

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Антилова Ольга Михайловна

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

1.4.9. Биоорганическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор Копылов Алексей Михайлович

Москва — 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	10
1. Актуальность темы исследования	10
2. Цели и задачи исследования	11
3. Объект и предмет исследования	12
4. Научная новизна исследования	12
5. Научная и практическая значимость исследования	13
6. Публикации и личный вклад автора	13
7. Основные положения, выносимые на защиту	14
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
Аптамеры для терапии глиобластомы	17
1.1 Аптамеры	17
1.2 Глиобластома	20
1.3 Маркер пролиферации EGFR	28
1.4 Анти-EGFR аптамеры	34
1.5 Опухолевый маркер CD133	40
1.6 Анти-CD133 аптамеры	43
1.7 Заключение	48
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	51
2.1 Реагенты и материалы	51
2.2 Фолдинг аптамеров	52
2.3 Анализ возможной вторичной структуры аптамеров	52
2.4 Спектроскопия ^1H ЯМР	52
2.5 Эксклюзационная хроматография	53
2.6 Спектрофотометрическое плавление	53
2.7 Интерферометрия биослоев	54
2.8 Культивирование клеток	56
2.9 Количественный анализ мРНК с помощью кПЦР	57
2.10 Проточная цитофлуориметрия	57
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	60
3.1 Анти-EGFR аптамеры	60
3.1.1 Предполагаемые вторичные структуры анти-EGFR аптамеров	60
2'F-Pyr-РНК-аптамеры	61
ДНК-аптамеры	62

3.1.2 Анти-EGFR аптамеры узнают рекомбинантный внеклеточный домен EGFR человека (EGFR')	68
Взаимодействие антител к рецептору с рекомбинантным EGFR'	70
2'F-Пур-РНК-аптамеры	73
ДНК-аптамеры	74
3.1.3 Взаимодействие анти-EGFR 2'F-Пур-РНК- и ДНК-аптамеров с линейными клетками A431, U87, MCF7	80
Относительное количество мРНК EGFR в исследуемых клетках	80
Взаимодействие анти-EGFR 2'F-Пур-РНК- и ДНК-аптамеров с линейными клетками A431, U87, MCF7	82
3.1.4. Взаимодействие анти-EGFR 2'F-Пур-РНК- и ДНК аптамеров с клетками перевиваемых культур ГБ пациентов 107, G01 и Sus/fP2	89
Экспрессия мРНК EGFR в исследуемых клетках ПКГБП	89
Взаимодействие анти-EGFR 2'F-Пур-РНК-, ДНК аптамеров с клетками перевиваемых культур ГБ пациентов 107, G01 и Sus/fP2	89
3.1.5 Заключение по анти-EGFR аптамерам	95
3.2 Анти-CD133 аптамеры	96
3.2.1 Предполагаемые вторичные структуры анти-CD133 аптамеров	96
3.2.2 Взаимодействие анти-CD133 2'F-Пур-РНК-, ДНК-аптамеров с клетками CD133+ стандартных линий Caco-2 и HCT116	97
Экспрессия мРНК CD133 в исследуемых линейных клетках	97
3.2.3 Взаимодействие анти-CD133 2'F-Пур-РНК-, ДНК-аптамеров с клетками CD133+ стандартных линий Caco-2 и HCT116	99
3.2.4 Взаимодействие анти-CD133 2'F-Пур-РНК-, ДНК-аптамеров с клетками ПКГБП 107, G01 и Sus/fP2	103
Относительное количество мРНК CD133 в исследуемых клетках ПКГБП	104
Взаимодействие анти-CD133 антител с клетками ПКГБП 107, G01 и Sus/fP2	105
Взаимодействие анти-CD133 2'F-Пур-РНК- и ДНК-аптамеров с клетками ПКГБП 107, G01 и Sus/fP2	107
3.2.5 Разница между взаимодействием неаптамерных олигонуклеотидов и анти-CD133 аптамеров с клетками	115
3.2.6 Заключение по анти-CD133 аптамерам	119
3.3 Анти-EGFR AKKO GR20hh' для доставки доксорубицина в клетки ПКГБП	121
3.3.1 Адресная конструкция на базе анти-EGFR аптамера	121

3.3.2 Упаковка доксорубицина в адресную аптамерную конструкцию GR20hh'	126
3.3.3 Доксорубицин в составе комплекса с анти-EGFR аптамерной конструкцией GR20hh' попадает в ПКГБП	127
3.3.4 Заключение по анти-EGFR AKKO GR20hh' для доставки доксорубицина	128
ВЫВОДЫ	129
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	131
БЛАГОДАРНОСТИ	132
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	133
ПРИЛОЖЕНИЕ	157
A1 Короткий вариант РНК-аптамера J18s	157
A2 Анти-EGFR ДНК-аптамер Tutu20 и его короткие варианты Tutu20s3 и Tutu20s4	161
A3 Анти-EGFR РНК- и 2'F-Pyr-РНК-аптамеры не токсичны для клеток линий DF1 и U251 и клеток ПКГБП G01	164
A4 Флуоресцентная микроскопия клеток А431 с анти-EGFR FAM-аптамерами	166
A5 Флуоресцентная микроскопия клеток ПКГБП 107 с анти-EGFR FAM-аптамерами	169
A6 Анти-EGFR ДНК-аптамер GR20 и AKKO GR20hh' с ДОКСО с клетками ГБ крысы	171
A7 Анти-CD133 2'F-Pyr-РНК-аптамер A15 с клетками ПКГБП 107 и Sus/fP2 в присутствии блокирующих НК	179
A8 НК и флуоресцентный декстран с клетками Caco-2 и ПКГБП Sus/fP2	180
A9 Анти-EGFR 2'F-Pyr-РНК- и ДНК-аптамеры с клетками ПКОГБП 107 с нокдауном EGFR	182

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2'F-Pyr-RНК – РНК, содержащие 2'-дезокси-2'-фторпиримидиновые нуклеозиды

А431 - линия клеток эпидермальной аденокарциномы человека

А549 - линия клеток аденокарциномы легкого человека

ADC - (англ. Antibody-drug conjugate) конъюгат антитело-лекарство

АКТ – протеинкиназа В

АРС – флуоресцентный белок аллофикации

В7-Н3 - иммунорегуляторный белок В7

Сaco-2 - линия клеток аденокарциномы толстой кишки человека

CAR Т-клетки – Т-лимфоциты с химерными антигенными рецепторами

CD133 – или проминин-1, маркер пролиферации, белок кластера дифференцировки 133, онкомаркер глиобластомы

CD133/1-APC - антитела к CD133 (клон W6B3C1) мышиные антитела, коньюгиранные с аллофикацианином

cell-SELEX - клеточный SELEX, в качестве мишени используют целые клетки

CHO-K1 – линия овариальных клеток китайского хомячка

Су-2 - цианин-2, флуоресцентный краситель

Су-5 - цианин-5, флуоресцентный краситель, 2-[5-[1-[6-[(2,5-Диоксо-1-пирролидинил)окси]-6-оксогексил]-1,3-дигидро-3,3-диметил-5-сульфо-2Н-индол-2-илиден]-1,3-пентадиен-1-ил]-1-этил-3,3-диметил-5-сульфо-3Н-индол

DAPI - 4',6-диамино-2-фенилиндол, флуоресцентный краситель синей области спектра, эффективно окрашивающий ядерную ДНК

DMEM - модифицированная среда по Дульбекко

DMEM/F12 - Среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) с добавлением среды F12 в соотношении 1:1

dNTP – 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфат

EGF - эпидермальный фактор роста

EGFR - рецептор эпидермального фактора роста, англ. Epidermal Growth Factor Receptor, он же ErbB-1

EGFR' - рекомбинантный внеклеточный домен рецептора эпидермального фактора роста человека

EGFRvIII (de2-7EGFR или Δ EGFR) – вариант рецептора, у которого отсутствует фрагмент внеклеточной части рецептора (остатки 6-273, экзоны 2-7).

EGFRwt - EGFR дикого типа

ERK – киназа, регулируемая внеклеточным сигналом

FAM - 6-карбоксифлуоресцеин, флуоресцентный краситель

FBS - Fetal Bovine Serum, эмбриональная бычья сыворотка

FCS - фетальная телячья сыворотка

Fc-фрагмент - кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина

FDA – англ. U.S. Food and Drug Administration, Управление по контролю за качеством продуктов и лекарств США

FLIP – англ. Cellular FLICE-like inhibitory protein, участвует в индукции апоптоза

GlutaMAX – добавка для культивирования клеток, альтернатива глутамина

GR20hh' - анти-EGFR конструкция ДНК-аптамера GR20

HCT116 (CCL-247 - ATCC) - клеточная линия карциномы толстой кишки человека

HEK293T - линия клеток эмбриональных почек человека

HEPES – (4-(2-гидроксиэтил)-1-пiperазинэтансульфоновая кислота)

HER2, hErbB2 (Her2/neu) - англ. human epidermal growth factor receptor 2; рецептор эпидермального фактора роста, тип 2

IC₅₀ – концентрация 50% ингибиования

IC_{max} - концентрация соединения, оказывающая максимальную степень ингибиования

IgG1 - иммуноглобулин G подкласса 1

IL-13R α 2 - субдомен alpha-2 рецептора интерлейкинина-13

JAK – янус-киназа

K_D (K_d) – кажущаяся константа диссоциации

LNA - англ. locked nucleic acid, мостиковые нуклеиновые кислоты

Mab 225, C225 – цетуксимаб, терапевтические антитела к EGFR

MEK – киназа митоген-активируемой протеинкиназы

MFE - от англ. Minimum Free Energy, модель минимальной свободной энергии

mFold – алгоритм анализа вторичной структуры

MMAF - монометил ауристатин F

mod-SELEX – SELEX с использованием химически модифицированных олигонуклеотидов

MTS – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолиум), реагент для определения жизнеспособности клеток

NADO - неаптамерный ДНК-олигонуклеотид

NF1 – нейрофибромин 1

Notch – сигнальный путь, регулирует взаимодействия между соседними клетками

PBS - фосфатный буферный раствор, англ. phosphate-buffered saline, pH=7.4

PE - фикоэритрин

PI3K – фосфоинозитид-3-киназа

PKC – протеинкиназа С

PLC γ – фосфолипаза С гамма

PROMININ-1 – ген, кодирующий CD133/проминин 1

proof of concept - доказательство осуществимости концепции

PTEN – гомолог фосфатазы и тензина

RAF – белок фибросаркомы с быстрым ускорением

RAS – белок вируса саркомы крыс

RNAComposer – онлайн сервис для создания трехмерных моделей РНК

RPMI (RPMI 1640) – среда для культивирования клеток

SA - стрептавидин

SARS-CoV-2 – англ. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2, оболочечный одноцепочный (+)РНК-вирус

SELEX – англ. selective evolution of ligands by exponential enrichment, селективная эволюция лигандов экспоненциальным обогащением

STAT – фактор транскрипции

SYBR Green I - асимметричный цианиновый краситель, используемый в молекулярной биологии для окрашивания нуклеиновых кислот

T7 полимераза - ДНК-зависимая РНК- полимераза

T_m - температура плавления

TMS - тетраметилсилан

Трис – 2-амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диол

У87 - линия клеток глиобластомы человека

VEGF165 – англ. Vascular Endothelial cell Growth Factor 165, Фактор роста эндотелия сосудов человека 165, регуляторangiогенеза

Wnt - сигнальные молекулы, участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток

АККО - аптамерная конструкция с перевиваемыми олигонуклеотидами

а.к. – аминокислоты

АТФ – аденоzinтрифосфат

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

ГБ – глиобластома

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

Да – дальтон

депатукс-м, ранее АВТ-414 - депатуксизумаб мафодотин, коньюгат антител к EGFRvIII и монометилауристатина F

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ДОКСО - доксорубицин

дДНК – двухцепочечная ДНК

кДНК – комплементарная ДНК

кПЦР – количественная ПЦР, ПЦР в реальном времени

мРНК – матричная РНК

МУзЭл - молекулярный узнавающий элемент

НК – нуклеиновая кислота

нт - нуклеотид

НТФ – нуклеозидтрифосфат

НЭ – нейроэпителиальные клетки

ОЕ - оптическая единица

ОСК – опухолевые стволовые клетки

ПК - прогениторные клетки

ПКГБП - клетки перевиваемых культур ГБ пациентов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦФ - проточной цитофлуориметрии

РНК – рибонуклеиновая кислота

СК – стволовые клетки

СКГ - стволовые клетки глиобластомы

т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов

ТК - receptor тирозинкиназы

тРНК – транспортная РНК

у.е. – условные единицы флуоресценции

ЦНС – центральная нервная система

ВВЕДЕНИЕ

1. Актуальность темы исследования

Глиомы являются одной из наиболее агрессивных опухолей головного мозга, характеризуются крайне неблагоприятным прогнозом. Более половины всех глиом — это глиобластомы (ГБ), самый агрессивный класс, наиболее злокачественные глиомы. К сожалению, доступные терапевтические методы (такие как микронейрохирургия, радио- и химиотерапия) до сих пор не могут существенно улучшить отрицательный прогноз пациентов с глиомами высокой степени злокачественности: средняя продолжительность жизни с глиобластомой крайне низка и составляет около года. Эффективность противоопухолевой терапии сдерживается рядом факторов, в числе которых популяционная гетерогенность опухоли, в том числе существование опухолевых стволовых клеток (ОСК).

Опухоль можно рассматривать как набор различных популяций клеток, включающих множество различных функциональных групп, в том числе клетки основной массы опухоли, краевые быстро пролиферирующие клетки опухоли и «спящие» клетки, обладающие способностью к самообновлению (рисунок 1). Основная масса опухоли, включающая первую упомянутую популяцию, обычно удаляется хирургическим путем. На вторую рассматрываемую нами популяцию активных быстро делящихся клеток, как правило, направлены применяемые химио- и радиотерапия. Однако эти подходы также оказывают значительное негативное действие на здоровые клетки. Перспективным направлением терапии, действующей на пролиферирующие клетки, представляется использование характерных маркеров таких опухолевых клеток, что является целью разработки таргетных методов терапии опухоли. Рецептор эпидермального фактора роста (англ. Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR, ErbB-1) признан одной из главных мишней клеток ГБ. Поскольку данный рецептор сверхэкспрессируется во многих видах опухолей и более чем в половине случаев глиом, и может претендовать на роль ключевого фактора злокачественности. Третья рассматриваемая популяция «спящих» клеток - опухолевые стволовые или подобные стволовым клетки (ОСК). Эти клетки, как правило, обладают замедленным метаболизмом, их деление - редкое событие, поэтому действие стандартных подходов химио- и радиотерапии на эти клетки остается неэффективным. Невозможность полного удаления популяции недифференцированных клеток классическими методами приводит к тому, что запуск деления ОСК вызывает рецидив

опухоли. Для повышения эффективности терапии опухоли перспективным направлением является разработка методов детекции ОСК, и дальнейшая адресная доставка терапевтических агентов в ОСК. Разница в популяциях активно пролиферирующих и опухолевых стволовых клеток состоит в количественной представленности как клеток рассматриваемой популяции, так и биомаркеров, на поверхности этих клетках. Если для активно пролиферирующих клеток можно использовать хорошо изученный биомаркер EGFR, то на установление маркеров ОСК направлены многие усилия. Маркером одного из ранних этапов дифференцировки клеток служит белок CD133/проминин-1. Агрессивные опухоли ГБ высокой степени злокачественности характеризуются высокой представленностью CD133. Однако опухоли, не содержащие популяции CD133+ клеток, также могут иметь негативный прогноз, что подтверждает предположение о сложности и гетерогенности опухоли, невозможности сведения популяции ОСК к клеткам, идентифицируемым по единственному онкомаркеру. Тем ценнее понимание возможностей детекции маркеров ОСК с помощью различных аффинных агентов, поскольку эти подходы можно далее транслировать на ряд других, возможно, еще не установленных маркеров.

