рис. 7В). Как и для 2'F-Pyr-RНК-аптамеров, с анти-EGFR ДНК-аптамерами GR20 и G01 сдвиги были больше, чем для неаптамерного ДНК-олигонуклеотида. Для аптамера GR20 СЗИФ было больше, чем для G01 (рис. 7В).

В отличие от ПКГБП 107, для двух других ПКГБП G01 и Sus/fP2 относительное количество мРНК EGFR было ниже на порядок и на два порядка, соответственно (рис. 8А). Для клеток ПКГБП G01 сигнал ПЦФ с антителами H11 был ожидаемо слабый, в то время как для клеток Sus/fP2, с мизерным уровнем мРНК EGFR, сигнал ПЦФ с антителами совпадал с автофлуоресценцией клеток (рис. 8Б, Д). Сигналы ПЦФ для антител и уровня мРНК EGFR в клетках ПКГБП коррелировали, что говорит за применение относительного количества мРНК EGFR.

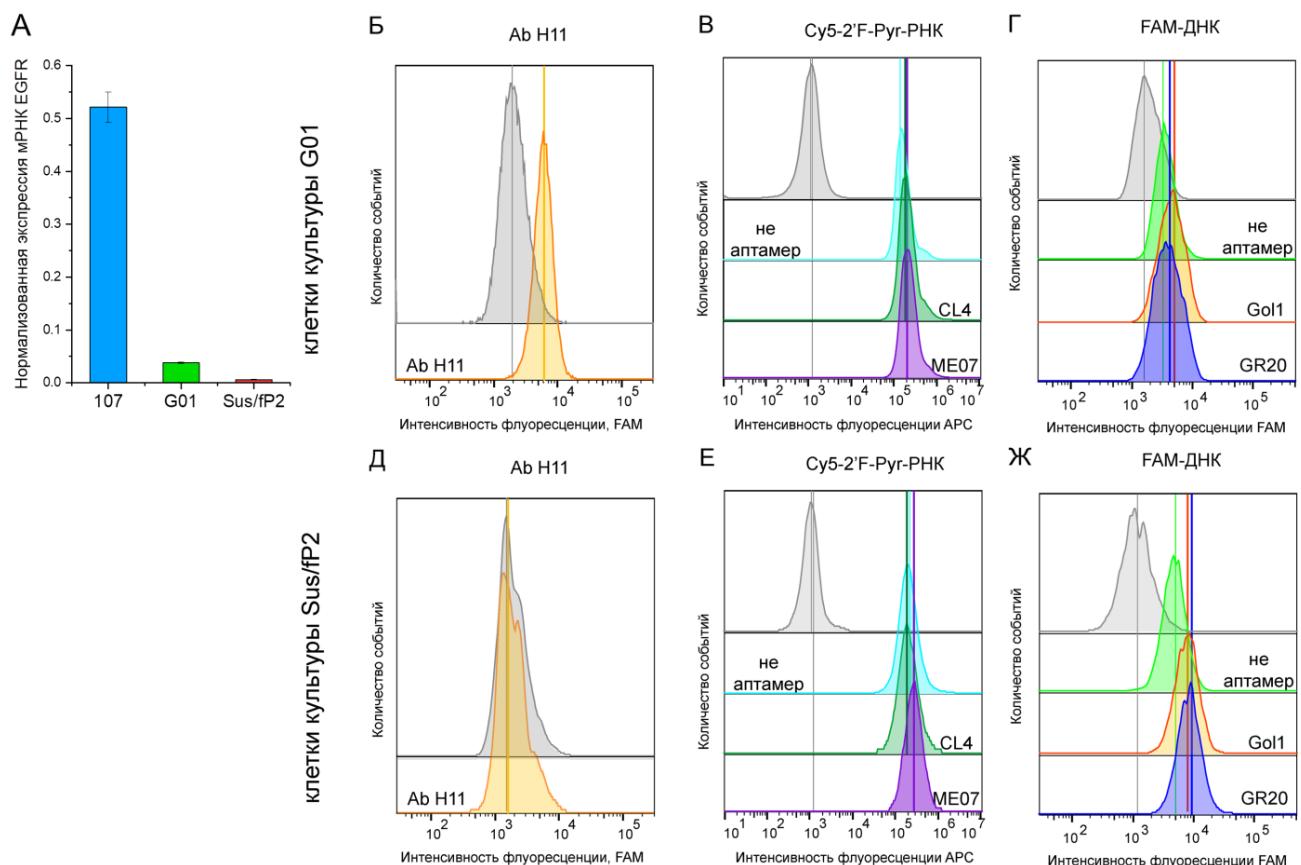


Рисунок 8 - (A) Относительное количество мРНК EGFR для клеток ПКГБП; (Б-Г) ПЦФ с клетками ПКГБП G01 и (Д-Ж) Sus/fP2: (Б, Д) анти-EGFR антител клон H11 в сэндвич-варианте со вторичными Cy-2 меченными антителами; (В, Е) 1 μM Су5-меченого неаптамерного 2'F-Pyr-RHK-олигонуклеотида (голубой) и 1 μM Су5-меченых анти-EGFR 2'F-Pyr-RHK-аптамеров CL4 (зеленый) и ME07 (фиолетовый); (Г, Ж) 1 μM FAM-меченого неаптамерного ДНК-олигонуклеотида (зеленые) и 1 μM анти-EGFR FAM-меченых ДНК-аптамеров Gol1 (оранжевые) и GR20 (синие), автофлуоресценция показана серым

Клетки ПКГБП G01 и Sus/fP2 давали очень высокие значения СЗИФ, вне области значений для специфического связывания, при добавлении Су5-меченого 16 нт неаптамерного 2'F-Pyr-RHK-олигонуклеотида или 18 нт неаптамерного ДНК-олигонуклеотида (рис. 8).

Таким образом, взаимодействие EGFR+ клеток с аптамерами определяется пороговыми значениями относительного количества мРНК EGFR. Только для клеток ПКГБП 107 с высоким относительным количеством мРНК EGFR наблюдалась характерная разница между сдвигами СЗИФ для различных аптамеров, аффинность которых для белка EGFR' отличалась в 1.5 раза.

II. Анти-CD133 аптамеры

Из известных анти-CD133 аптамеров для исследования были выбраны следующие два 2'F-Pyr-RНК-аптамера: A15 (15 нт) и B19 (19 нт), и по два ДНК-аптамера из двух независимых процедур отбора SELEX: серия Ap - Ap1M (48 нт), Ap2 (76 нт), и серия Cs - Cs1 (58 нт), Cs5 (51 нт).