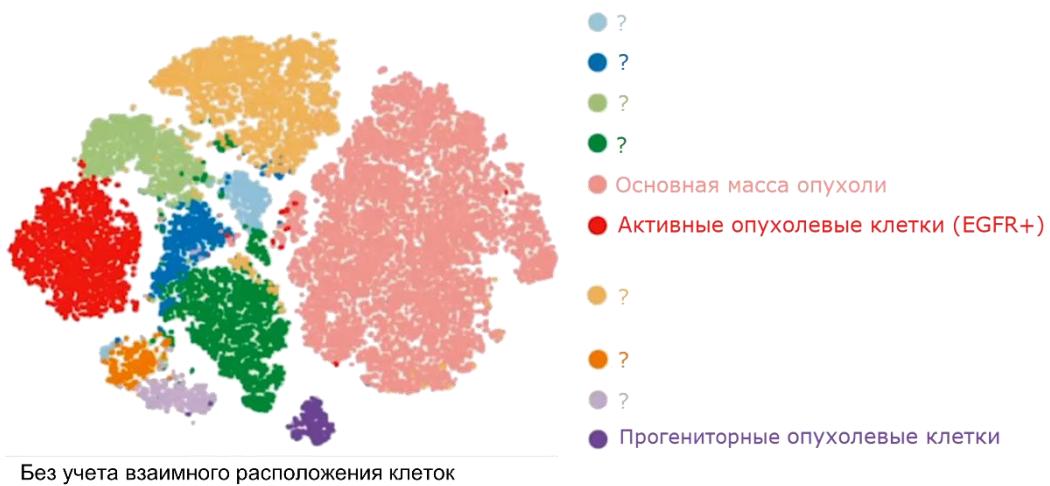


Рисунок 1 - Схематическое представление опухоли ГБ с точки зрения популяционного состава

Перспективным направлением онкотерапии является тераностика, комбинация терапии и диагностики. Целевую группу опухолевых клеток идентифицируют по характерным маркерам с помощью молекулярных узнавающих элементов (МУзЭлей): антител, аптамеров, а затем пролиферацию этих клеток блокируют с помощью тех же (или аналогичных) МУзЭлей, либо их производных. Аптамеры часто называют «химическими антителами». Это небольшие, до 100 нт длиной олигонуклеотиды, способные специфически взаимодействовать с мишениями, в числе которых маркеры

опухолевых клеток. Поскольку химическая природа олигонуклеотидов и белков (антител) существенно различается, для применения аптамеров в терапии 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.

Терапия будущего для ГБ, равно как и для других типов опухолей, будет использовать комплекс разных пролонгированных и специфических воздействий на совершенно различные субпопуляции: ОСК, активные пролиферирующие клетки и клетки основной массы опухоли. Причем эффективность терапии будет определяться как природой, так и последовательностью воздействия на каждую субпопуляцию. Определение биомаркеров каждой отдельной популяции клеток гетерогенной опухоли - предмет исследования многих научных групп по всему миру. Разработка новых агентов, нацеленных на определенный биомаркер, представляет собой ключевую задачу для успеха терапии глиом.

В настоящей работе исследовались следующие вопросы на разном уровне детализации:

1. Поскольку селекция проводится для 70-80-ти звенных олигонуклеотидов, можно ли уменьшать длину отобранных аптамеров и модифицировать их без потери функции?
2. Сравнима ли аффинность уже известных аптамерных олигонуклеотидов для трансмембранных белков?
3. Связываются ли они с мишенью на клетках? Можно ли сравнивать аффинность аптамеров на клетках?
4. Есть ли корреляция аффинности аптамеров к белку в растворе и в составе клетки?
5. Можно ли создавать аптамерные нековалентные межмолекулярные конструкции без потери функций?
6. Можно ли их использовать для доставки других молекул в клетки?

2. 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.

3. Объект и предмет исследования

Объектами исследования являются анти-EGFR аптамеры: 2'F-Pyr-RНK-аптамеры ME07, CL4; ДНК-аптамеры U2, U2s, Gol1, U31, GR20; и анти-CD133 аптамеры: 2'F-Pyr-RНK-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.

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'.

4. Научная новизна исследования

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

Впервые показано, что укороченные анти-EGFR ДНК-аптамеры U2s (49 нт) и GR20 (46 нт) и предложенный Головиным А.В. Gol1 (49 нт) имеют аффинность как к EGFR' в растворе, так и к EGFR+ клеткам. Оказалось, что аффинность аптамеров к

EGFR+ клеткам, выраженная как концентрация полунасыщения, на порядок ниже, чем K_D комплексов аптамеров с белком в растворе.

Впервые изучили взаимодействие аптамеров с клетками ПКГБП. Впервые обнаружено два типа взаимодействия анти-EGFR и анти-CD133 2'F-Руг-РНК- и ДНК-аптамеров с клетками ПКГБП 107, G01 и Sus/fP2: рецептор-опосредованное и мембранные. Относительный вклад двух типов взаимодействий в средние значения интенсивности флуоресценции (СЗИФ) проточной цитофлуориметрии (ПЦФ) определяется свойствами самих клеток, на которые влияет уровень транскрипции гена-маркера.

Впервые на качественном и количественном уровне охарактеризована сборка комплекса удлиненного аптамера GR20h с комплементарным олигонуклеотидом h' (GR20hh'). Впервые показана доставка противоопухолевого препарата доксорубицина (ДОКСО) в составе GR20hh' в клетки ПКГБП.

5. 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 подходами для конкретной мишени. Серийное 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 функционирования и прогрессии ГБ. Уникальная возможность использования клеток ПКГБП из Биобанка Центра нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко позволяет разрабатывать подходы для трансляции аптамеров в биомедицинские исследования и развития аптатерапии глиом.

6. Публикации и личный вклад автора

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.

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. С. 100195. **IF = 2.7** (JIF) EDN: BUZHVN. 0.44 п.л.

2. Копылов А.М., Фаб Л.В., **Антипова О.М.**, Савченко Е.А., Ревишин 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.

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

Автором проделана экспериментальная работа, включающая моделирование возможных вторичных структур аптамеров, анализ связывания аптамеров с клетками линий и перевиваемых культур ГБ и их анализ в работах [1-2]. В обзорной работе [3], описывающей анализ роли маркера CD133 в ГБ, Антиповой О.М. созданы схемы дифференцировки опухолевых клеток. Для обзорной статьи [4] Антиповой О.М. собраны данные о различных подходах к селекции и химической модификации аптамеров. В работе [5] выполнен дизайн аптамерной конструкции, качественный и количественный анализ эффективности сборки аптамерной конструкции, определена ее аффинность к белку.

7. Основные положения, выносимые на защиту

1. Анти-EGFR 2'F-Pyr-RНК- и ДНК-аптамеры одинаково хорошо взаимодействуют с рекомбинантным внеклеточным доменом EGFR.
2. Анти-EGFR 2'F-Pyr-RНК-аптамер ME07 связывается с линейными клетками в соответствии с относительным количеством мРНК EGFR.
3. Взаимодействие анти-EGFR и анти-CD133 2'F-Pyr-RНК- 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.

До начала нашего исследования было известно около десятка семейств анти-EGFR аптамеров и несколько семейств анти-CD133 аптамеров, однако сравнение литературных данных было невозможным в силу отсутствия единого стандарта для анализа связывания аптамер-мишень. Полученные в ходе выполнения работы данные прямого сравнения анти-EGFR и анти-CD133 аптамеров призваны прояснить сходство и различие между опубликованными аптамерами, а исследование взаимодействия анти-EGFR и анти-CD133 аптамеров с клетками перевиваемых культур ГБ пациентов демонстрируют возможности аптамеров для детекции мишени, что необходимо для продвижения аптамеров для терапии глиом.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Аптамеры для терапии глиобластомы

1.1 Аптамеры¹

Новые свойства и функции нуклеиновых кислот (НК), связанные с молекулярным узнаванием, получили развитие и применение в таких областях деятельности, как аналитическая химия [6], молекулярная биология [7], диагностика [8], терапия [9]. Благодаря этому данный тип молекул привлекает большое внимание в академических исследованиях и имеет огромный потенциал для дальнейшего применения. Природные функционально активные НК были известны и ранее (рибозимы, микроRNK, рибопереключатели). С помощью методов молекулярной эволюции *in vitro* стало возможным получать широкий спектр молекулярных узнавающих элементов (МУзЭли) аптамеров - синтетических олигонуклеотидов, способных за счет уникальной пространственной структуры высокоселективно и специфично узнавать целевую молекулярную мишень. Метод отбора аптамеров был разработан в 1990 году одновременно и независимо тремя научными группами и получил название селективная эволюция лигандов экспоненциальным обогащением (англ. SELEX, selective evolution of ligands by exponential enrichment) [10-12]. За прошедшие годы метод SELEX неоднократно модифицировали, что привело к увеличению списков мишеней и аптамеров, обладающих хорошей аффинностью и селективностью [3, 13].

Селекция аптамеров представляет собой последовательное выполнение циклов селекции (рисунок 2). Каждый цикл селекции аптамеров можно разбить на три последовательных итеративных этапа. На первом этапе проводят инкубацию библиотеки ДНК или РНК-олигонуклеотидов, содержащих 10^{14} – 10^{15} вариантов 75-80-звенных олигонуклеотидов с рандомизированной нуклеотидной последовательностью длиной 20-50 нт, с целевой мишенью для того, чтобы наиболее аффинные аптамеры из пул библиотеки связались с мишенью. На стадии разделения ДНК/РНК, связавшиеся с мишенью, отделяют от огромного избытка несвязанных олигонуклеотидов библиотеки. Часто чтобы исключить неспецифическое связывание в цикл SELEX включают раунды отрицательной селекции, обычно к используемым в процессе отбора фильтрам,

¹ При подготовке данного раздела диссертации использована публикация [3], выполненная в соавторстве и указанная во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

магнитным шарикам, проч., и/или к нецелевым мишениям, например, родственным белкам или клеткам. На третьем этапе происходит амплификация обогащенной библиотеки, которая проводится, как правило, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или кПЦР.

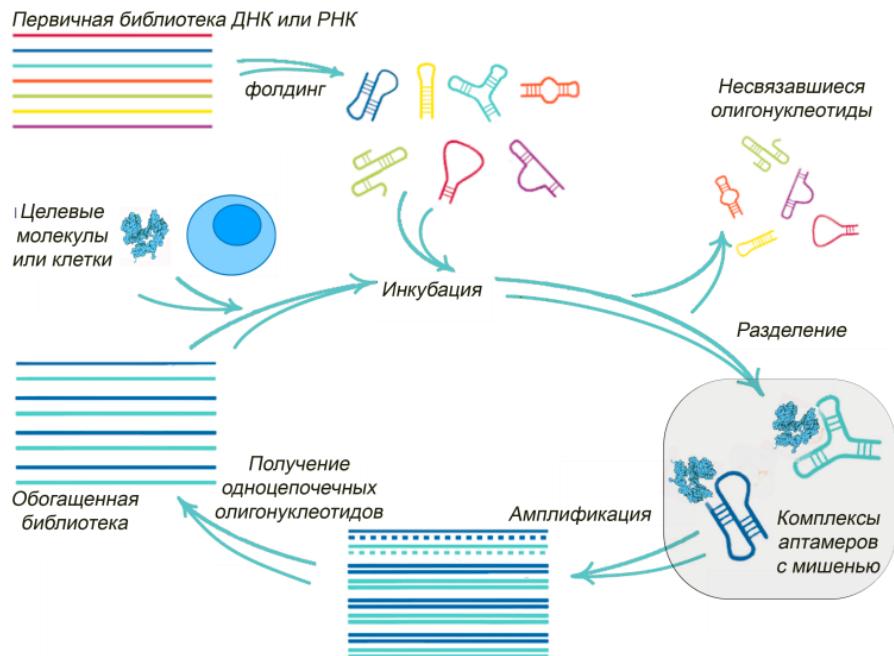


Рисунок 2 - Этапы получения аптамеров методом SELEX - систематической эволюции лигандов методом экспоненциального обогащения [адаптировано из 14]

Для селекции РНК-аптамеров необходима стадия транскрипции РНК с ДНК библиотеки и после проведения отбора - стадия обратной транскрипции отобранной РНК, как бы мало ее ни было в ДНК-матрицу, которую уже можно амплифицировать с помощью ПЦР. Но по сравнению с отбором аптамеров из ДНК-библиотек, процедура отбора РНК-аптамеров проще - нет необходимости разделения двухцепочечной ДНК на одноцепочные олигонуклеотиды и удаления второй, антисмысловой цепи ДНК. Кроме того, за счет наличия дополнительной 2'-гидроксильной группы молекулы РНК обладают высоким потенциалом для формирования сложных трехмерных структур. Именно поэтому в первых исследованиях SELEX использовались рандомизированные библиотеки, состоящие из РНК [15]. С другой стороны, наличие 2'-гидроксильной группы оказывает негативное влияние, поскольку повышает восприимчивость молекул РНК к гидролизу, что является критичным для будущего применения аптамеров. Наиболее простая и популярная модификация РНК - замена для пиримидин-нуклеотидов гидроксильной группы второго положения сахара на 2'-фтор. Модификация 2'-F лучше всего имитирует 2'-Н с точки зрения размера и заряда. Кроме того, модификация 2'-F приводит к повороту цепи олигонуклеотида, что приводит к большему стэкингу и повышению температуры плавления структурированного участка

[16]. Популярность указанного способа модификации объясняется наличием коммерчески доступной T7 ДНК-зависимой РНК- полимеразы, которая позволяет включать 2'-F-пиримидин нуклеотиды в растущую цепочку РНК, ферментативно синтезирующую на двуцепочечной ДНК-матрице. Развитие биоинженерии приводит к появлению все новых полимераз, способных включать все более сложные нуклеозидтрифосфаты (НТФ) в синтезированную молекулу РНК. Поэтому для селекции аптамеров стали использовать комбинаторные библиотеки РНК с модифицированными сахарными остатками [3, 17]. В настоящее время наиболее популярными нуклеиновыми кислотами для отбора аптамеров являются замещенные 2'-метокси-, 2'-фторпроизводные и так называемые заблокированные нуклеиновые кислоты (LNA, также известные как мостиковые нуклеиновые кислоты) [18, 19].

Три этапа, связывание, разделение и амплификация, выполняются в каждом раунде SELEX. Повторение раундов SELEX проводят несколько раз, причем с каждым разом повышается строгость отбора. Полученный в результате итогового отбора пул высокоаффинных и селективных к мишени олигонуклеотидов, называют аптамерами. Для идентификации их нуклеотидных последовательностей аптамеры клонируют и секвенируют. Следует подчеркнуть, что в результате селекции получается не один аптамер, а семейство молекул олигонуклеотидов со сходной аффинностью. Отобранные аптамеры, имеют разный нуклеотидный состав и пространственную структуру, даже если они принадлежат к одному и тому же семейству. Как эти разные структуры обеспечивают специфичность взаимодействия с одной и той же мишенью? Как соотносятся свойства аптамеров, полученных в результате различных процессов селекции? На некоторые вопросы можно ответить, если изучить структуры комплексов мишени и аптамера. Для предсказания и изучения молекулярного взаимодействия аптамеров с целью повышения их сродства в настоящее время все чаще используются вычислительные модели аптамеров [20]. Трехмерные модели аптамеров, как правило получают на основе их первичных нуклеотидных последовательностей с помощью хорошо зарекомендовавших себя сервисов для анализа возможных вторичных структур mFold [21-23], программ для создания трехмерных моделей, например веб-сервера RNAComposer и моделирования молекулярной динамики [24, 25]. Следующий шаг включает оценку модельных структур и сравнение с экспериментально определенными структурами. Такой подход, включающий комплексный анализ образования возможных вторичных структур, использование RNAComposer и моделирование молекулярной динамики позволяет генерировать трехмерные структуры РНК-аптамеров, математически анализировать их взаимодействие с

мишенью, используя геометрию и топологию известных трехмерных экспериментально определенных структур мишней [26, 27].