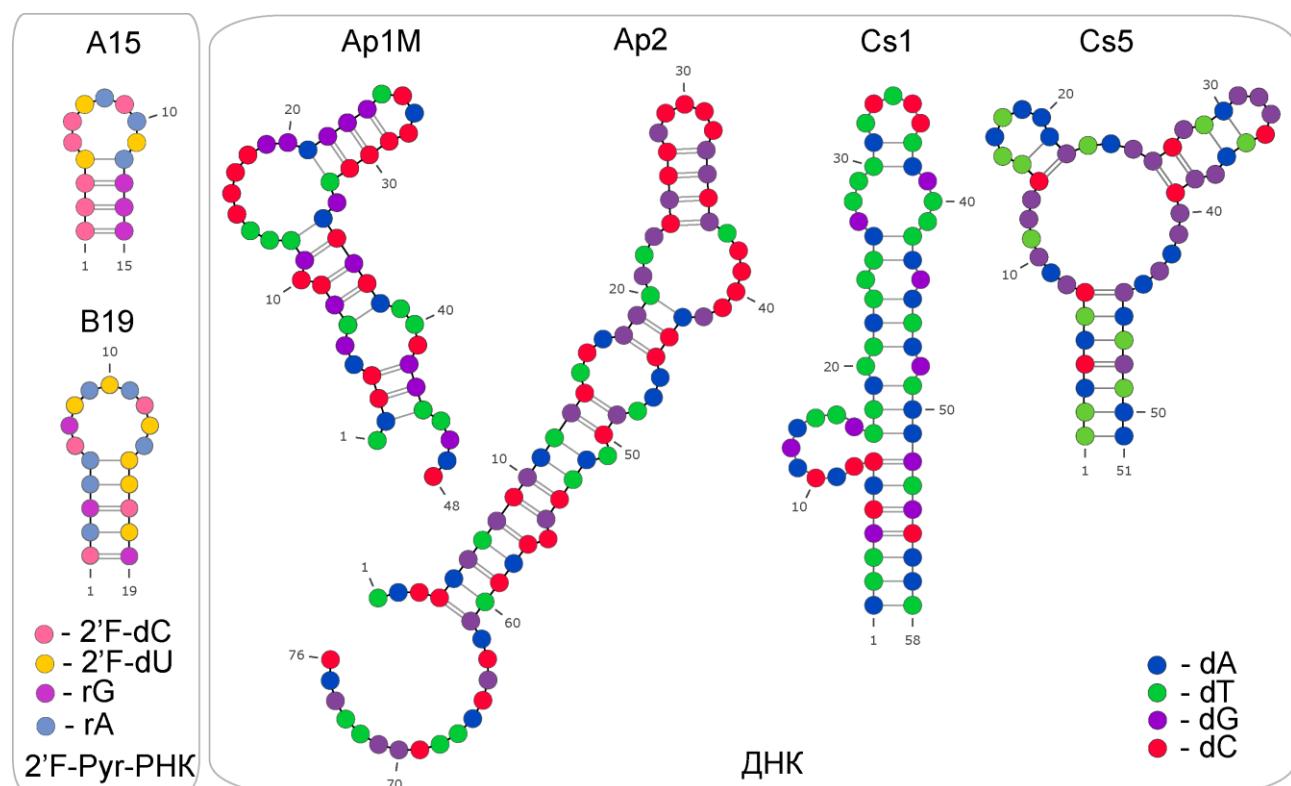


Рисунок 9 - Предполагаемые вторичные структуры анти-CD133 2'F-Pyr-RНК-аптамеров A15 и B19, ДНК-аптамеров Ap1M, Ap2, Cs1 и Cs5, полученные с использованием алгоритма ViennaRNA

Исследуемые анти-CD133 аптамеры имели различную длину (рис. 9), были отобраны к различным трансфицированным клеткам, и охарактеризованы разными методами. Для всех выбранных аптамеров ранее было показано взаимодействие с CD133+ клетками.

Взаимодействие анти-CD133 2'F-Pyr-RНК- и ДНК-аптамеров с клетками CD133+ стандартных линий Caco-2 и HCT116

Для исследования анти-CD133 аптомеров использовали стандартные линии клеток колоректальной аденокарциномы Caco-2 и колоректальной карциномы HCT116 с высокими относительными количествами мРНК CD133 в соотношении 6 : 1, соответственно и CD133_{min} клетки DF1 с мизерным количеством мРНК CD133 (рис. 10А). Для ПЦФ использованы антитела клона W6B3C1, узнающие второй внеклеточный домен белка CD133 (рис. 10Б).

Классический Су5-меченный 2'F-Pyr-RНК-аптамер A15 при взаимодействии со стандартными клетками линии Caco-2 показывает нормальный сдвиг СЗИФ. Несмотря на то, что стандартные клетки линии HCT116 имеют в 6 раз меньшее количество мРНК CD133, сдвиг СЗИФ для них гораздо больше.

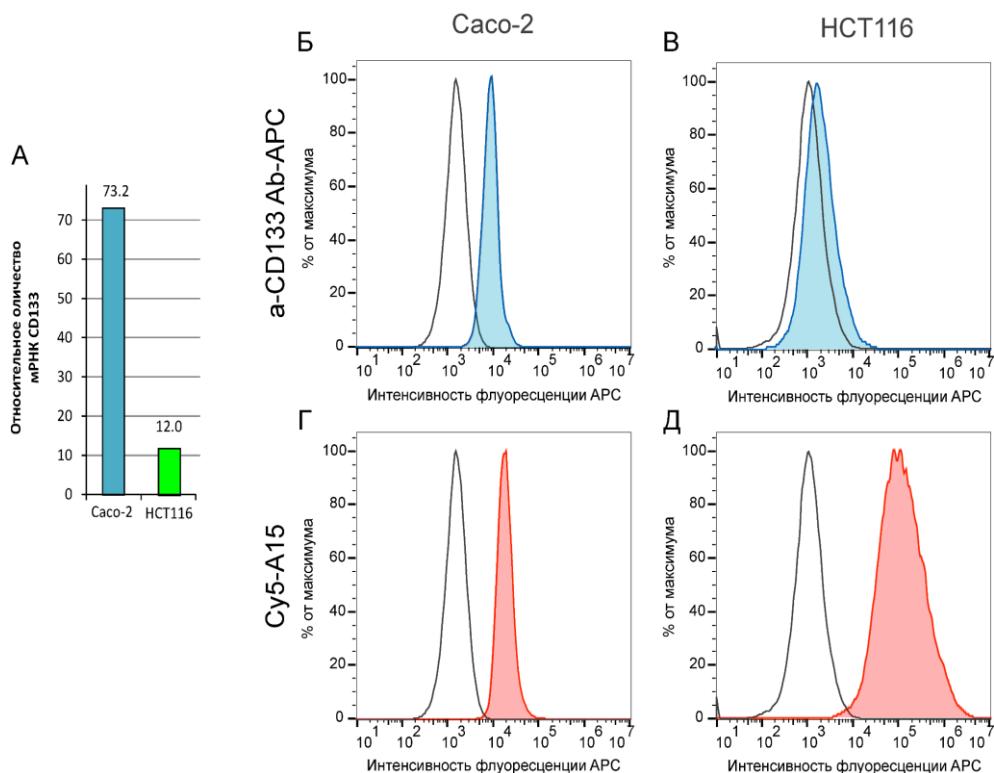
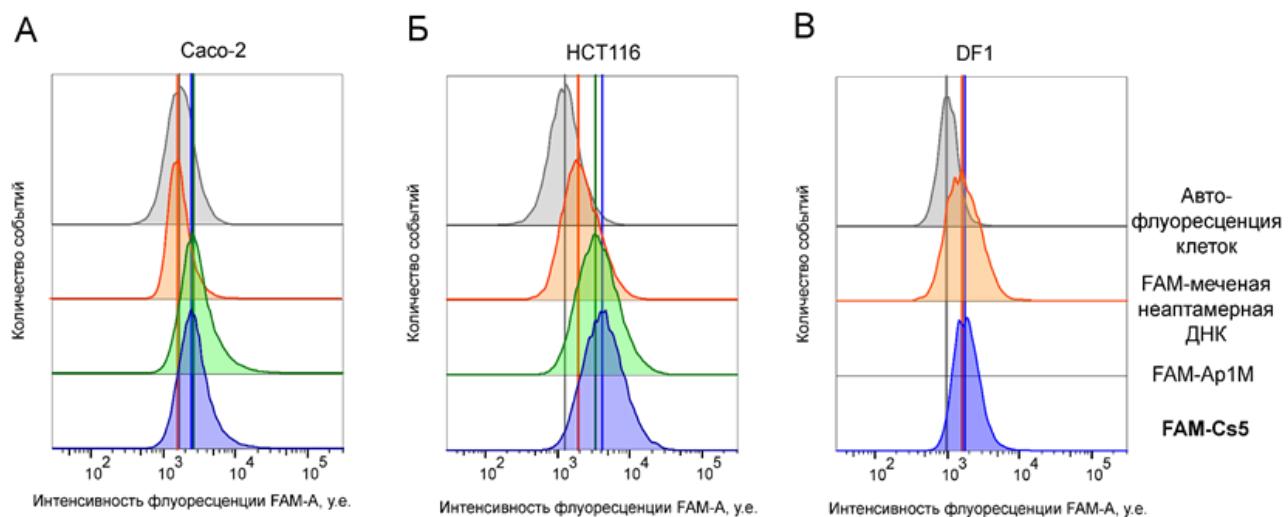


Рисунок 10 - (А) Относительное количество мРНК CD133 в стандартных клетках Caco-2, HCT116 из базы данных Human Protein Atlas; (**Б-Д**) ПЦФ взаимодействия клеток Caco-2 (**Б, Г**) и HCT116 (**В, Д**) с APC-конъюгированными антителами к CD133 (голубой, **Б, В**) и с 1 μ M Су5-меченого 2'F-Pyr-RНК-аптамера A15 (красный, **Г, Д**), автофлуоресценция клеток показана серым



**Рисунок 11 - ПЦФ взаимодействия клеток Caco-2 (A), HCT116 (Б) и DF1 (В) с 1μM FAM-меченных неаптамерного ДНК-олигонуклеотида (оранжевые) и анти-CD133 ДНК-аптамеров Ap1M (зеленые) и Cs5 (синие),
автофлуоресценция клеток показана серым**

Анти-CD133 ДНК-аптамеры Ap1M и Cs5 взаимодействовали с CD133⁺ клетками каждой из линий Caco-2 и HCT116 одинаково (рис. 11). Как для случая Су5-меченного 2'F-Pyr-RНК-аптамера A15, СЗИФ FAM-ДНК-аптамеров было больше для клеток линии HCT116, чем для клеток Caco-2, несмотря на существенно меньшее относительное количество мРНК CD133 (рис. 10 и 11). Для CD133_{min} клеток DF1, СЗИФ анти-CD133 аптамера FAM-Cs5 и FAM-меченной неаптамерной ДНК совпадал (рис. 11В). Это подтверждает концепцию о том, что для аптамеров существуют пороговые значения мРНК мишени (в том числе CD133), ниже которых появляется только нецелевой сигнал.

Средство анти-CD133 Су5-аптамеров различной химической природы: 2'F-Pyr-RНК-аптамера A15 и ДНК-аптамера Cs5, к клеткам Caco-2 оценили титрованием. Эффективные концентрации полунасыщения (C_p) определены из зависимости СЗИФ от концентрации аптамера. Кривые аппроксимируются моделью Больцмана для одноцентрового связывания (рис. 12).