Для терапевтического применения было бы идеально, чтобы терапевтический агент оставался в кровотоке в течение длительного времени, чтобы увеличить вероятность воздействия терапии на опухолевые клетки. Фармакокинетический профиль и биодоступность инъекционных препаратов являются критическими детерминантами терапевтической эффективности. В этом отношении гуманизированные антитела превосходят другие лекарственные препараты, показывая период полураспада в кровотоке от нескольких дней до недель. Аптамеры можно рассматривать как олигонуклеотидные функциональные аналоги белковых моноклональных антител. Белки исторически доминируют как доступные аффинные агенты, в основном, из-за широкого химического разнообразия боковых радикалов аминокислот [3, 28]. По сравнению с белками, ДНК и РНК менее разнообразны, они содержат лишь четыре нуклеотида. Отобранные аптамеры могут быть модифицированы. Постселекционная модификация аптамеров заключается в направленном введении модифицированных нуклеотидов в определенные положения отобранного ранее аптамера. Преимущество данного подхода - использование стандартного олигонуклеотидного синтеза, а недостаток состоит в следующем. Неоднократно показано, что реализовать направленную химическую модификацию уже отобранного аптамера без потери его функциональной активности очень трудно, поскольку связь между пространственной структурой и функцией аптамера не всегда очевидна [3, 29]. ДНК-аптамеры чаще всего модифицируют по основаниям, изменяя аффинность отобранных аптамеров. Химия модификаций РНК по основаниям также развивается, однако для селекции такие модифицированные РНК пока не используются по причинам отсутствия подходящих коммерчески доступных РНК-полимераз. Модификации ДНК и РНК были подробно описаны в недавних обзорах [3, 30-32].

Постселекционная модификация и методы отбора модифицированных аптамеров не являются взаимоисключающими подходами. Так, Ракман и др. отобрали РНК-аптамер к фактору роста эндотелия сосудов (VEGF165), с модифицированными замещенными фтором по 2'-положению пиrimидиновыми звеньями, после чего заменили в некоторых позициях сахар на 2'-метокси-производные, что не ухудшило кажущуюся константу связывания аптамера с мишенью, итоговая $K_d = 49\text{-}130$ пМ. Полученный в результате отбора и пост-селекционной модификации аптамер стал основой пегаптаниба - первого аптамерного лекарственного препарата для терапии

глазных сосудистых заболеваний, одобренного Управлением по контролю за качеством продуктов и лекарств США (FDA) [33, 34].

Аптамеры используются в различных методах детекции, включая фотометрию, электрохимию, масс-спектрометрию, микрофлюидику и поверхностный плазмонный резонанс [35, 36]. Кроме того, аптамеры перспективны в качестве терапевтических агентов благодаря своей низкой иммуногенности [37, 38]. В отличие от антител, аптамеры могут быть синтезированы химическим путем, что позволяет осуществлять крупномасштабное производство с меньшей вариабельностью от партии к партии и снижением производственных затрат и легче поддаются химической модификации, более стабильны при физиологической температуре, чем антитела, структура аптамеров может многократно выдерживать циклы денатурации-ренатурации, что позволяет использовать их в качестве терапевтических и диагностических агентов [38].

Аптамеры с высокой аффинностью и специфичностью отобраны к молекулам-мишеням различной природы (низкомолекулярные соединения, например, АТФ [39] или белок, например фрагмент оболочечного белка SARS-CoV-2 [40], даже зоонозных облигатных внутриклеточных бактерий [41]).

Таким образом, аптамеры получаются в результате процедуры SELEX из ДНК/РНК-библиотек олигонуклеотидов. Аптамеры связываются со своими мишенями со сродством и специфичностью, сходными с антителами, кроме того, аптамеры обладают рядом преимуществ, которые могут превзойти технологию антител и открыть новые возможности для создания более совершенных терапевтических и диагностических решений.

1.2 Глиобластома²

Глиомы (в том числе их наиболее агрессивный класс - глиобластомы, ГБ) являются наиболее распространенными злокачественными первичными опухолями головного мозга [42], составляя 50,1% всех злокачественных опухолей [43, 44]. В случае ГБ медиана выживаемости пациентов составляет около 14 месяцев независимо от того, получает ли пациент лечение, без значительного улучшения, несмотря на обширные исследования [45].

Глиомы представляют собой опухоли центральной нервной системы, развивающиеся из глиальных клеток, которые являются не нейральными

² При подготовке данного раздела диссертации использованы публикации [1, 2, 4], выполненные в соавторстве и указанные во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

вспомогательными клетками мозга. В настоящее время Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) утверждена классификация глиом, основанная как на гистопатологических признаках, так и на молекулярной информации - молекулярных маркерах [46]. Согласно этой системе, опухоли головного мозга классифицируются от I до IV грейда в зависимости от отсутствия или наличия определенных гистологических и молекулярных признаков. Гистологическая степень злокачественности новообразования предназначена для передачи информации о его вероятном биологическом поведении и может иметь клиническое значение, в некоторых случаях определяя варианты лечения или внося вклад в обсуждение прогноза, хотя в определении прогноза участвуют и многие другие факторы, помимо гистологии [47]. В отличие от глиом низкой степени злокачественности, глиомы высокой степени злокачественности, в том числе ГБ, имеют значительно более агрессивное клиническое течение и худший прогноз.

Недавние достижения в молекулярной биологии позволили более глубоко изучить ГБ на молекулярном уровне. Многое было открыто о биологической основе этих опухолей, хотя многое остается неизвестным. Инновации в генетическом секвенировании позволили исследователям построить генетические профили опухолей головного мозга, что способствовало более глубокому пониманию их патогенеза. Возросшая способность оценивать паттерны экспрессии белков внутри и между типами опухолей также предоставила дополнительное измерение для дальнейшего анализа и классификации злокачественных глиом, что вносит значительный вклад как в диагностику, так и для терапии.

ГБ делятся на две широкие клинические категории: первичные ГБ, которые, по-видимому, возникают *de novo* и ведут себя более агрессивно, и вторичные ГБ, которые, как правило, возникают в результате прогрессирования глиом низкой степени злокачественности и характеризуются более молодым возрастом постановки диагноза и более благоприятным прогнозом. В последние годы генетический и молекулярный анализ привели к открытию того, что первичные и вторичные ГБ можно классифицировать по статусу мутации в гене изоцитратдегидрогеназы (IDH). Первичные ГБ обычно демонстрируют IDH дикого типа, а вторичные — мутантные IDH. Оба типа ГБ практически неразличимы при гистологическом исследовании, но их различные молекулярные профили и клиническое течение позволяют предположить, что эти опухоли могут представлять собой два отдельных класса с разным происхождением и механизмами патогенеза [48].

Первичные ГБ с диким типом IDH встречаются гораздо чаще, чем ГБ с мутацией IDH, и составляют около 90% случаев. Они также преимущественно поражают пожилых людей, со средним возрастом постановки диагноза 62 года и пиком заболеваемости у пациентов в возрасте 55–85 лет, тогда как ГБ с мутацией IDH чаще встречаются у молодых пациентов, со средним возрастом постановки диагноза 45 лет [49].

Что касается локализации, первичные ГБ обычно встречаются во всех полушариях головного мозга; одно исследование 987 опухолей отметило поражение височной доли в 31% случаев, теменной доли в 24%, лобной доли в 23% и затылочной доли в 16% [47]. Интересно, что вторичные глиобластомы, по-видимому, демонстрируют предрасположенность к лобной доле, что может отражать их происхождение из предшествующего поражения, поскольку некоторые опухоли низкой степени злокачественности с мутацией IDH, как правило, также обнаруживаются в этой области [50].

Помимо статуса мутации IDH, первичные и вторичные ГБ также различаются по молекулярному ландшафту. Полная потеря хромосомы 10, содержащей ген-супрессор опухоли PTEN, является распространенной особенностью ГБ с диким типом IDH [51]. В целом, мутации в PTEN наблюдаются у 15–40% ГБ, почти всегда первичных [51]. Амплификация EGFR наблюдается в 30–60% случаев ГБ и часто связана с его сверхэкспрессией [52]. Мутации TP53 обнаруживаются примерно в 25% опухолей, но эта мутация гораздо чаще встречается во вторичных ГБ [52]. Сверхэкспрессия MDM2 наблюдается более чем в 50% глиобластом IDH дикого типа [53]. Мутации промотора TERT гена, кодирующего каталитическую субъединицу теломеразы - обратную транскриптазу, которая играет важную роль в поддержании теломер и нормальном старении клеток, также типичны для первичных глиобластом, было обнаружено, что более 80% опухолей первичных ГБ демонстрировали это изменение [54, 55]. Метилирование промотора Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT) встречается как в первичных, так и в вторичных глиобластомах (хотя исследования показали, что оно может быть более распространено в опухолях с мутацией IDH), и исследования показали, что около 40–50% опухолей поражены [56]. Это генетическое изменение имеет особое клиническое значение, поскольку его наличие связано с более благоприятным прогнозом и повышенным ответом на определенные виды терапии.

Современная стандартная терапия злокачественных глиом обычно состоит из комбинации хирургической резекции с последующей лучевой и химиотерапией [57–

59]. Как упоминалось ранее, хирургическое вмешательство является ключевой частью парадигмы лечения практически всех злокачественных глиом; однако дополнительные методы лечения могут различаться в зависимости от типа поражения.

Хирургическая резекция является неотъемлемым компонентом лечения практически всех впервые диагностированных злокачественных глиом. Хирургия может обеспечить наличие биопсийного материала для окончательной постановки диагноза, уменьшить объём опухоли и, следовательно, симптомы, вызванные эффектом опухолевой массы, а также подготовить пациентов к адъювантной терапии при необходимости [60]. Однако хирургия не является панацеей: когда речь идёт о ГБ, даже в случаях полной резекции макроскопической опухоли микроскопические опухолевые клетки всё ещё остаются и обширно инфильтрируют в окружающий мозг, распространяясь за видимый край опухоли [61]. Злокачественные глиомы представляют особую сложность из-за их вышеупомянутых нечетких границ и инфильтративного характера роста. Полная резекция злокачественных глиом осложнена их внутренней природой. Дополнительные ограничения к хирургической резекции включают вовлечение в процесс областей, управляющих речью, моторикой или сенсорикой или структур ствола мозга, где хирургическое вмешательство может привести к значительной инвалидности [62]. Диффузные глиомы часто неоперабельны по этой причине. Тем не менее, хирургическая резекция остается основой терапии большинства злокачественных глиом, и более обширная резекция связана с лучшими результатами. Хотя максимальная хирургическая резекция всегда является целью, сохранение здорового мозга и предотвращение избыточного неврологического дефицита также является приоритетом. Интраоперационное использование флуоресцентных агентов для определения границы между опухолью и нормальным мозгом в режиме реального времени является одним из методов, направленных на решение этой проблемы [63].

Лучевая терапия является важнейшей частью лечения злокачественных глиом и служит важным и эффективным дополнением к хирургическому вмешательству [64]. Цель лучевой терапии — доставить концентрированную дозу радиации к опухоли, одновременно минимизируя количество радиации, попадающей в соседние области относительно нормального мозга. При глиобластоме добавление лучевой терапии к хирургическому вмешательству может продлить выживаемость до 9 месяцев [64].

В последние годы адъювантная химиотерапия становится все более важным инструментом в лечении злокачественных глиом. Темозоломид в настоящее время является первым химиотерапевтическим препаратом выбора для пациентов со

злокачественными глиомами вследствие приемлемого профиля токсичности [57]. В исследовании 573 пациентов с впервые диагностированной глиобластомой, которым была назначена только лучевая терапия или лучевая терапия с сопутствующим и адьювантным применением темозоломида, медиана выживаемости составила 14,6 месяца в группе, получавшей как лучевую, так и химиотерапию, по сравнению с 12,1 месяца в группе, получавшей только лучевую терапию. Кроме того, двухлетняя выживаемость составила 26,5% у пациентов, получавших обе адьювантные терапии, по сравнению с 10,4% у тех, кто получал только лучевую терапию [57].

Другие варианты химиотерапии включают локальную доставку кармустина с помощью пластин, имплантируемых в место опухоли после резекции. При этом методе химиотерапевтический препарат постепенно высвобождается в окружающие ткани в течение нескольких недель. Такой подход привел к увеличению медианной выживаемости с 11,6 до 13,9 месяцев в исследовании 240 пациентов с впервые диагностированной злокачественной глиомой [58].

Даже после хирургического вмешательства и адьювантной терапии опухоли часто рецидивируют. Наиболее часто рецидив локализуется в месте опухоли, что представляет собой рост инфильтрирующих злокачественных клеток, неизбежно остающихся во время хирургической резекции. Эффективной терапии ГБ пока не существует. Стандартные протоколы до сих пор не могут существенно улучшить отрицательный прогноз пациентов [65]. Одно из препятствий, которые необходимо преодолеть для повышения эффективности терапии - существование внутренней самообновляющейся популяции опухолевых стволовых клеток ГБ (ОСК) [66].

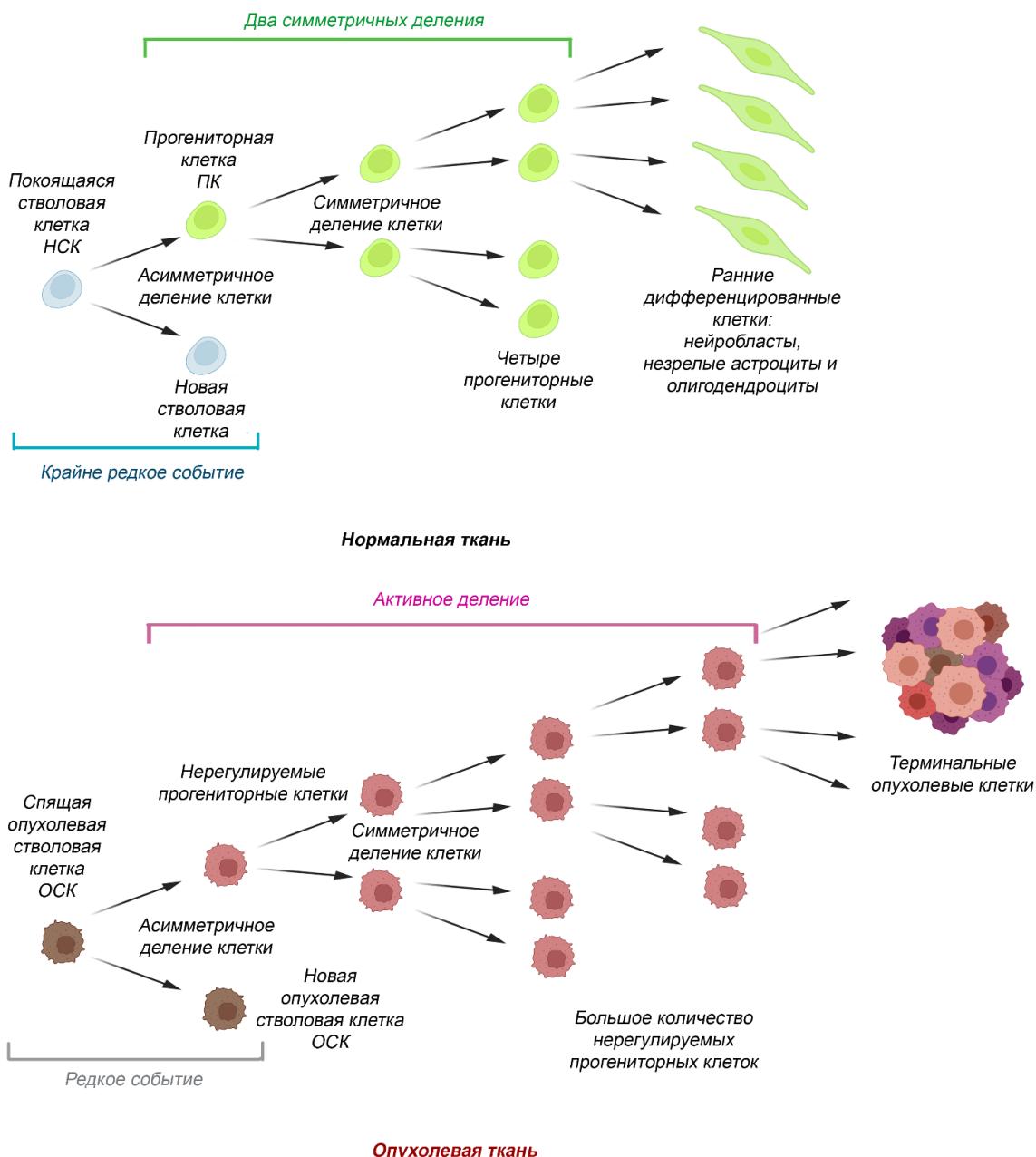


Рисунок 3 - Схема направлений дифференцировки СК и появления ОСК [4]

Так же, как и для нормальных тканей, на клеточном уровне в ГБ для различных типов клеток существует иерархия, возникающая из-за мультинаправленной дифференцировки (рисунок 3). Как нормальная ткань восстанавливается при делении стволовых клеток (СК), ГБ поддерживает долговременный рост с помощью ОСК, способных к aberrantным самообновлению и дифференцировке. ОСК глиомы способны продолжительное время находиться в неактивном состоянии, а при делении вызывать рецидивы [67, 68]. ОСК глиомы персистируют и способны мигрировать в здоровую ткань мозга; при этом они устойчивы к облучению и химическим препаратам [69, 70].

Активно пролиферирующие клетки и ОСК привлекают внимание исследователей со всего мира, поскольку именно возможность воздействия на эти клетки может революционизировать подход к терапии ГБ. Одним из наиболее важных маркеров активно делящихся клеток является receptor эпидермального фактора роста (EGFR), он не только активно исследуется, но и уже успешно используется в качестве терапевтической мишени.

Для глиом разрабатываются и стратегии многофункциональных систем доставки лекарств, нацеленные с помощью молекулярных узнающих элементов [71]. В то время как стандартная терапия ГБ остается неизменной на протяжении почти двух десятилетий, растет число исследований, посвященных изучению терапевтического потенциала иммунотерапии при ГБ [72]. Перспективный современный подход - терапия химерными антигенными receptorами (CAR) Т-клеток - форма адаптивной клеточной терапии, при которой лимфоциты пациента создаются *ex vivo*, чтобы обладать receptorом, обеспечивающим специфическое уничтожение опухоли. CAR Т-клеточная терапия произвела революцию в лечении «жидких» гематологических злокачественных опухолей, таких как неходжкинские лимфомы и множественная миелома. В настоящее время одобрены варианты CAR Т-клеточной терапии, направленные на поверхностные опухолевые антигены - CD19 или BCMA [73]. Особенности ГБ, в том числе гетерогенность опухоли, интрапатоморальная изоляцию лимфоцитов и супрессивное привлечение иммунных клеток, ограниченная инфильтрация внутриопухолевых Т-клеток - могут объяснить ограниченную эффективность традиционных иммунотерапий [74]. В исследовании экспериментальной терапии нацеливания на EGFRvIII [75] при периферическом введении CAR Т-клетки инфильтрировали в центральную нервную систему (ЦНС) и приводили к ограниченному объективному ответу, который авторы объясняли короткой продолжительностью контроля опухоли и ослаблением действия CAR Т-клеток.

В настоящее время проводится ряд перспективных испытаний CAR Т-клеток для лечения глиомы. Исследователи из Детской больницы Сиэтла объявили об испытании Т-клеток направленных на EGFR при различных злокачественных новообразованиях детской ЦНС, включая глиому [76]. Недавно эта команда также объявила о создании четырехвалентного CAR Т-клеточного продукта, направленного на B7-H3, EGFR, HER2 и IL-13R α 2, - амбициозная стратегия, позволяющая преодолеть гетерогенность опухоли [77].

Многочисленные исследования изучали эффективность таргетной терапии против множества молекул, которые, как считается, способствуют росту и выживанию опухоли, таких как EGFR, PDGF, mTOR, PI3K, PKC, с-Met, ферменты гистондеацетилазы, TGF β , интегрины и тубулин, и это лишь некоторые из них [78]. Иммунотерапия представляет собой растущую область интереса в лечении злокачественных глиом, направлена на использование иммунной системы для уничтожения опухолевых клеток.

Вакциновые терапии, такие как риндопепимут (Rindopepimut (CDX-110)), состоящий из пептида, кодируемого мутантным вариантом EGFR, обычно встречающимся в глиобластоме, который затем конъюгируется с белком-носителем для усиления иммуногенности, используются для стимуляции иммунного ответа против опухолевых клеток, несущих ассоциированную мутацию [79].

Существует множество антител для терапии ГБ, например терапевтические антитела к EGFR, цетуксимаб [80]. В настоящее время ведутся клинические исследования антител, применяемых для некоторых типов опухолей, включая ГБ [81]. Для терапии ГБ созданы токсичные конъюгаты терапевтических антител к EGFR, которые в настоящее время проходят клинические испытания [82]. Агентство Министерства здравоохранения и социальных служб США (FDA) одобрило несколько терапевтических антител для лечения других видов онкологии [83], в числе которых ниволумаб и пембролизумаб (блокирующие антитела к рецептору программируемой смерти PD-1). Несмотря на ограничения полноразмерных антител - низкую локализацию, проникновение и накопление в опухоли, иммунотерапии интенсивно развивается [84]. Для преодоления ограничений антител, разрабатываются альтернативные МУзЭли, например такие, как «скаффолды» [85]. Бевацизумаб, гуманизированное моноклональное антитело против сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), исследовался при лечении глиобластомы, которая известна своей выраженной васкуляризацией. Несмотря на все эти многообещающие новые разработки, многие исследования таргетной терапии и иммунотерапии до сих пор показали ограниченную эффективность при лечении злокачественной глиомы.

По мере того, как становится все больше известно о молекулярных и генетических изменениях, лежащих в основе злокачественных глиом, и их патогенезе, растет интерес к методам лечения, которые непосредственно нацелены на изменения и пути, которые считаются критическими для прогрессирования опухоли, например, дифференцировочная терапия [86]. Данный подход включает остановку пролиферации клеток с помощью G-квадруплекса с последующей дифференцировкой ОСК до

термиально-дифференцированного состояния нейронов с помощью коктейля химических агентов.

Таким образом, разработка новых терапевтических подходов ГБ остается актуальной задачей. Успехи применения моноклональных антител позволяют предполагать, что по мере перехода к персонализированной медицине применение и других молекулярных узнавающих элементов биомаркеров ГБ будет эффективным. Аптамеры, «химические антитела» на основе нуклеиновых кислот, представляют собой перспективное решение, позволяющее решить проблемы, связанные с воспроизводимостью синтеза, размером, стабильностью и иммуногенностью антител [87, 88]. Аптамеры активно используются в исследованиях и разработке в качестве противоопухолевых агентов, наиболее перспективными направлениями представляются применение аптамеров для выявления циркулирующих опухолевых клеток, картирования тканей и адресной доставки лекарства к определенным клеткам [65, 89].

В качестве мишени для доставки терапевтических препаратов в опухолевые клетки могут выступать биомаркеры опухоли, или онкомаркеры.

1.3 Маркер пролиферации EGFR³

Рецепторы тирозинкиназы (TK) семейства EGFR регулируют важнейшие клеточные функции, включая пролиферацию, выживание, миграцию и дифференцировку, и, по-видимому, играют центральную роль в этиологии и прогрессии солидных опухолей головного мозга [90]. В литературе также встречаются и другие названия EGFR, а именно Her1 или ErbB1, что обусловлено его принадлежностью к семейству трансмембранных рецепторных тирозинкиназ ErbB.

В структуре белка EGFR выделяют внеклеточный N-концевой лиганд-связывающий домен, включающий домены I–IV (1–621 аминокислотные остатки, а.к.о.), трансмембранный домен (622–644 а.к.о.), внутриклеточный домен с тирозинкиназной активностью (645–960 а.к.о.) и С-концевой домен (961–1186 а.к.о.) (рисунок 4) [91]. Существует множество различных лигандов для EGFR [92], например эпидермальный фактор роста (EGF), а также такие белки как гепарин-связывающий EGF (HB-EGF), трансформирующий фактор роста альфа (TGF- α), нейрорегулин-1 (NRG1), амфирегулин (AR) и некоторые другие. Наиболее распространёнными

³ При подготовке данного раздела диссертации использованы публикации [2, 5], выполненные в соавторстве и указанные во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

лигандами для EGFR является эпидермальный фактор роста (EGF) и трансформирующий фактор роста α (TGF- α).

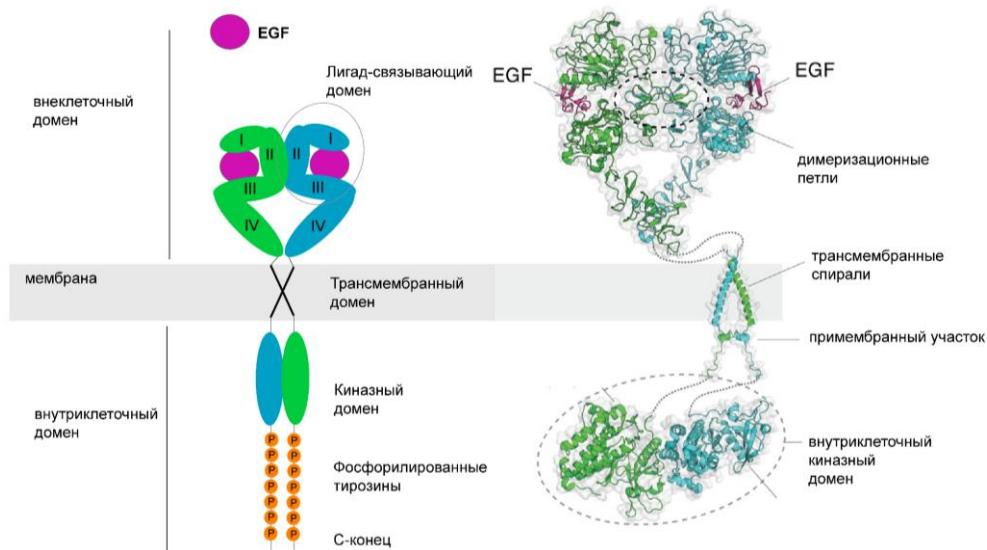


Рисунок 4 - Структура 2:2 комплекса EGFR с его лигандом EGF. Слева - схема лиганд-связанного димеризованного EGFR [адаптировано из 91]

После связывания лиганда с внеклеточным доменом рецептора EGFR, происходит гомо- или гетеродимеризация (с использованием другого рецептора EGF-семейства). Димеризация внеклеточных областей EGFR вызывает дополнительные конформационные изменения цитоплазматических областей EGFR, что позволяет киназным доменам двух молекул EGFR изменить конформацию [93, 94]. Активированные лигандом EGFR в димере транс-автофосфорилируются по остаткам тирозина в цитоплазматическом домене рецептора. Фосфорилированные тирозины служат сайтами связывания сигнальных трансдукторов и активаторов внутриклеточных субстратов, которые затем стимулируют внутриклеточные каскады передачи сигнала, участвующие в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки и выживания (рисунок 5) [95].

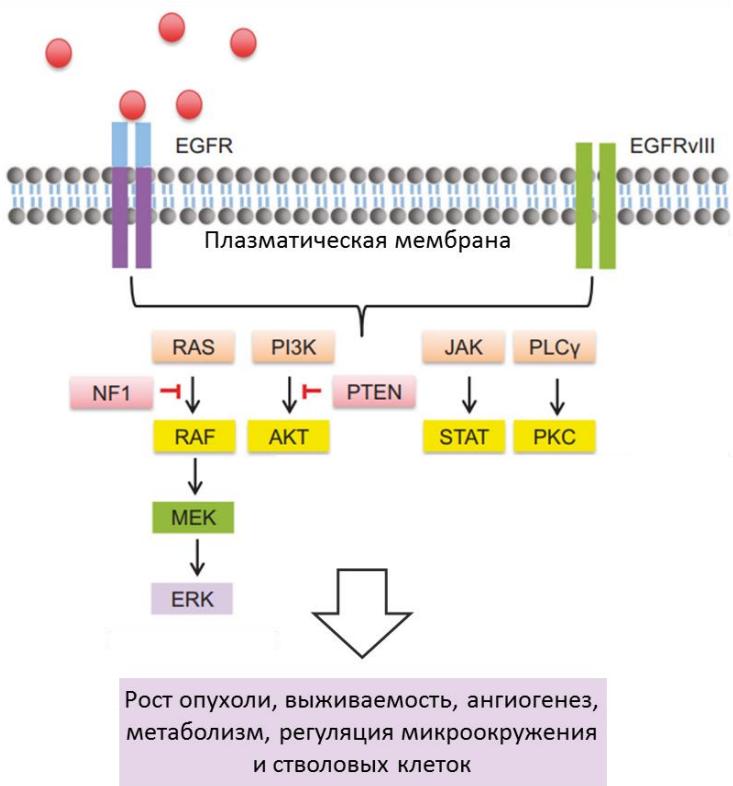


Рисунок 5 - Классические тирозинкиназные сигнальные пути, опосредованные EGFR и EGFRvIII: RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT, JAK/STAT и PKC; RAS – белок вируса саркомы крыс, RAF – серин/треониновая киназа семейства MAP3K, MEK – киназа митоген-активируемой протеинкиназы, ERK – киназа, регулируемая внеклеточным сигналом, NF1 – нейрофиброму 1; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа, AKT – протеинкиназа B, PTEN – гомолог фосфатазы и тензина; JAK – янус-киназа, STAT – сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции; PLC γ – фосфолипаза С гамма, PKC – протеинкиназа С [из 96]

Уровень экспрессии EGFR варьирует от тысяч молекул на клетку в здоровых клетках до миллионов молекул на клетку в некоторых линиях опухолевых клеток [97-99]. Сверхэкспрессия EGFR часто наблюдается в глиомах, где она ассоциируется с плохим прогнозом [90]. Клетки глиобластомы с высокой представленностью EGFR устойчивы *in vitro* к лучевой терапии [100]. Все вышесказанное делает EGFR привлекательной мишенью в терапии злокачественных опухолей.

На сегодняшний день низкомолекулярные ингибиторы ТК, например, эрлотиниб (erlotinib), гефитиниб (gefitinib) - широко исследованы для терапии глиом высокой степени злокачественности [101-102]. Эрлотиниб и гефитиниб имеют молекулярную массу немногим больше 400 Да, что является верхней границей для проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Низкомолекулярные ингибиторы нарушают киназную активность EGFR, связываясь в кармане аденоzinтрифосфата (АТФ) каталитического домена рецептора. В клинических испытаниях эрлотиниба медиана общей выживаемости составила 6,9 месяцев, но у всех пациентов наблюдалось

прогрессирование заболевания на фоне приема препарата [102]. Низкомолекулярные ингибиторы ТК демонстрировали крайне высокую токсичность и не используются в качестве монотерапии.