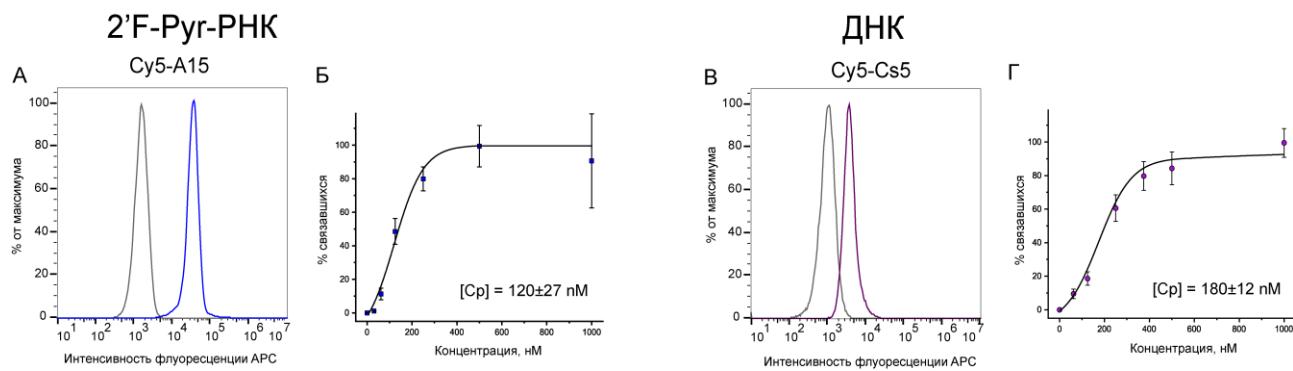


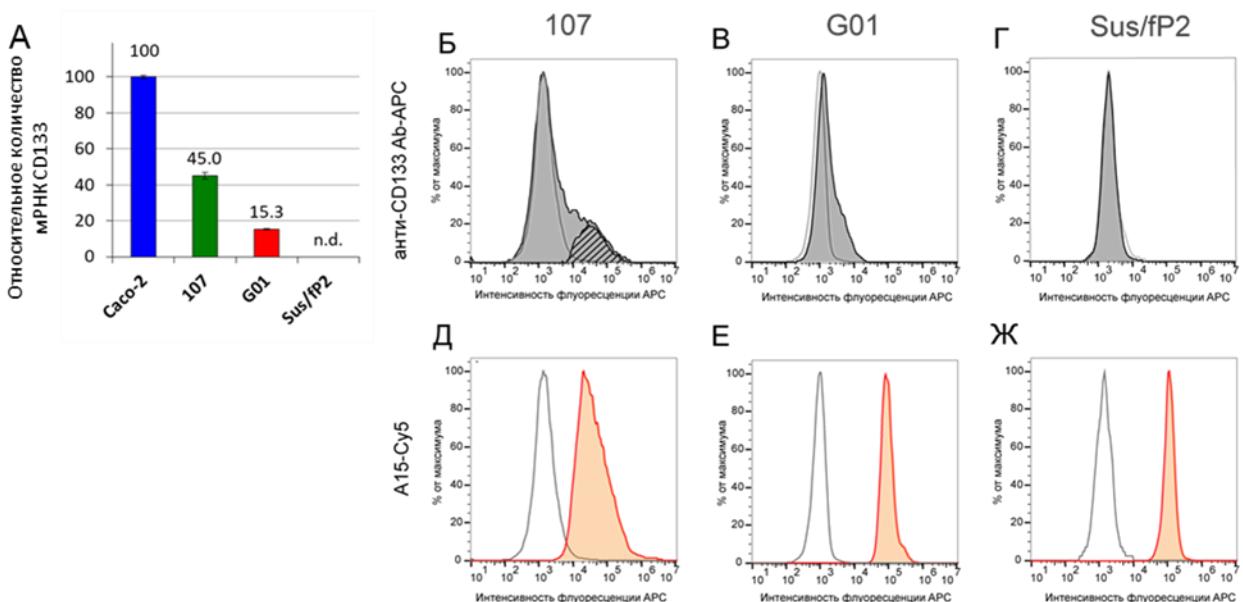
Рисунок 12 - ПЦФ Су5-меченых анти-CD133 2'F-Pyr-PHK-аптамера A15(А, Б), ДНК-аптамера Cs5 (В, Г) при взаимодействии с клетками линии Caco-2; (Б, Г) -результаты титрования

Аффинность анти-CD133 аптамеров к клеткам Caco-2, выраженная как концентрация полунасыщения, для 2'F-Pyr-PHK-аптамера A15 Cp = 120±27 нМ и для ДНК-аптамера Cs5 Cp = 180±12 нМ. Су5-2'F-Pyr-PHK-аптамер A15 показывает намного больший СЗИФ (30 000 у.е.), чем Су5-ДНК-аптамер Cs5 (5 000 у.е.), что можно объяснить большей гидрофобностью 2'F-Pyr-PHK-аптамеров по сравнению с ДНК-аптамерами.

Взаимодействие анти-CD133 2'F-Pyr-PHK- и ДНК-аптамеров с клетками ПКГБП 107, G01 и Sus/fP2

Для трех выбранных образцов клеток ПКГБП 107, G01 и Sus/fP2 относительное количество мРНК CD133, нормированное на Caco-2, отличалось – (Caco-2) : 107 : G01 : Sus/fP2 = (100) : 45 : 15 : 0, соответственно.

Антитела и 2'F-Pyr-PHK-аптамер A15 (1 μ M) по-разному взаимодействуют с клетками ПКГБП (рис. 13 Б-Г и Д-Ж). Для клеток ПКГБП 107 ПЦФ с антителами показывает гетерогенность клеточной популяции. Для клеток ПКГБП G01 и Sus/fP2 с малым и нулевым относительным количеством мРНК CD133 большие значения СЗИФ с 2'F-Pyr-PHK-аптамером A15, по-видимому, вызваны замеченными ранее нецелевыми взаимодействиями.



Су5-ДНК-аптамеры и Су5-2'F-Pyr-RНК-аптамер A15 по-разному взаимодействуют с клетками ПКГБП 107. Во-первых, значения СЗИФ для них меньше (ср. рис. 14 и 13Д), и, во-вторых, ДНК-аптамеры выявляют гетерогенность популяции ПКГБП 107 более явно (рис. 14), по-видимому, вносит вклад меньшая гидрофобность ДНК-аптамеров по сравнению с 2'F-Pyr-RНК-аптамерами.

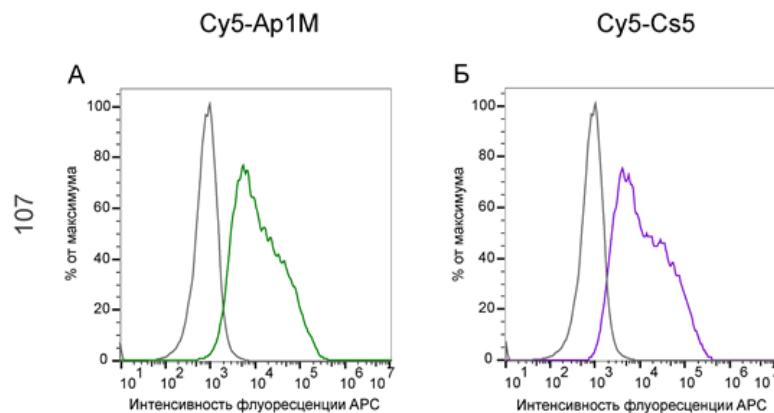


Рисунок 14 - ПЦФ клеток ПКГБП 107 с 1 мкМ Су5-ДНК-аптамеров: Cs5 (А), Ap1M (Б)

Таким образом, при взаимодействии с CD133+ клетками флуоресцентные аптамеры, независимо от их природы (2'F-Pyr-RНК или ДНК), дают положительные сигналы до определенных пороговых значений мРНК CD133, ниже которых клетки дают новый сигнал в другой области СЗИФ.

III. Анти-EGFR АККО GR20hh' для доставки доксорубицина в клетки ПКГБП

Для доставки антитрополиферативного агента ДОКСО в клетки ПКГБП использовали анти-EGFR АККО GR20hh', комплекс удлиненного аптамера GR20h с комплементарным олигонуклеотидом h' (рис. 15).

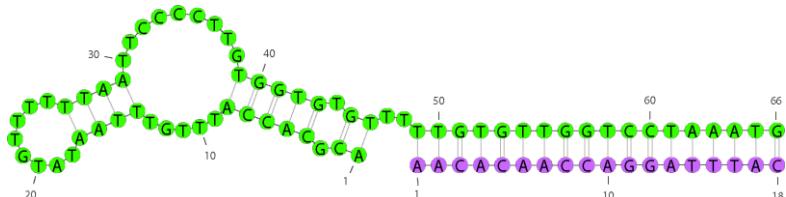


Рисунок 15 – Предполагаемая структура анти-EGFR АККО GR20hh'

Термическая стабильность АККО GR20hh' определялась спектрофотометрическим плавлением при 260 нм. Достаточно высокая $T_{\text{пл}} = 59$ °С позволяет использовать АККО GR20hh' в экспериментах с клетками. Полноту сборки АККО GR20hh' определяли оригинальной эксклюзионной ВЭЖХ (рис. 16): наблюдался единственный пик при более низких временах удерживания относительно удлиненного варианта аптамера GR20h.

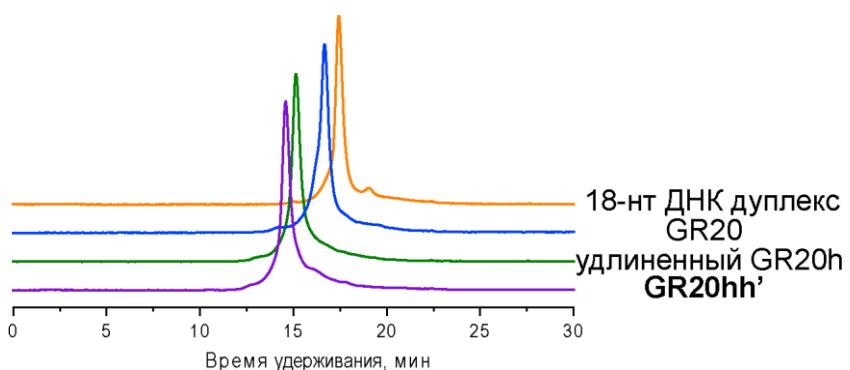


Рисунок 16 - Эксклюзионная ВЭЖХ отдельного дуплекса, без аптамерной части (оранжевый), аптамера GR20 (синий), удлиненного аптамера GR20h (зеленый), АККО GR20hh' (фиолетовый)

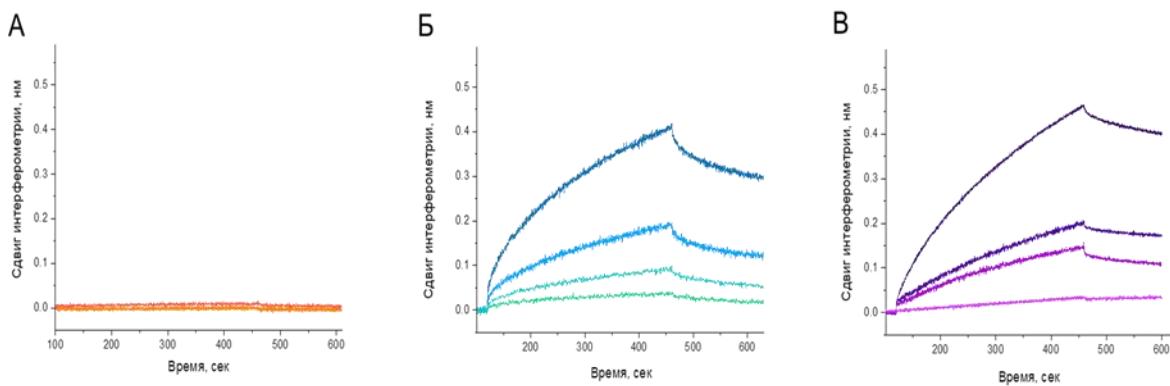


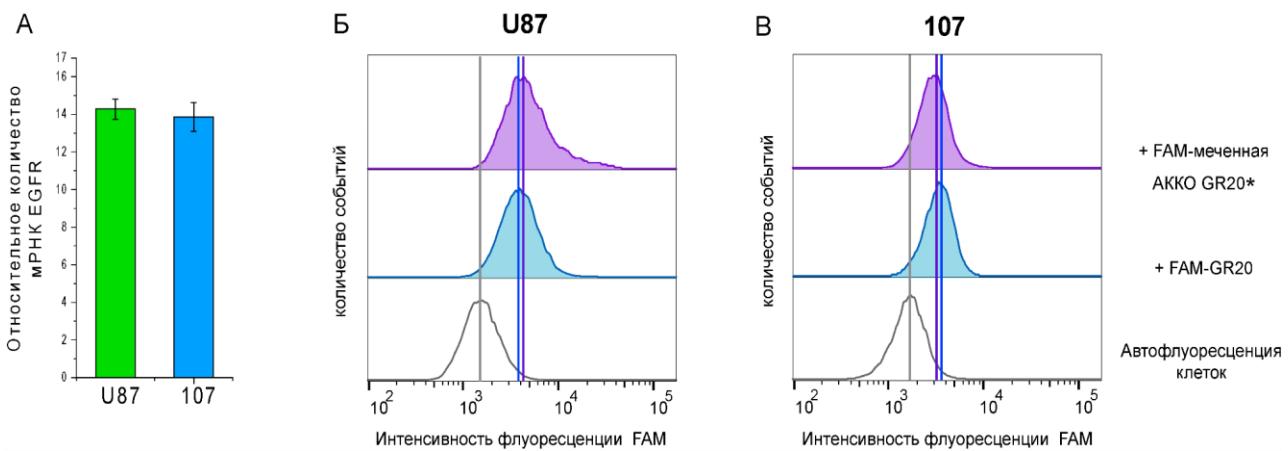
Рисунок 17 – Сенсограммы ИБС взаимодействия А) 18-нм ДНК-дуплекса без аптамерной части, Б) ДНК-аптамера GR20 и В) AKKO GR20hh' с EGFR' в диапазоне концентраций 6,5 - 52 нМ, последовательное двукратное увеличение концентрации EGFR' соответствует увеличению яркости линии (снизу вверх)