Для выявления EGFR на поверхности клеток/опухолей и подавления пролиферации EGFR-положительных клеток в терапии глиобластомы обычно используются моноклональные антитела и их производные [81]. Одним из способов ингибирования EGFR-зависимой передачи сигнала является блокирование связывания активирующего лиганда с рецептором. Получено несколько специфических антител к внеклеточному домену EGFR, исследовано их терапевтическое применение для глиом с высокой степенью злокачественности. Одним из EGFR-специфических антител является цетуксимаб (Erbstat, ImClone Systems Inc. и Merck KGaA). В доклинических исследованиях системное воздействие цетуксимабом изучали с использованием интрапараситарных и экстракраниальных моделей ксенотрансплантатов с высокой экспрессией EGFR глиобластомы человека [103]. Повышенная гибель клеток и снижение пролиферации были обнаружены как для интрапараситарных, так и для экстракраниальных ксенотрансплантатов, однако эффекты в экстракраниальных ксенотрансплантатах были выражены больше. Следовательно, несмотря на снижение эффекта, антитела цетуксимаб способны проникать через ГЭБ (или его нарушения при онкологии), что позволяет продолжать исследования в этом направлении.

Наиболее распространенным мутантом EGFR, часто представленном в опухолях ГБ, считается вариант EGFRvIII (de2-7EGFR или Δ EGFR) (Рисунок 6), у которого отсутствует фрагмент внеклеточной части рецептора (остатки 6-273, экзоны 2-7). Мутация в гене, приводящая к появлению варианта EGFRvIII, приводит к делеции 2-7 экзонов гена EGFR, что приводит к потере 267 аминокислот во внеклеточном домене EGFRvIII, отвечающем за связывание рецептора с его лигандами (Рисунок 6). В результате мутации в клетке экспрессируется белок EGFRvIII, постоянно находящийся в активной форме. Сигнальные пути, опосредованные EGFRvIII, повторяют те, которые запускаются димеризацией EGFR дикого типа (EGFRwt), однако в случае EGFRvIII для запуска сигнала не требуется присутствия лиганда EGF и других факторов роста.

Вариант EGFRvIII экспрессируется в глиомах, немелкоклеточных карциномах легких и карциномах молочной железы, причем было показано, что сверхэкспрессия EGFRvIII в опухолях пациентов разительно ухудшает прогноз выживаемости [104]. Мутация EGFRvIII не встречается в здоровых тканях, однако обнаруживается у примерно половины пациентов с глиобластомой при повышенной амплификации гена

EGFR. С помощью количественного цитофлуориметрического анализа клеток, полученных из биоптатов глиомы человека, было показано, что количество молекул EGFRvIII может достигать нескольких сотен тысяч копий на клетку [105].

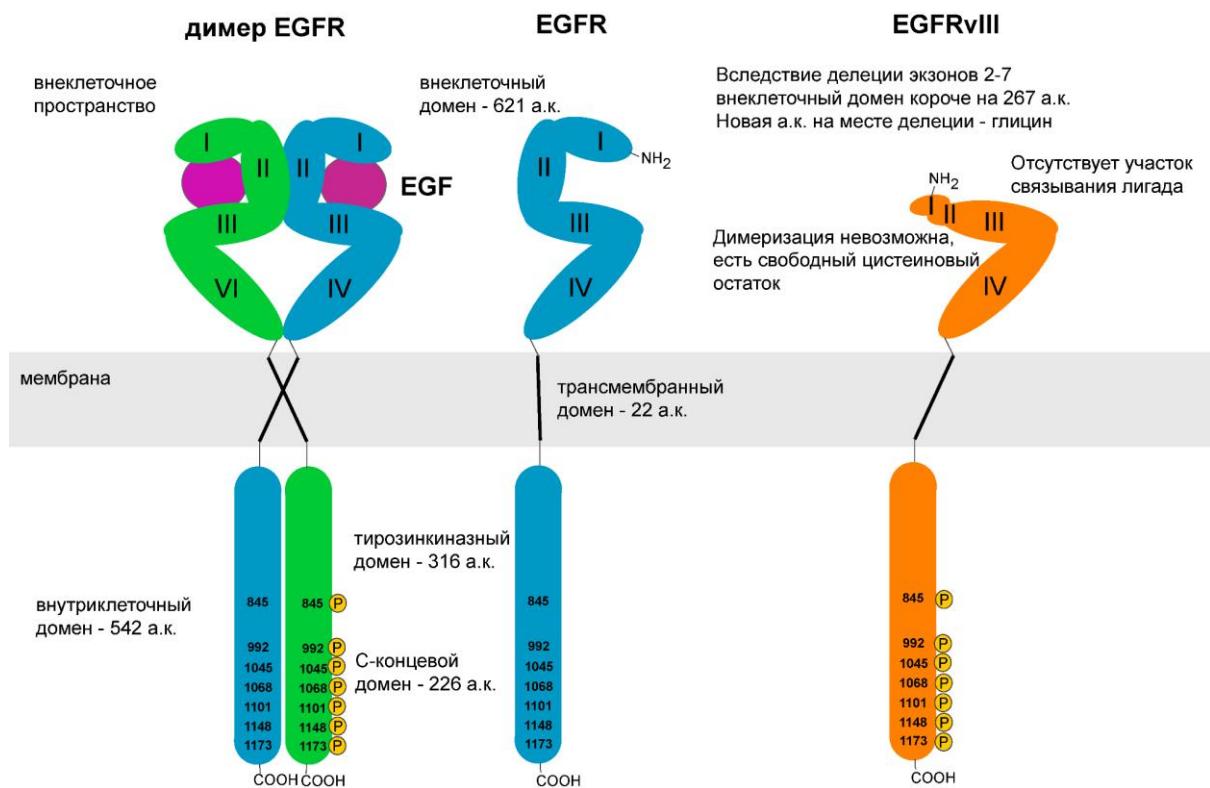


Рисунок 6 - Схематические структуры димера и мономера EGFR и варианта EGFRvIII. По сравнению с EGFR, в EGFRvIII делетированы экзоны 2-7, что приводит к укорочению внеклеточного домена и вставке нового остатка глицина в месте соединения. EGFRvIII не может связывать ни один из известных лигандов полноразмерного рецептора, не может димеризоваться; трансмембранныя и внутриклеточная области сохраняются, передача сигнала посредством autofосфорилирования тирозинов внутриклеточной части в случае EGFRvIII активна постоянно

Мутант EGFRvIII способен запускать каскады сигналов через классические для рецепторных тирозинкиназ пути, например, путь RAS/MAPK/ERK, путь PI3K/AKT и путь JAK/STAT, которые ведут к пролиферации клеток [106]. Было показано, что EGFRvIII влияет на уровень экспрессии генов матриксных металлопротеаз, таких как MMP-1 и MMP-13, которые в свою очередь разрушают внеклеточный матрикс и вызывают ангиогенез и инвазию опухоли (рисунок 7) [107].

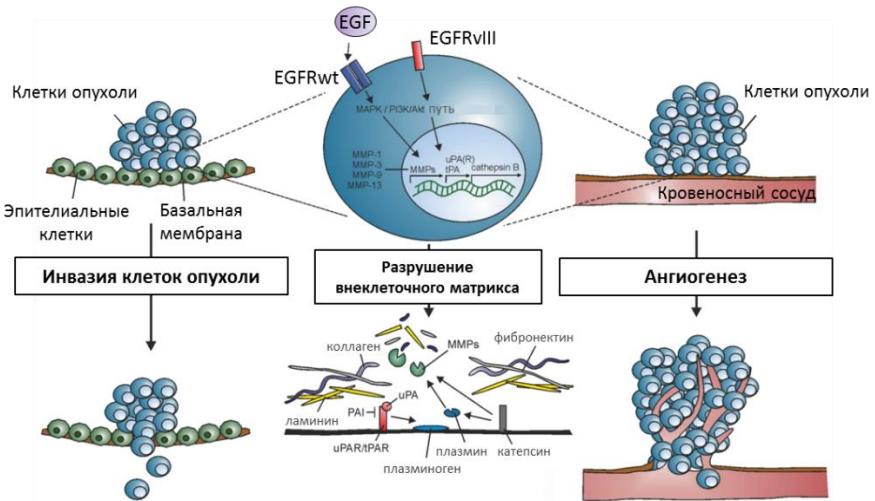


Рисунок 7 - EGFRvIII запускает процессы протеолиза внеклеточного матрикса за счёт активации экспрессии матриксных металлопротеаз (MMPs), что приводит к деградации компонентов базальной мембранны и способствует инвазии опухолевых клеток в окружающие ткани и росту кровеносных сосудов [107]

Мутация EGFRvIII является активной и наблюдается примерно в 50% случаев ГБ с высокой экспрессией EGFR (примерно четверть от общего числа случаев ГБ) [105]. Для терапии опухолей со сверхэкспрессией EGFR/EGFRvIII используется предложен новый, весьма перспективный подход, развивающийся компанией AbbVie, который заключается в использовании коньюгата антитела к EGFRvIII с токсином [82]. Депатуксизумаб (депатукс, ранее ABT-806) - гуманизированное рекомбинантное мышиное моноклональное антитело, первоначально созданное против EGFRvIII, хотя оно связывается и с EGFRwt при сверхэкспрессии. Связывание рецептора EGFRwt происходит при активации рецептора лигандом, тогда эпитоп EGFR становится доступным для депатуксизумаба. Коньюгат антитело-лекарство (ADC) депатуксизумаб мафодотин (депатукс-м, ранее ABT-414) содержит депатукс, ковалентно связанный с цитотоксическим агентом, в качестве которого использован токсин, воздействующий на микротрубочки - монометил ауристатин F (MMAF, мафодотин) [82]. После связывания с активированным EGFRwt или EGFRvIII антитело и связанный с ним токсин эндоцитируют и деградируют в кислой среде эндосом, высвобождая токсин, вызывающий гибель клеток. Таким образом, прямой цитотоксический эффект депатуксизумаба мафодотина не зависит от ингибирования EGFR-сигнала что приводит к снижению токсических эффектов, характерных для низкомолекулярных ингибиторов EGFR или моноклональных антител, связывающихся с неамплифицированным рецептором дикого типа в нормальных органах [82].

Доставка через гематоэнцефалический барьер и распределение в ткани больших молекул с высокими значениями молекулярной массы, таких как антитела,

представляет собой серьезное препятствие для эффективной терапии опухолей мозга. Достаточные терапевтические концентрации антител часто не достижимы, даже когда терапевтические агенты вводятся во время операции в месте резекции опухоли. Разработка анти-EGFR узнающих элементов с относительно невысокой молекулярной массой, структуру и свойства которых можно менять по желанию экспериментатора для создания эффективных терапевтических агентов ГБ остается актуальной. В качестве таких узнающих онкомаркер EGFR и его мутантный вариант EGFRvIII элементов могут выступить аптамеры – синтетические короткие одноцепочечные олигонуклеотиды, которые специфично и высокоаффинно связываются с заданными мишениями. Преимуществом аптамеров по сравнению с моноклональными антителами является их неиммуногенность, термостабильность, а также более низкая стоимость их получения. Аптамеры синтезируют химически, что позволяет конъюгировать их с различными метками и токсинами на этапе синтеза.

1.4 Анти-EGFR аптамеры⁴

В случае маркера EGFR задача по отбору аптамеров оказывается значительно проще, в силу возможности работы с отдельным внеклеточным доменом белка. В литературе описаны анти-EGFR РНК-аптамер [15], РНК-аптамеры, содержащие 2'-дезокси-2'-фторпиримидиновые нуклеозиды (2'F-РуР-РНК) [17, 108-110], и ДНК-аптамеры [111-113] с различными функциональными свойствами (таблица 2).

Пионерские исследования по селекции РНК-аптамеров к EGFR и изучению их свойств были проведены группой Эллингтона [15]. РНК-аптамер J18 длиной 104 нуклеотида (нт) к внеклеточному домену EGFR был получен в результате 12 раундов селекции с использованием отбора к иммобилизованному на магнитных шариках рекомбинантному внеклеточному домену EGFR из библиотеки РНК с длинным рандомизированным участком (62 нт). Аптамер J18 связывался с мишенью с кажущейся константой диссоциации $K_D \sim 7$ нМ [15], при этом он не взаимодействовал ни с мышьим EGFR, ни с родственным белком того же семейства hErbB2 (Her2/neu). Аптамер J18 связывался с нативным рецептором на мембране клеток эпидермоальной карциномы человека А431. Эти клетки содержат чрезвычайно большое количество рецептора на клеточной поверхности - 1-3 млн. молекул на клетку [2], поэтому часто используются для тестирования взаимодействия с EGFR. Связывание J18 с клетками

⁴При подготовке данного раздела диссертации использована публикация [2], выполненная в соавторстве и указанная во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

A431 ингибиравалось терапевтическими антителами к EGFR (цетуксимаб, Mab 225, C225), и блокировалось 10-ти кратным избытком человеческого эпидермального фактора роста EGF (но не мышиным EGF) [15], что дает основания предполагать сходство эпитопов связывания РНК-аптамера J18 и EGF на белке EGFR.

В связи с высокой чувствительностью РНК-аптамера J18 к гидролизу, следующий отбор к EGFR был проведен той же командой с использованием библиотеки 2'F-Pyr-РНК-олигонуклеотидов [17], ферментативный синтез 2'F-Pyr-РНК проводили с использованием модифицированной Т7-РНК-полимеразы, способной включать в растущую цепь РНК 2'-дезокси-2'-фторуридин- и 2'-дезокси-2'-фторцитидинтрифосфаты. Необходимость введения модификации в 2'-положение сахара пиримидиновых нуклеотидов для предотвращения деградации РНК-аптамеров в биологических жидкостях является существенным недостатком 2'F-Pyr-РНК-аптамеров, так как значительно повышает стоимость синтеза таких аптамеров. Введение фторидного заместителя в 2'-положение сахара пиримидин нуклеотидов позволяет повысить стабильность РНК-аптамеров, ингибируя ферментативную деградацию панкреатическими нуклеазами. Такая модификация не приводит к изменению геометрии двутяжевых участков, 2'F-Pyr-РНК формируют двуцепочечную спираль с теми же геометрическими параметрами, что и незамещенные РНК, однако степень гидратации оболочки 2'F-Pyr-РНК заметно снижена [114, 115].

Селекцию 2'F-Pyr-РНК аптамера проводили против рекомбинантного химерного белка - внеклеточного домена рецептора (L25-S645), слитого с Fc-фрагментом IgG1 (P100-K330) через пептидный линкер IEGRMD. После первичной селекции авторами был отобран лидерный аптамер E01, который демонстрировал взаимодействие с константным доменом антитела. Из E01 синтезировали новую сокращенную 2'F-Pyr-РНК-библиотеку, в последовательности исходного E01 рандомизировали 30% нуклеотидов. В результате второго этапа селекции из сокращенной библиотеки были получены высокоаффинные 2'F-Pyr-РНК-аптамеры E03, E04, E07, длиной 93-нт, для лидера аптамера E07 кажущаяся константа диссоциации с рекомбинантным доменом EGFR человека aK_D составляла 2,4 нМ [17]. Флуоресцентную метку в аптамер E07 вводили при помощи следующего подхода: удлиненный на 24 нуклеотида (якорная последовательность) на 3'-конце 2'F-Pyr-РНК-аптамер E07 был гибридизован с комплементарным ДНК-олигонуклеотидным зондом длиной 24-нт, меченного 6-карбоксифлуоресцеином (FAM) в течение 10 мин при 70°C. Для введения стрептавидин-конъюгированного флуорофора - фикоэритрина (PE) авторы использовали зонд, модифицированный биотином. Аптамер E07 взаимодействовал с

клетками A431; эффективность internalизации aptамера внутрь клеток была значительной, 23% E07 было internalизовано, по сравнению с 28% для антител cetuximab и 71% для EGF. Aptамер E07 ингибировал активацию EGFR-зависимого каскада фосфорилирования на клетках A431 (инициированного добавлением EGF в концентрации 2 нМ) с $IC_{50} = 300$ нМ, против $IC_{max} = 100$ нМ для антител cetuximab [17], что свидетельствовало о близко расположенных или перекрывающихся эпитопах на поверхности белка EGFR для aptамера E07 и антител cetuximab. Aptамер E07 и его производные использовались для изучения пролиферации и миграции клеток [116], а также для выделения положительных по EGFR клеток [117].