Таблица 2 - Константы скорости ассоциации и диссоциации и равновесные константы диссоциации комплексов аптамера GR20 и AKKO GR20hh' с EGFR'

Шифр	Кинетическая константа скорости диссоциации $k_{off} (*10^{-4}) c^{-1}$	Кинетическая константа скорости ассоциации $k_{on}, (*10^5) (M \cdot c)^{-1}$	Равновесная кажущаяся константа диссоциации $K_D = k_{off}/k_{on}, \text{ нМ}$
GR20	6.1 ± 0.2	0.43 ± 0.03	14.2 ± 0.5
AKKO GR20hh'	4.0 ± 0.2	0.37 ± 0.05	10.8 ± 1.4

Для ИБС биотинилированный на 5'-конце комплементарный олигонуклеотид h' иммобилизовали на поверхности стрептавидинового сенсора и гибридизовали с удлиненным аптамером GR20h в течение 10 мин при комнатной температуре в PBS. AKKO GR20hh' сохраняла способность связывать EGFR' и сенсограммы ИБС аптамера GR20 и AKKO GR20hh' оказались сходными (рис. 17). Значения константы скорости диссоциации AKKO GR20hh' с EGFR' снижались в 1.5 раза по сравнению со значениями для аптамера GR20 (табл. 2).

Для EGFR+ клеток линии ГБ U87 и ПКГБП 107 методом проточной цитофлуориметрии показано, что AKKO GR20hh', содержащая флуоресцентную метку FAM на 5'-конце комплементарного олигонуклеотида h', дает сдвиг СЗИФ, аналогичный сдвигу ДНК-аптамера FAM-GR20 (рис. 18), что свидетельствует о стабильности конструкции в клеточной среде и о сохранении взаимодействия аптамера в составе AKKO GR20hh' с EGFR+ клетками ГБ.



Для 1 μ M эквимолярного комплекса ДОКСО полностью интеркалирован в АККО GR20hh', поэтому токсичность обусловлена комплексом АККО GR20hh'+ДОКСО, а не свободным ДОКСО.

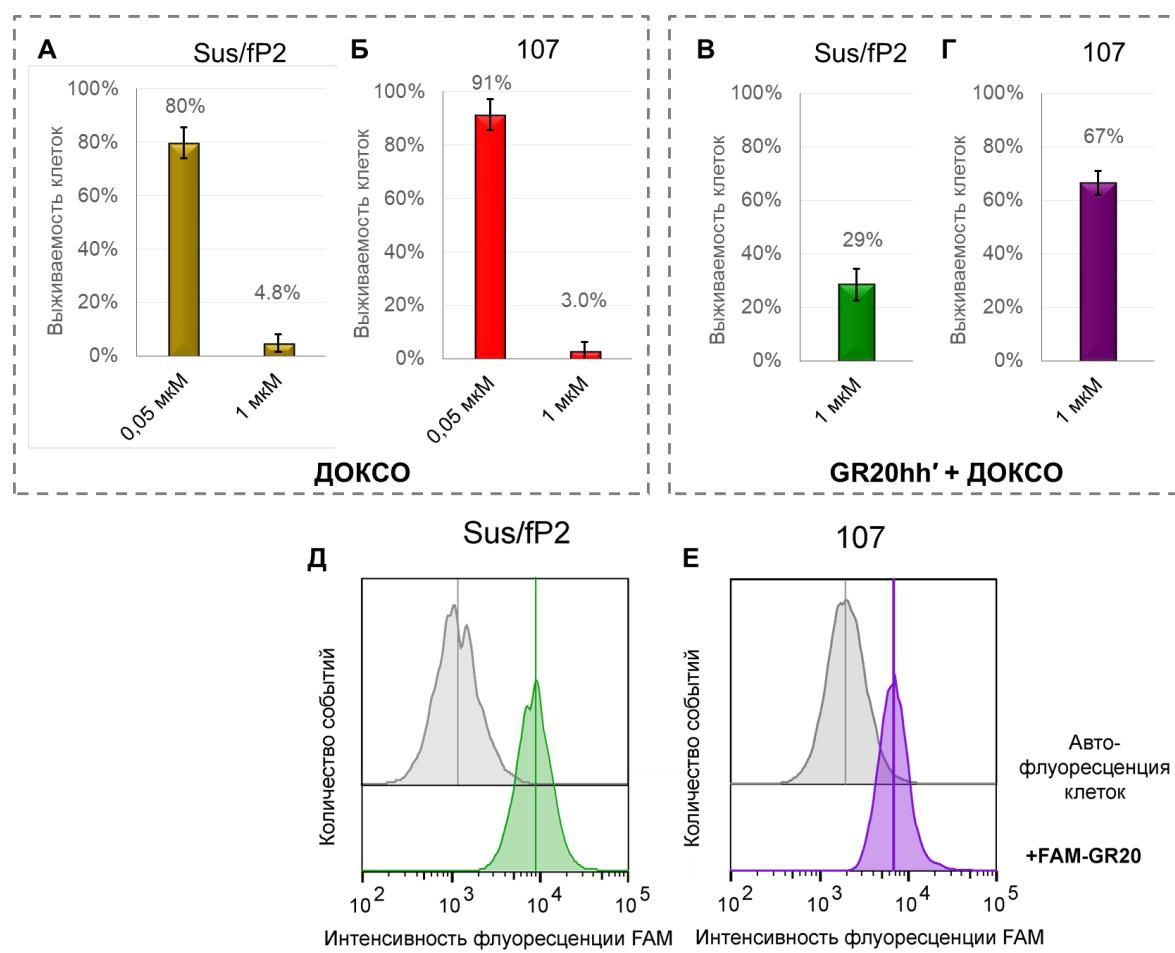


Рисунок 19 - Индекс выживаемости по MTS-тесту после 72 часов для самого ДОКСО в концентрациях 0,05 μ М и 1 μ М (А, Б) и 1 μ М интеркалированного в АККО GR20hh' ДОКСО (В, Г) на клетках ПКГБП: А, В) Sus/fP2 и Б, Г) 107; ПЦФ клеток Sus/fP2 Д) и 107 Е) с FAM-GR20, autofluorescence клеток показана серым