Современные направления исследований анти-EGFR aptамеров весьма разнообразны. Одним из них является минимизация вышеописанных 2'F-Pyr-RHK-aptамеров серии E, например, создание короткого aptамера ME07 длиной 47-нт [108]. Аффинность ME07 к рекомбинантному внеклеточному домену EGFR, измеренная методом интерферометрии биослоев, была чрезвычайно высокой, $K_D = 0,3$ нМ. Константа диссоциации комплекса aptамера ME07 с мутантным вариантом рекомбинантного рецептора EGFRvIII была в 1000 раз выше, $K_D = 300$ нМ [108], что соответствует отсутствию участка взаимодействия aptамера ME07, как и его родительского варианта E07 в сплайс-варианте EGFRvIII.

Одним из первых отобранных aptамеров к мутантному варианту EGFRvIII, экспрессированному в клетках *E.Coli*, была группа 2'F-Pyr-RHK-aptамеров [109], длиной 80 нт. Данная работа не получила развития в дальнейшем, возможно, в силу относительно высоких значений констант диссоциации комплексов aptамер-мутантный вариант рецептора EGFRvIII, значения составляли 30-60 нМ.

Модифицированный 2'F-Pyr-RHK-aptамер CL4 был отобран к клеткам с высокой экспрессией EGFR, а именно к клеткам линии adenокарциномы легкого A549 [110]. В результате селекции был получен 2'F-Pyr-RHK-aptамер длиной 92 нт, при его укорочении до 39 нуклеотидов был получен короткий анти-EGFR aptамер CL4, связывавший рекомбинантный EGFR [110].

Анти-EGFR ДНК-aptамеры TuTu22, TuTu21, TuTu20, TuTu19 отобраны к рекомбинантному внеклеточному домену EGFR человека. Длина aptамеров составляла 76 нуклеотидов, а константы диссоциации комплексов aptамер-белок имели заметно более высокие значения, по сравнению с RHK- и 2'F-Pyr-RHK-aptамерами, значения констант диссоциации были в диапазоне 50- 100 нМ [111].

Группы ДНК-aptамеров были отобраны к трансфицированным клеткам U87MG с высокой экспрессией мутантного варианта рецептора EGFRvIII [112, 113]. Aptамеры

32/71, 43/88, 22/41, 47/13 имели длину 73 нуклеотида [112]. Для этих аптамеров аффинность определяли к клеткам U87MG, опубликованные количественные параметры аффинности были около 100 нМ [112]. ДНК-аптамеры U2, U8, U19 и U31 проявляют более высокую аффинность к мутантному варианту рецептора EGFRvIII [113]. Было показано, что аптамер U31 из данного семейства, несмотря на изначальный отбор к клеткам, экспрессирующим мутантный рецептор EGFRvIII, связывает рекомбинантный внеклеточный домен полноразмерного EGFR с высокой аффинностью, кажущаяся константа диссоциации комплекса аптамер-белок составляла 3.7 нМ [118]. При укорочении аптамера U31 с учетом образования возможных вторичных структур удалось получить короткий аптамер GR20 длиной 46-нт, который высокоаффинно связывал и полноразмерный EGFR и его мутантный вариант EGFRvIII [118].

Совершенно другой подход был выбран для сокращения нуклеотидной последовательности анти-EGFR аптамера U2 до короткого варианта G011 [119, 120]. За основу была взята наиболее вероятная вторичная структура исходного аптамера, структурированные участки стабилизированы заменой А-Т-пар на пары Г-С, таким образом, при значительном изменении первичной последовательности в данном случае сохранялись элементы вторичной анти-EGFR аптамера, что приводило к сохранению узнавания клеток анти-EGFR аптамером G011 с радиофармацевтической меткой [119, 120].

Таблица 1 - Список известных нуклеотидных последовательностей аптамеров к EGFR и мутантному рецептору EGFRvIII

N	Шифр	Тип, длина	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	K _D *, нМ	Ссылка
1	E03	2'F- Пур- РНК 92 нт	rGrGfCrGfCfUfCfCrGrAfCfCfUfUrArGfUfCfUfCfU rGfUrGfCfUrArGfUrAfUrAfUfCrGfCrAfCrGrGrAfU fUfUrArAfUfCrGfCfCrGfUrArGrArArArGfCfUrG fUfCrArArArGfCfCrGrGrArAfCfCrGfUrGfUrArGfC rACrArGfCrArGrA	3	[17]
2	E04	2'F- Пур РНК 92 нт	rGrGfCrGfCfUfCfCrGrAfCfCfUfUrArGfUfCfUfCfU rGfUrGfCfCrGfCfCrAfUrAfUfCrAfCrGrGrAfU fUfUrArAfUfCrGfCfCrGfUrArGrArArArGfCrAfU rGfUfCrArArArGfCfCrGrGrArAfCfCrGfUrGfUrArG fCrAfCrArGfCrArGrA	2.6	[17]
3	E07	2'F- Пур- РНК	rGrGfCrGfCfUfCfCrGrAfCfCfUfUrArGfUfCfUfCfU rGfUrGfCfCrGfCfUrAfUrArAfUfCrAfCrGrGrAfU fUfUrArAfUfCrGfCfCrGfUrArGrArArArGfCrAfU	2.4	[17]

		92 нт	rGfUfCrArArArGfCfCrGrArAfCfCrGfUrGfUrArG fCrAfCrArGfCrArGrA		
4	ME07	2F-Pyr-PHK 48 нт	rGrGrAfCrGrGrAfUfUfUrArAfUfCrGfCfCrGfUrArGrAr ArArArGfCrAfUrGfUfCrArArArGfCfCrGrGrArAfCfCrG fUfCfC	0.3 (EGFR) 273 (EGFRvIII)	[108]
5	J18	PHK 104 нт	rGrGrCrGrCrUrCrCrGrArCrCrUrUrGrUrCrUrGrC rArArGrArUrArArArCrCrGrUrGrCrUrArUrUrGrArCrCr ArCrCrCrUrCrArArCrArCrUrUrArUrU rUrArArUrGrUrArUrUrGrArArCrGrGrArCrCrUrArCrGr ArArCrCrGrUrGrUrArGrCrArCrArGrCrArGrA	7	[15]
6	CL4	2F-Pyr-PHK 39 нт	rGfCfCfUfUrArGfUrArAfCrGfUrGfCfUfUfUrGrAfU rGfUfCrGrAfUfUfCrGrAfCrArGrGrArGrGfC	10	[110]
7	Tutu22	ДНК 76 нт	TACCA GTGCGATGCTCAGTGCCGTTCTTCTCTTT CGCTTTTTTGCTTTGAGCATGCTGACGCATTG GTTGAC	56±7.3	[112]
8	Tutu21	ДНК 76 нт	TACCA GTGCGATGCTCAGCCTACACGCCACCTTT CTTTCTATCCTCTTTACGTGCTGACGCATTGG TTGAC	78	[112]
9	Tutu20	ДНК 76 нт	TACCA GTGCGATGCTCAGTCCTGATGCTCAGTCTT ACTATATACTTCTGCTCGTTGCTGACGCATTG GTTGAC	85	[112]
10	Tutu19	ДНК 76 нт	TACCA GTGCGATGCTCAGACCA GAGTTCAACATCCT CTCTTTCTTCTCTCTTCGCTGACGCATTGG TTGAC	74	[112]
11	E17	2F-Pyr-PHK 80 нт	rGrGrArGrGrAfCrGrAfUrGfCrGrGrAfCfCrArArArAf UfCrArAfCrGfCrArArArGrArGfCrGfCrGfCfCfU rGfCrAfCrGfUfCrAfCfCfUfCrAfCrArGrAfCrGrAfCfUfC rGfCfUrGrArGrGrAfUfCfCrGrArGrA	50 (EGFRvIII)	[109]
12	E27	2F-Pyr-PHK 80 нт	rGrGrArGrGrAfCrGrAfUrGfCrGrGrGfCfCrArGfCrAf UfCfCfCrGrAfCfUrGrGrGfCfUfCfCfCfUfCrGrA fUrArAfCrGrArGfUrGfCfCrGfCrArGrArGfCrGrAfCr fUfCrGfCfUrGrArGrGrAfUfCfCrGrArGrA	57 (EGFRvIII)	[109]

13	E21	2'F- Пур- РНК 80 нт	rGrGrGrArGrGrAfCrGrAfUrGfCrGrGfUrAfCfCrArArGr AfUfCfCfCrAfCrArAfCfUrArGfCfCrGrAfCfCrAfCrArAf UfUrGfCfCrGrGfCfCrAfCrArGrAfCrGrAfCf fCrGfCfUrGrArGrAfUfCfCrGrArGrA	33 (EGFRvIII)	[109]
14	32/71	ДНК, 73 нт	GCAATGGTACGGTACTTCCTGAATGTTGTTTTCT TCTTTCTATAGTACAAAAGTGCACGCTACTTGC TAA	<100 (EGFRvIII)	[111]
15	43/88	ДНК, 73 нт	GCAATGGTACGGTACTTCCTGTACAGCTTG TGATGTGGATGCGAACTGCAAAAGTGCACG CTACTTGCTAA	<100 (EGFRvIII)	[111]
16	22/41	ДНК, 73 нт	GCAATGGTACGGTACTTCCTTTGTTGTTT TTTCTGTATTATCGATCAAAAGTGCACGC TACTTGCTAA	<100 (EGFRvIII)	[111]
17	47/13	ДНК, 73 нт	GCAATGGTACGGTACTTCCTCTATTCAATGT TTAATTGTGATTGTACAAAAGTGCACGC TACTTGCTAA	<100 (EGFRvIII)	[111]
18	U2	ДНК, 76 нт	ATCCAGAGTGACGCAGCATTTGACGCTTT ATCCTTTCTTATGGCGGGATAGTTCGTGG ACACGGTGGCTTAGT	3.3 (EGFRvIII)	[113]
19	U8	ДНК, 76 нт	ATCCAGAGTGACGCAGCATGAATCTTTCTT TTGGTTTGATATTATAGTTGGTGAATGGA CACGGTGGCTTAGT	4.3 (EGFRvIII)	[113]
20	U19	ДНК, 76 нт	ATCCAGAGTGACGCAGCATTTGTATCCTATT TTGTTATGTAATTGTCGTTGATCATGTGGA CACGGTGGCTTAGT	78 (EGFRvIII)	[113]
21	U31	ДНК, 76 нт	ATCCAGAGTGACGCAGCATTTGTTAACATAT GTTTTTAATTCCCCTGTGGTGTGTTGTGG ACACGGTGGCTTAGT	8 (EGFRvIII) 0.73±0.02 (EGFRvIII) 3,7±0,7 (EGFR)	[113, 118]
22	GR20	ДНК, 46 нт	ACGCACCATTGTTAACATATGTTTTAACATTCCCCT TGTGGTGTGT	5±2 (EGFR) 1.35±0.06 (EGFRvIII)	[118]
23	Gol1	ДНК, 49 нт	GCCGGCATTGACGCCGCCGGCTGCTTATGCT CCGGGGCATATGGC	-	[119, 120]

Таким образом, в литературе описано два десятка анти-EGFR аптамеров различной химической природы и длины. Все анти-EGFR аптамеры представляют собой высокоаффинные агенты. Однако остается открытым вопрос, как среди представленных анти-EGFR аптамеров выбрать подходящие кандидаты для

трансляции в клиническое применение. Сравнительный анализ этих аптамеров затруднен в связи с отсутствием единообразного метода оценки аффинности анти-EGFR аптамеров, более того, даже полученные одним и тем же методом количественные характеристики аффинности к белку различаются на порядки. Более сложным оказывается вопрос о взаимодействии опубликованных анти-EGFR аптамеров с клетками.

1.5 Опухолевый маркер CD133⁵

Маркер CD133, также называемый проминином-1, считается перспективным прогностическим биомаркером для широкого спектра типов опухолей. Впервые CD133 был идентифицирован четверть века назад в двух независимых исследованиях мышиных нейроэпителиальных (НЭ) клеток и гемопоэтических стволовых клеток (СК) человека [121, 122]. Маркер CD133 впервые обнаружили в нейроэпителии, в том числе эпендимального слоя мозга. Маркер CD133 детектировали на выступах плазматической мембраны, таких как филоподии, ламеллоподии и микрошипы, но и специфичен для апикальной поверхности, где он избирательно ассоциирован с микроворсинками и структурами, связанными с микроворсинками. Как предполагают, CD133 позволяет доставлять мембранные белки на микроворсинки эпителиальных клеток и на выступы плазматической мембраны нейроэпителиальных клеток и/или удерживаться в них, а не на плоской поверхности клетки [121]. Тогда же *CD133 (проминин-1)* получил название, которое происходит от латинского слова "prominere", означающего выступать. Маркер CD133 присутствует в гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток костного мозга и крови [122].

CD133 обладает удивительной субклеточной локализацией. Недавние исследования выявили возможность ядерной локализации CD133 [123]. CD133 является интегральным белком плазматической мембраны, однако обнаруживается и внутри клетки, в том числе в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи, где происходит его созревание и гликозилирование [124]. Установлено, что гликопротеин CD133 на плазматической мемbrane находится в специализированных липидных микродоменах, богатых холестерином и сфинголипидами, т.е. в липидных рафтах [125]. Недавно описано участие CD133 в асимметричном делении клеток, CD133 транспортируется в центросому и ингибирует аутофагию, более того, локализованный

⁵ При подготовке данного раздела диссертации использованы публикации [1, 4], выполненные в соавторстве и указанные во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

в центросоме CD133 поддерживает опухолевые клетки в недифференцированном состоянии [126].

Известно, что ген проминина-1 человека занимает 152 т.п.н. на хромосоме 4 и содержит не менее 37 экзонов [127]. Транскрипция проминина-1 осуществляется пятью тканеспецифичными альтернативными промоторами, что приводит к образованию различных сплайсированных изоформ мРНК [128]. Идентифицировано несколько сплайс-вариантов проминина-1 с альтернативными цитоплазматическими С-концами [128]. Белок CD133 имеет молекулярную массу ~115/120 кДа и состоит из 850-865 аминокислот. N-концевой участок длиной 89 а.к. и два больших неструктурированных внеклеточных участка длиной 255 и 285 а.к. этой молекулы расположены вне клетки, а С-концевой участок и две малые петли - в цитоплазме [129] (рисунок 8, 9). В целом, CD133 - холестерин-связывающий гликопротеин, специфически расположенный на выступах плазматической мембраны клетки.