ДОКСО попадает в клетку диффузией через мембрану. Мы предполагаем, что комплекс АККО GR20hh'+ДОКСО попадает в клетки EGFR-зависимо. В цитоплазме комплекс GR20hh'+ДОКСО диссоциирует/разрушается, высвобождая ДОКСО для миграции в ядро, взаимодействия с ДНК клетки и проявления токсичности. Поэтому интернализацию ДОКСО измеряли по токсичности с помощью MTS-теста, который определяет индекс выживаемости по оценке уровня активности НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктаз клетки (рис. 19). В высокой и низкой концентрации токсичность ДОКСО одинакова для клеток ПКГБП Sus/fP2 и 107: для 1 μ М ДОКСО это 4,8% и 3,0%, соответственно. Комплекс GR20hh'+ДОКСО менее токсичен: индекс выживаемости 29% и 67%, соответственно. Такая разница показывает разную способность клеток к интернализации комплекса GR20hh'+ДОКСО, что согласуется с различиями при взаимодействии самого аптамера GR20 и конструкции GR20hh' с клетками ПКГБП Sus/fP2 и 107 (рис. 19Д, Е). Следовательно, различие в действии доксорубицина, интеркалированного в анти-EGFR ДНК-аптамерную конструкцию GR20hh'+ДОКСО, для клеток ПКГБП 107 и Sus/fP2 определяется природой клеток и механизмом их взаимодействия с конструкцией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследовано взаимодействие аптамеров с трансмембранными белками-мишениями: рецептором эпидерmalного фактора роста EGFR (часть I) и поверхностным антигеном CD133 (часть II). В первом случае возможно изучать внеклеточный домен как отдельно, в растворе, так и в составе клетки; во втором случае – только в составе клетки. Решались следующие вопросы на разном уровне детализации: 1. Как определить аффинность известных аптамеров для трансмембранных белков? Как сравнить аффинность известных аптамеров для трансмембранных белков? 2. Можно ли уменьшить длину первоначально селектированных аптамеров с 70-80 нт до 40-50 нт без потери функции? 3. Можно ли измерить сродство аптамеров к клеткам? 4. Есть ли корреляция связывания с белком в растворе и в составе клетки? 5. Можно ли создавать аптамерные конструкции с комплементарными олигонуклеотидами (АККО) без потери функции? 6. Можно ли использовать АККО для доставки других молекул в клетки?

Получены следующие основные результаты.

I. Для анти-EGFR аптамеров:

1. Аффинность ДНК- и 2'F-Pyr-RНК-аптамеров к EGFR' сравнима: K_D составляют 15-40 нМ, при этом для ДНК-аптамеров по сравнению с 2'F-Pyr-RНК-аптамерами константы скорости ассоциации и диссоциации k_{on} и k_{off} ниже в 5-10 раз. Короткие аптамеры GR20 и G01 сохраняют аффинность к EGFR'. При укорочении U2 до U2s с 76 до 49 нт аффинность аптамера к EGFR' снижается за счет падения скорости ассоциации, но может быть восстановлена при введении в U2s нуклеотидных замен, с образованием G01.

2. Взаимодействие 2'F-Pyr-RНК-аптамера ME07 с клетками линий A-431, U87, MCF-7 коррелирует с относительным количеством мРНК EGFR. Проточная цитометрия позволяет изучать взаимодействие анти-EGFR аптамеров с живыми клетками. Для целевого взаимодействия 2'F-Pyr-RНК-аптамера ME07 с клетками линии A431 (сверхсинтез EGFR) концентрация полунасыщения $C_p = 130$ нМ.

3. Для клеток ПКГБП сигнал ПЦФ для взаимодействия анти-EGFR аптамеров определяется пороговым значением относительного количества мРНК EGFR, соответствующим клеткам линии U87. Для клеток с низкими допороговыми значениями ($Sus/fP2$) появляется нецелевой сигнал, возможно за счет явлений, опосредованных мембраной клетки.

II. Для анти-CD133 аптамеров:

4. Методом ПЦФ для клеток линии Caco-2 с высоким относительным количеством мРНК CD133 для целевого взаимодействия с 2'F-Pyr-RНК-аптамером A15 и ДНК-аптамером Cs5 определены концентрации полунасыщения, $C_p = 120 \pm 27$ нМ и $C_p = 180 \pm 12$ нМ, соответственно.

5. Для клеток ПКГБП G01, 107 и Sus/fP2 обнаружена разница в СЗИФ в зависимости от относительного количества мРНК CD133. Ниже порогового значения, так же, как и для анти-EGFR аптамеров, появляется нецелевой сигнал.

6. При ПЦФ для аптамеров с одинаковой флуоресцентной меткой СЗИФ для 2'F-Pyr-RНК-аптамеров гораздо больше, видимо за счет более высокой гидрофобности. Меньшая гидрофобность ДНК-аптамеров к CD133 позволяет выявлять гетерогенность клеточной популяции, например для CD133+ клеток ПКГБП 107.

III. Для анти-EGFR аптамерной конструкции с комплементарным олигонуклеотидом:

7. АККО GR20hh' связывает ДОКСО и доставляет его в клетки ПКГБП 107 и Sus/fP2. Механизм проникновения комплекса GR20hh' с ДОКСО в клетку отличается от такового для свободного ДОКСО.

Список сокращений

2'F-Pyr-РНК	РНК, содержащие 2'-дезокси-2'-фторпиrimидиновые нуклеозиды
EGFR'	рекомбинантный внеклеточный домен EGFR человека
GR20hh'	конструкция анти-EGFR ДНК-аптамера GR20 с комплементарным олигонуклеотидом
АККО	аптамерная конструкция с комплементарным олигонуклеотидом
ГБ	glioblastoma
ДОКСО	доксорубицин
ИБС	интерферометрия биослоев
МУзЭл	молекулярный узнавающий элемент
нт	нуклеотид
ОСК	опухолевые стволовые клетки
ПКГБП	перевиваемая культура из ГБ пациента
ПЦФ	проточная цитофлуорометрия
СЗИФ	среднее значение интенсивности флуоресценции

ВЫВОДЫ

1. Для рекомбинантного внеклеточного домена рецептора эпидермального фактора роста человека (EGFR') методом интерферометрии биослоев определены кинетические и равновесные константы взаимодействия с иммобилизованными анти-EGFR аптамерами. Для РНК-аптамеров, содержащих 2'-дезокси-2'-фторпиrimидиновые нуклеозиды (2'F-Pyr-РНК-аптамеров), и ДНК-аптамеров равновесные константы диссоциации были в диапазоне 15-40 нМ. Укороченные ДНК-аптамеры: U2s (49 нт), GR20 (46 нт) и искусственный компьютерный G01 (49 нт) сохраняют аффинность к белку EGFR' в растворе, константы диссоциации составляли 26, 25 и 17 нМ, соответственно.
2. Эффективность связывания анти-EGFR 2'F-Pyr-РНК-аптамера ME07 (48 нт) с клетками стандартных линий A-431, U87, MCF-7 по данным проточной цитофлуориметрии коррелирует с количеством мРНК EGFR.
3. Для трех образцов клеток перевиваемых культур из глиобластомы пациентов 107, G01 и Sus/fP2, с анти-EGFR и анти-CD133 2'F-Pyg-РНК- и ДНК-аптамерами показано, что целевой сигнал для проточной цитофлуориметрии дают только те клетки, у

которых количество маркера выше порогового значения. Целевое взаимодействие показано титрованием клеток аптамерами.

4. Анти-CD133 ДНК-аптамеры способны выявлять гетерогенность клеточной популяции перевиваемой культуры пациента 107 с помощью проточной цитофлуориметрии.

5. Впервые создана и охарактеризована анти-EGFR ДНК-аптамерная конструкция с комплементарным олигонуклеотидом GR20hh', в которую интеркалирован доксорубицин. Действие доксорубицина в составе аптамерной конструкции на клетки культур пациентов определяется свойствами аптамерной конструкции.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по соглашению №75-15-2024-561, от 24 апреля 2024 г.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности и отрасли наук:

1. **Antipova O.**, Moiseenko V., Dzarieva F., Savchenko E., Pronin I., Pavlova G., Kopylov A. «Varieties of interactions of anti-CD133 aptamers with cell cultures from patient glioblastoma» // *The Society for Laboratory Automation and Screening (SLAS) Discovery*. 2024. T. 29. № 8. C. 100195. **IF = 2.7** (JIF) EDN: BUZHVN. 0.44 п.л.

2. Копылов А.М., Фаб Л.В., **Антипова О.М**, Савченко Е.А., Ревищин А.В., Паршина В.В., Павлова С.В., Киреев И.И., Головин А.В., Усачев Д.Ю., Павлова Г.В. «Аптамерные РНК для тераностики глиобластомы мозга человека» // *Биохимия*. 2021. Т. 86. № 8. С. 1217-1230. **IF = 0.908** (РИНЦ). EDN: NISYML. 0.75 п.л.

Kopylov A.M., Fab L.V., **Antipova O.**, Savchenko E.A., Revishchin A.V., Parshina V.V., Pavlova S.V., Kireev I.I., Golovin A.V., Usachev D.Y., Pavlova G.V. RNA Aptamers for Theranostics of Glioblastoma of Human Brain // *Biochemistry (Moscow)*. 2021.T. 86. C. 1012–1024. **IF = 2.8** (JIF). EDN: ENNHUF. 0.75 п.л.

3. **Антипова О.М.**, Завьялова Е.Г., Головин А.В., Павлова Г.В., Копылов А.М., Решетников Р.В. «Успехи применения модифицированных нуклеотидов в технологии SELEX» // *Биохимия*. 2018. Т. 83. № 10. С. 1450-1463. **IF = 0.908** (РИНЦ). EDN: YLVGPR. 0.69 п.л.

Antipova O.M., Zavyalova E.G., Kopylov A.M., Golovin A.V., Pavlova G.V., Reshetnikov R.V. Advances in the application of modified nucleotides in SELEX technology // *Biochemistry (Moscow)*. - 2018. T. 83. C. 1161-1172. **IF = 2.8** (JIF). EDN: WTOEYE. 0.69 п.л.

Иные публикации:

4. Копылов А.М., **Антипова О.М.**, Павлова Г.В. «Молекулярные маркеры нейроонкогенеза при глиобластоме головного мозга» // *Вопросы нейрохирургии имени Н.Н. Бурденко*. - 2022. - Т. 86. - №. 699. - С. 105. **IF = 0.663** (РИНЦ). EDN: PAAAYA. 0.38 п.л.

Kopylov A.M., **Antipova O.M.**, Pavlova G.V. Molecular markers of neuro-oncogenesis in patients with glioblastoma // *Burdenko's Journal of Neurosurgery*. 2022. Т. 86. №.6. С.99-105. **IF = 0.8** (JCI). EDN: PAAAYA. 0.38 п.л.

5. Иванов Б.М., **Антипова О.М.**, Слиман Я.А., Самойленкова Н.С., Пронин И.Н., Павлова Г.В., Копылов А.М. «Использование анти-EGFR аптамерной конструкции GR20hh для регулируемой доставки доксорубицина в клетки глиобластомы пациента» // *Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова*. 2024. Т. 74. № 1. С. 100-108. **IF = 0.695** (РИНЦ). EDN: YMESOP. 0.5 п.л.

Ivanov B.M., **Antipova O.M.**, Sliman Ya A., Samoylenkova N.S., Pronin I.N., Pavlova G.V., Kopylov A.M. Use of Anti-EGFR Aptamer Construct GR20hh for Controlled Delivery of Doxorubicin into Patient-Derived Glioblastoma Cells. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2024. Т. 54. С. 923–928. **IF = 0.20** (JIF). EDN: YYGQNY. 0.5 п.л.