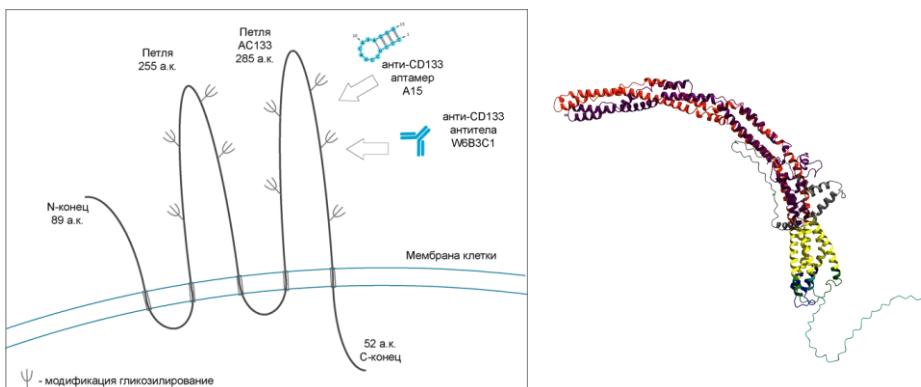


Рисунок 8 - А - Схема структуры CD133, участки возможных модификаций и участки связывания коммерческих антител [адаптировано из 130];

Б - Модель трехмерной структуры CD133 на базе аминокислотной последовательности, полученная с помощью AlphaFold3 [131]; серый - N-концевой участок, оранжевый и фиолетовый - внеклеточные петли, желтый - трансмембранные домены, синий и зеленый - внутриклеточные домены, бирюзовый - С-концевой участок

В опухоли присутствуют клетки, подобные стволовым – опухолевые стволовые клетки (ОСК). Эти клетки представляют особый интерес в связи с их способностью к самообновлению и инициированию опухолевого роста [132], что приводит к рецидивам [133]. Химиотерапевтические препараты и лучевая терапия сами по себе оказываются неэффективны для уничтожения ОСК. Поэтому обнаружение и таргетная терапия ОСК может рассматриваться в качестве перспективной терапевтической стратегии. Первым шагом в разработке терапии, направленной на ОСК, является их идентификация, далее - нацеливание на них. Поиск надежных биомаркеров ГБ

необходим для эффективной терапии и достижения более благоприятных исходов. В этом отношении маркер CD133 привлекает значительное внимание [4, 122, 134, 135].

CD133 экспрессируется в различных типах СК, но неизвестно, играет ли белок существенную роль в ключевых функциональных характеристиках СК: способностью к самообновлению и мультипотентной дифференцировке. В последние два десятилетия исследования показали, что ОСК присутствуют во многих солидных опухолях, в том числе и ГБ [136]. CD133 может служить важным биомаркером, позволяющим детектировать ОСК [137]. Корреляция между высоким уровнем CD133 в опухолевых клетках и негативным прогнозом может быть обусловлена связью CD133 с фенотипом ОСК. Однако совсем недавно было показано, что в яичниках представленность CD133 не связана со стволовыми/прогениторными популяциями клеток, там CD133 маркирует преимущественно мультицитиарные клетки с низкой генеративной способностью [138].

CD133 связан с сигнальными путями Wnt и Notch, что может влиять на пролиферацию клеток [139, 140]. Для опухолевых клеток показано, что CD133 ингибирует апоптоз и повышает уровень FLIP, что вызывает резистентность к химиотерапии [141], что является одним из свойств ОСК.

Таким образом, CD133-репрезентирующие клетки соответствуют типу ОСК, следовательно, возможность тераностики глиом с использованием МУзЭлей к CD133 представляется актуальной задачей.

В качестве узнавающих элементов для маркера CD133 можно использовать антитела (таблица 2). Первые разработанные антитела к CD133 - AC133 и AC141 распознают различные эпитопы гликозилированного CD133 (комерчески доступны как CD133/1 и CD133/2 антитела, соответственно) [142]. Комерчески доступны анти-CD133 антитела, отличные от AC133 и AC141, которые нацелены на немодифицированные внеклеточные эпитопы CD133. Предприняты попытки выделить антитела к CD133 посредством иммунизации мышей целыми трансфицированными CD133-экспрессирующими человеческими клетками [143]. Хотя использование этих антител для выделения CD133-позитивных клеток в литературе не описано, они могут быть пригодны для решения задачи детекции ОСК.

Таблица 2 - Характеристики коммерчески доступных антител к CD133

№	Шифр антител	Иммуноген/ участок узнавания, номера аминокислот соответствуют полноразмерному CD133 (1-865 а.к.)	Применение (FC - ПЦФ, WB - вестерн-блот, IHC - иммуноhistохимия)	Производитель
1	AC141 (CD133/2)	участок во внеклеточной петле 508-792 а.к.	FC	Miltenyi Biotec
2	AC133 (CD133/1)	участок во внеклеточной петле 179-433 а.к.	FC	Miltenyi Biotec
3	17A6.1	N-концевой участок 1-89 а.к. с GST-тагом	IHC, WB	Millipore
4	5E3	полноразмерный рекомбинантный CD133 человека	WB	Invitrogen
5	2F8C5 (MA1-219)	пептид 20-108 а.к. с His-тагом (экспрессированный в <i>E.Coli</i>)	WB, IHC, FC	Invitrogen, Millipore
6	BLR093G	участок 350-400 а.к. рекомбинантного CD133 человека	WB, IHC	Invitrogen
7	13A4	полноразмерный рекомбинантный CD133 человека	WB, IHC, FC	Invitrogen, Millipore
8	W6B3C1	AC133/1, эпитоп 1, участок во внеклеточной петле 179-433 а.к.	FC	Elabioscience, Millipore, Miltenyi Biotec
9	293C3	AC133/1, эпитоп 1, участок во внеклеточной петле 179-433 а.к.	FC	Millipore, Miltenyi Biotec
10	D2V8Q	Не чувствительно к статусу гликозилирования CD133	IHC, WB, IF	Cell Signaling Tech
11	D4W4N	полноразмерный рекомбинантный CD133 человека, не чувствительно к статусу гликозилирования CD133	WB, IHC	Cell Signaling Tech
12	A3G6K	полноразмерный рекомбинантный CD133 человека	WB	Cell Signaling Tech
13	A8N6N	не указан	FC	Cell Signaling Tech

Известно, что узнавание антителами маркера CD133, в особенности эпитопа AC133, очень сильно зависит от статуса клетки (флип-флоп петли AC133 внутрь

мембранны или альтернативное гликозилирование этой петли, маскирующее ее для узнавания антителами) [144]. К клеткам, экспрессирующим CD133, были отобраны и описаны аптамеры.

1.6 Анти-CD133 аптамеры⁶

Отбор аптамеров к мишениям на поверхности клетки можно проводить в соответствии с двумя глобальными стратегиями: используя в качестве мишени белок – классический подход, или отбирая аптамеры к целым клеткам – так называемый клеточный SELEX (cell-SELEX). Отбор известных анти-CD133 аптамеров был проведен клетках, сверхэкспрессирующих CD133. Этот метод сложен и имеет существенные ограничения: состав клеточной мембранны усложняет взаимодействие аптамеров с мембранными белками клеток [145], не говоря уже о проблемах, связанных с эндоцитозом. Подход, использующий анти-CD133 сомамеры позволил провести мета-анализ белков, ассоциированных с CD133 и вовлеченных в нейрональную дифференцировку [146].

Сравнение свойств уже открытых аптамеров крайне важно. Аптамерный консорциум работает над рекомендациями по унификации методов исследования перспективных терапевтических аптамеров [147]. Первые попытки сравнения аптамеров, отобранных в разных селекциях, были предприняты ранее на примере аптамеров к трансферриновому рецептору [148]. Валидация аптамеров остается крайне важной. Проточная цитометрия является предпочтительным методом для изучения взаимодействия аптамеров с клетками. Кроме того, для исследований опухолей крайне важно использовать адекватные модели для тестирования, в нашем случае исследовано взаимодействие аптамеров с уникальными перевиваемыми культурами клеток ГБ пациентов. Стоит отметить, что применение аптамеров в биомедицине строго ограничивает условия эксперимента, например, исключает наличие дополнительных конкурирующих агентов, в отличие от исследований связывания аптамеров с их мишенью, которые сосредоточены на измерении аффинности и специфичности [145, 147].

В литературе описан ряд анти-CD133 аптамеров, отобранных к клеткам, экспрессирующим CD133. Нуклеотидные последовательности, длины и мишени отбора для SELEX, а также аффинность некоторых аптамеров приведены в таблице 3.

⁶ При подготовке данного раздела диссертации использована публикация [1], выполненная в соавторстве и указанная во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

В строгом смысле, ни для одного из приведенных анти-CD133 аптамеров не показано прямое взаимодействие с белком CD133. Однако, для каждого отобранного анти-CD133 аптамера при селекции проводилось сравнение взаимодействия с CD133-положительными и CD133-отрицательными клетками.

Среди 2'F-Pyr-RНК-аптамеров следует в первую очередь выделить аптамеры A15 и B19, которые представляют собой РНК-аптамеры, содержащие 2'-дезокси- 2'-фторпиримидиновые нуклеозиды [149]. Аптамер A15 является самым коротким анти-CD133 2'F-Pyr-RНК-аптамером и состоит всего из 15 нуклеотидов, что облегчает его проникновение в опухолевые ткани [149]. Аптамер A15 был получен путём укорочения исходно отобранного к CD133 аптамера CD133-A, состоящего из 81 нуклеотида. Предполагаемая вторичная структура A15 содержит шпильку, стабилизированную всего четырьмя парами нуклеотидов. В той же работе описан отбор и пост-селекционный дизайн аптамера CD133-B, посредством укорочения которого был получен 2'F-Pyr-RНК-аптамер B19, состоящий из 19 нуклеотидов [149]. Его возможная вторичная структура стабилизована пятью парами нуклеотидов.

Таблица 3 - Характеристики опубликованных анти-CD133 аптамеров

Название аптамера	Длина, нт	Тип НК	Мишень отбора, тип клеток	Нуклеотидная последовательность	Аффинность: мишень, параметр аффинности	Ссылка
A15	15	2'FY-PHK	трансфицированные HEK293T	CCCUCCUACAUAGGG	K_d (HT-29) $82,3 \pm 82,9$ нМ K_d (Hep3B) $33,9 \pm 12,5$ нМ K_d (HEK293T) >1000 нМ K_d (T98G) >1000 нМ	[149, 150]
B19	19	2'FY-PHK	трансфицированные HEK293T	CAGAACGUUAUCAUUUCUG	K_d (HT-29) $145,1 \pm 75,4$ нМ K_d (Hep3B) $52,3 \pm 15,8$ нМ K_d (HEK293T) >1000 нМ K_d (T98G) >1000 нМ	[149]
Cs1	58	ДНК	трансфицированные CHO-K1	ATTGCACCACAGATTGTTATTAT TTAGTTTATCTCCTAGTTAGAT AGTAAGTGCAAT	K_d (CD133+ CHO-K1) $156,3 \pm 64,8$ нМ узнавание HCT116, HT29, HCT8, GIST882, A549, MCF7 нет связывания с CHO-K1	[151]
Cs5	51	ДНК	трансфицированные CHO-K1	TTACATCGAGTGGCTTATAAAG TAGGCGTAGGGCTAGGCAGGAGA GATGTAA	K_d (CD133+ CHO-K1) $16,3 \pm 6,8$ нМ узнавание HCT116, HT29, HCT8, GIST882, A549, MCF7 нет связывания с CHO-K1	[151]
Cs53	43	ДНК	пост-селекционный дизайн Cs5	ACACTATCATGGAGTGATATCTT TCTTGATAGATAGTAAGTGC	K_d (CD133+ CHO-K1) $134,0 \pm 24,1$ нМ узнавание HCT116, HT29, HCT8, GIST882, A549, MCF7 нет связывания с CHO-K1	[151]
Ap1	76	ДНК	трансфицированные HEK293T	TACCA GTGCGATGCTCAGTTCCC GGTT CGCC CGCGCACCGTTTCCCC GGAGGGTCACCCCTGACGCATT CGGTTGAC	K_d (FRO) 287.6 nM	[152]
Ap1M	48	ДНК	дизайн Ap1	TACCA GTGCCGTTCCCCGGAG GGTCACCCCTGACGCATT CGGTT GAC	K_d (FRO) 101.4 nM узнает CD133+HEK293T, Caco-2, FRO нет связывания с HEK293T, Nthy-ori3-1	[152]
Ap2	76	ДНК	трансфицированные HEK293T	TACCA GTGCGATGCTCAGGTGT GCGCCGCCCCGGCGTCCCCGAC CAATGCTATGCCACTGACGCA TTCGGTTGAC	узнает CD133+ HEK293T нет связывания с HEK293T	[152]
ApC1	72	ДНК	Caco-2	AGTGAGTGTAGTGCTCGCGGGC ACAATTTCGTTAGTCTTCCTTTA ATCGGCCATGGAAGGTCTGATG TGGC	узнает Caco-2 нет связывания с HEK293T, HeLa, MCF-7, HL-60, and NB4	[153]

Анти-CD133 2'F-Pyr-PHK-аптамер A15 специфически связывается с тем же эпитопом, что и моноклональные антитела AC133, по данным конкурентного связывания, тогда как 2'F-Pyr-PHK-аптамер B19 связывается с другим участком белка CD133, поскольку не конкурирует с антителами AC133 [149]. Как было указано выше, предполагается, что гликозилирование белка CD133 может приводить к маскировке эпитопов связывания антител. Аналогичная проблема может возникнуть и при использовании аптамеров. Однако на данный момент не выявлены случаи

маскирования внеклеточного домена, с которым связывается 2'F-Pyr-RНК-аптамер B19. Поэтому предполагается, что именно аптамер B19 может обеспечить более достоверные результаты при детекции белка CD133. Было показано, что 2'F-Pyr-RНК-аптамеры A15 и B19 с высокой специфичностью связываются с CD133-экспрессирующими линиями клеток колоректальной карциномы человека HT-29 и гепатоцеллюлярной карциномы человека Нер3В и не связываются с CD133-отрицательными линиями клеток: эмбриональными клетками почки HEK293T и клетками линии ГБ человека T98G [149]. При этом константы диссоциации, полученные для взаимодействия аптамера B19 с клетками HT-29 и Нер3В примерно в 1,5-2 раза превосходят значения, полученные для аптамера A15, что свидетельствует о более высокой аффинности последнего в условиях связывания в присутствии 0,1 мг/мл конкурирующей ДНК тимуса теленка и 0,1 мг/мл транспортной РНК при 4°C в течение 30 мин (таблица 3) [149].

В литературе описаны ДНК-аптамеры, отобранные к CD133-экспрессирующими клеткам. Аптамеры Ap1 и Ap2 связывали CD133-экспрессирующие клетки Caco-2 [152]. При этом ДНК-аптамер Ap1 продемонстрировал эффективное связывание не только с клетками колоректальной adenокарциномы Caco-2, но и с клетками рака щитовидной железы FRO, экспрессирующими CD133. Исходя из возможностей образования вторичной структуры, аптамер Ap1 был укорочен авторами оригинальной статьи, в результате чего был получен короткий вариант аптамера Ap1M [152]. Короткий аптамер Ap1M демонстрировал более высокую аффинность к CD133-экспрессирующими клеткам FRO, чем исходный аптамер Ap1, что было подтверждено уменьшением константы диссоциации, определенной при инкубации аптамеров с клетками при 37°C в течение 30 мин (таблица 3). При укорочении Ap1M сохранена часть исходного аптамера Ap1, ответственная за взаимодействие аптамера Ap1M с CD133-положительными клетками. В работе также описано применение комплекса удлиненного аптамера Ap1M (добавлен участок с нуклеотидной последовательностью (GC)₂₀) с доксорубицином (ДОКСО), который в экспериментах *in vivo* значительно ингибировал рост и ангиогенез опухоли из клеток НСТ116, ксенотранспланта в мыши, в то время как аптамер Ap1M сам по себе не оказывал заметного эффекта подавления опухоли [152]. Нужно отметить, что авторам указанной работы удалось в экспериментах на клетках показать направленную доставку ДОКСО с помощью удлиненного аптамера Ap1M к CD133-положительным клеткам, токсичность комплекса для клеток НСТ116 была выше, чем для CD133-отрицательных клеток HEK293T [152].

Селекция ДНК-аптамеров к трансфицированным CD133 клеткам СНО-K1 позволила получить аптамеры C1, C5 и C53, укорочением которых исходя из их предполагаемой вторичной структуры по данным Mfold получены аптамеры Cs1, Cs5 и Cs53, соответственно [151]. С помощью проточной цитометрии для них было показано связывание с различными клетками, экспрессирующими CD133, и отсутствие взаимодействия с контрольными, не экспрессирующими CD133 клетками СНО-K1 (таблица 2). Согласно константам диссоциации, рассчитанным на основании взаимодействия аптамеров с CD133-трансфицированными клетками CD133+ СНО-K1, аптамер Cs1 связывался с клетками с кажущейся константой диссоциации комплекса аптамер-клетка CD133+ СНО-K1 160 нМ, в то время как наилучшей аффинностью к CD133+ СНО-K1 обладает аптамер Cs5, константа диссоциации комплекса аптамер-клетка для него составляла 16 нМ [151]. В ходе конкурентного эксперимента на клетках НСТ116 с использованием кроличьих моноклональных антител к CD133 и аптамера Cs5 было показано, что увеличение количества добавленного аптамера Cs5 приводило к снижению узнавания антителами клеток НСТ116. Было выдвинуто предположение о том, что аптамер Cs5 и использованные авторами антитела к CD133 могут иметь один и тот же сайт связывания, однако информации, какой именно был использован клон моноклональных антител к CD133 для данного эксперимента, авторы не приводят [151].

Отбором к клеткам Сасо-2 был получен аптамер ApC1 [153]. Среди различных олигонуклеотидов, отобранных вместе с ApC1, последний характеризовался наибольшей стабильностью возможной структуры, и именно его первичная последовательность демонстрировала наибольшее обогащение в ходе отбора. Методом проточной цитофлуориметрии было показано, что аптамер ApC1 узнает клетки колоректальной аденокарциномы человека Сасо-2. Согласно результатам конфокальной микроскопии аптамер ApC1 связывается с клеточной мембраной Сасо-2, но не с клетками НЕК293, не экспрессирующими белок CD133. ДНК-аптамер ApC1 специфически internalизировался в клетки Сасо-2, приводя к появлению сигнала флуоресценции в цитоплазме клеток [153].

CD133 является важным маркёром клеток опухоли ГБ. Сложность его детекции связана, как правило, с малым количеством CD133 экспрессирующих клеток в опухоли, с существованием нескольких альтернативных форм сплайсинга белка, различиями в профилях гликозилирования, а также с присутствием помимо трансмембранный формы CD133 в клетках внутриклеточных форм белка. Перспективным инструментом для детекции CD133 являются аптамеры. Несмотря на

многообразие данных об анти-CD133 аптамерах, невозможно достоверно сравнивать эффективность узнавания маркера CD133 аптамерами и оценивать применимость аптамеров для детекции CD133 на клетках ГБ.

1.7 Заключение

Стандартный способ терапии ГБ (протокол Струппа) не меняется уже двадцать лет. Очевидна необходимость разработки новых подходов для терапии глиом. Перспективной считается разработка направленного воздействия на опухолевые клетки. Прогресс в исследовании опухолевых биомаркеров открывает возможности для появления новых агентов направленной доставки, для диагностики опухоли и ее терапии. Аптамеры могут служить эффективными МУзЭлями для тераностики глиом.

Исследование аптамеров для тераностики клеток глиом подразумевает ряд определенных шагов.

Так как аптамеры представляют собой короткие олигонуклеотиды, за счет трехмерной организации связывающих свои мишени, то интересным представляется вопрос о возможности формирования такой структуры. Установление точной структуры аптамера - предмет отдельного сложного и трудоемкого исследования. Доступным для реализации и информативным может оказаться сравнение возможностей образования вторичных структур на основе известных нуклеотидных последовательностей.

Следующим шагом служит сравнение аптамеров по аффинности к мишени, рекомбинантному белку, однако такое исследование возможно провести только для случая, когда белок-мишень может быть выделен.

Более сложными представляются взаимодействия аптамера с мишенью на поверхности клетки, узнавание экспрессирующих мишень клеток аптамерами. Такое исследование обязательно для публикации отобранных аптамеров, однако стандартных протоколов для описания взаимодействия аптамеров с клетками нет. Очевидны различия в аффинности аптамеров к мишени самой по себе и в составе клетки.

Описанные выше шаги как правило выполняются в каждом исследовании вновь отобранных аптамеров, но сравнение опубликованных аптамеров провести просто невозможно.

Далее для целей аптатераностики важно тестировать взаимодействие аптамеров с моделями перевиваемых клеток глиом, которые, будучи гетерогенной системой, представляют собой более сложный случай, нежели стандартные линейные клетки. Понимание характера взаимодействия аптамеров с мишенью, в контексте общих

закономерностей поведения олигонуклеотидов на различных уровнях необходимо для использования аптамеров для тераностики.

Цель настоящей работы - анализ возможностей аптамеров для тераностики глиом применительно к двум функционально и структурно различным маркерам: EGFR и CD133. Для этого необходимо исследовать возможности структурной организации молекул анти-EGFR и анти-CD133 аптамеров, определить аффинности к рекомбинантному белку и как аптамеры взаимодействуют с мишениями на стандартных линиях клеток и перевиваемых клеточных культурах, оценить возможности аптамеров для доставки терапевтического агента в клетки глиом. Исследование аптамеров различных селекционных семейств к различным биомаркерам не проводилось, и настоящая работа призвана закрыть этот пробел.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Реагенты и материалы

Реактивы. Для приготовления всех буферных растворов использовали деионизованную воду mQ (Millipore, Франция). Для приготовления некоторых буферов использовали: хлорид натрия NaCl (Serva, Германия), хлорид калия KCl (Serva, Германия), хлорид магния MgCl₂ (Хеликон, Россия), Tris-HCl (Хеликон, Россия). Буфер PBS готовили из таблеток для растворения (Merck, США). Доводили pH буферных растворов 5 M NaOH (Хеликон, Россия), концентрированной HCl (Реахим, Россия). Используемый бычий сывороточный альбумин (БСА) был получен от компании Хеликон, Россия.

Антитела. Антитела APC Anti-Human CD133 Antibody, Clone No W6B3C1, E-AB-F1268E (изотип - мышиный Ab IgG1, конъюгированный с аллофикацианином, APC) для проточной цитометрии были приобретены в компании Elabscience Biotechnology Inc (США). ДНК лосося была приобретена у Sigma-Aldrich (США), перед использованием подвергнута ультразвуковой обработке. Дрожжевая тРНК была приобретена у Invitrogen (США).

В экспериментах использовались коммерчески доступные рекомбинантные белки: внеклеточный домен рецептора эпидерmalного фактора роста EGFR человека (кат. номер 1095-ER-002, R&D Systems, США), а также коктейль ингибиторов протеаз Halt (кат. номер 78430, Thermo Scientific, США). В раствор для регенерации стрептавидиновых сенсоров входил этаноламин гидрохлорид (Acros Organics, Бельгия).

Для фиксации клеток использовался 3,7% параформальдегид (pure, pharma grade; AppliChem, Германия), окраска ядер осуществлялась красителем DAPI (4',6-диамидин-2-фенилиндол) (кат. номер G1012-10ML, Servicebio, Бельгия).

Буферные растворы.

Используемый в работе Tris-HCl буферный раствор имел состав: 20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7,4.

При работе с растворами рекомбинантных белков использовали буферный раствор 5 mM Tris-HCl, pH 7, 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,05 обёмн.% Tween 20, 1 мг/мл БСА.

Фосфатный буферный раствор (PBS) имел состав 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4, 136 mM NaCl, 3 mM KCl.

Используемый для разведения аптамеров фосфатный буферный раствор с добавлением катионов магния ($\text{PBS} + \text{Mg}^{2+}$) имел следующий состав 8 мМ Na_2HPO_4 , 1,5 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4, 136 мМ NaCl , 3 мМ KCl , 5 мМ MgCl_2 .

Аптамеры. Нуклеотидные последовательности аптамеров приведены в таблице 5. В работе использованы коммерческие аптамеры от компаний ООО «ГенТерра», ООО «Люмипроб», Москва, Россия, очищенные с помощью электрофореза в поликариламидном геле. Для интерферометрии биослоев использовали аптамеры, содержащие биотиновую метку на 5'-конце нуклеотидной последовательности. В исследованиях методами проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии использовали FAM- и Cy5-флуоресцентно меченные аптамеры, метка была введена на 5'-конец нуклеотидной последовательности. Лиофилизированные аптамеры растворяли в дейонизированной воде mQ, и их стоковая концентрация составила 100 мкМ. Модифицированные 2'F-Рур-РНК-аптамеры с флуоресцентными метками FAM или Cy5 были получены от компании Синтол (Россия), меченные биотиновой меткой 2'F-Рур-РНК-аптамеры получены от ООО «ГенТерра» (Россия).

Таблица 3 - Характеристики используемых олигонуклеотидов

Шифр	Химическая природа	Метка	Последовательность 5'→3'	Длина, нуклеотидов
NARO	2'F-Рур-РНК	Биотин Cy5	rGrGfCfCfUfUrGrAfUrGfUfCrGrAfUfUfCrGr AfCrArGrGrArGrGfCfC	28
U2s	ДНК	Биотин	CGCAGCATTGACGCTTTATCCTTT CTTATGGCGGGATAGTTCGTG	49
GR20h	ДНК		ACGCACCATTGTTAATATGTTTTAA TTCCCTTGTGGTGTGTTTGTTGGT CCTAAATG	66
hArm = h	ДНК	Биотин	CATTTAGGACCAACACAA	18
anti-hArm	ДНК	Биотин	TTATGTTGGTCCTAAATG	18
dT20	ДНК	Cy5	TTTTTTTTTTTTTTTTTT	20

2.2 Фолдинг аптамеров

Перед проведением всех исследований растворы аптамеров преформировали в течение 10 минут при температуре 95°C, после чего медленно охлаждали до комнатной температуры.

2.3 Анализ возможной вторичной структуры аптамеров

Предсказание возможных вторичных структур проводили с помощью доступных онлайн-сервисов RNAfold и ViennaRNA, использующих модель минимальной свободной энергии MFE (от англ. Minimum Free Energy) [21]. Полученные структуры визуализировали с использованием программы VARNA. Выравнивание последовательностей укороченных аптамеров с исходными аптамерами проводили с помощью программы CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment.

2.4 Спектроскопия ^1H ЯМР

Эксперименты регистрации спектров протонного магнитного резонанса (^1H ЯМР) выполнены совместно с совместно с лабораторией магнитной томографии и спектроскопии (Факультет фундаментальной медицины МГУ) и отделом структуры и функций рибонуклеиновых кислот научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского и Центром коллективного пользования Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (ЦКП ИОХ РАН).

Образцы исследуемых аптамеров концентрацией от 250 до 510 мМ объёмом 550 мкл в фосфатном буфере на основе бидистиллированной H_2O и D_2O в соотношении 9:1 помещали в стеклянную пробирку для ЯМР (Duran, Германия) и преформировали, как описано выше в пункте «Олигонуклеотиды», с той лишь разницей, что охлаждали сразу до 0 °C.

Спектры регистрировали с помощью спектрометров «Bruker AVANCE III HD 300» и «Bruker AVANCE III 400» (300,1 и 400,1 МГц для ^1H , соответственно) от фирмы Bruker (США). В качестве внутреннего стандарта измерений химических сдвигов ^1H ЯМР использовали 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфонат натрия. Протонные ^1H спектры образцов в H_2O и D_2O в соотношении 9:1 регистрировали при температуре от +5 до +7 °C с использованием градиента импульсного поля для подавления сигнала от H_2O . Для всех экспериментов использовали задержку релаксации ~1 с и время сбора данных ~1,35 с.

Эксперименты плавления ^1H ЯМР выполняли на приборе Bruker Advance (600 MHz, Bruker, Billerica, MA, США) и спектрометре Varian VXR-400 (400 MHz, Varian, Berkeley, CA, США). Спектр ^1H ЯМР образца исследуемого аптамера концентрацией

488 мкМ объёмом 550 мкл в фосфатном буфере регистрировали в температурном диапазоне 5 - 60°C, в качестве внутреннего референсного стандарта использовали тетраметилсилан (TMS).

Первичные данные ^1H ЯМР были обработаны при помощи программного обеспечения «Bruker TopSpin 3.6» (Bruker, США). Для коррекции базовой линии в области спектра иминовых протонов математическим способом использовали алгоритм многоточечной коррекции базовой линии при помощи программного обеспечения «MestReNova» (Mestrelab, Испания).

2.5 Эксклюзионная хроматография

Растворы аптамера GR20, удлиненного аптамера GR20h самого по себе и совместно с коротким олигонуклеотидом hArm для анализа комплекса готовили в буфере Tris-HCl с добавлением 50 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, концентрация олигонуклеотида в растворе составляла 1 ОЕ (оптическую единицу).

Эксклюзионную ВЭЖХ проводили с помощью ВЭЖХ-системы Agilent Technologies 1200 с автоматической инжекцией образца и диодно-матричным детектором (Agilent Technologies, США): разделение проводили на хроматографической колонке TSKgel G2000SWXL длиной 30 см, диаметр частиц 5 мкм, средний диаметр пор 12,5 нм (Tosoh Bioscience, США), при температуре 25 °C, скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Подвижная фаза состояла из воды и ацетонитрила в соотношении 9:1 об/об, дополненных калий-fosфатным буфером (60 мМ KH₂PO₄ и 140 мМ K₂HPO₄, pH 6,85). Поглощение олигонуклеотидов регистрировали при 260 нм с шириной полосы 10 нм.

2.6 Спектрофотометрическое плавление

Для спектрофотометрических исследований раствор аптамера готовили в буфере Tris-HCl с добавлением 50 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂. Концентрация олигонуклеотидов варьировалась в диапазоне 5-15 мкМ. Спектрофотометрические кривые плавления образцов олигонуклеотидов регистрировали в термостатируемых кварцевых кюветах (Hellma, Германия) с длиной оптического пути 10 на двухлучевом УФ/видимом спектрофотометре Hitachi U-2900 (Hitachi, Япония), оснащенном термоэлектрическим контроллером SPR-10. Конформационные изменения регистрировались в интервале от 20 до 90°C при длине волны 260 нм. Скорость нагрева составляла 0,5°C/мин.

2.7 Интерферометрия биослоев

Измерения интерферометрии биокомплексов проводили при помощи системы анализа межмолекулярных взаимодействий Octet R2 (Sartorius, Германия) на базе программного обеспечения Data Acquisition с использованием покрытых стрептавидином биосенсоров SA (ForteBio, США).

Для экспериментов методом интерферометрии биокомплексов концентрация 2'F-Рур-РНК- и ДНК-аптамеров с биотиновой меткой составляла 2 мкМ в буфере Tris-HCl, pH 7,4. Рекомбинантный внеклеточный домен человеческого рецептора эпидермального фактора роста EGFR (Cloud-Clone Corp., Китай) растворяли в охлажденном буфере PBS с добавлением 1 объёмн.% ингибитора протеаз Halt и 30 объёмн.% глицерина, максимальная концентрация белка составила 102,4 нМ, последующие концентрации получались последовательными разведениями в 2 раза в буфере PBS до концентраций: 51,2 нМ, 25,6 нМ, 12,8 нМ, 6,4 нМ, 3,2 нМ, 1,6 нМ и 0,8 нМ. Для регенерации сенсоров использовался 1 М раствор этианоламина pH 8,5. Биосенсоры SA гидратировали в PBS в течение 10 мин, затем на 10 мин помещали в раствор биотинилированного аптамера для иммобилизации аптамера. Контрольные сенсоры на этом этапе помещали в буферный раствор. Далее сенсор отмывали от несвязавшегося аптамера в буфере в течение 60 с. Программа детекции сигнала интерферометрии биослоев включала: базовую линию в PBS, 60 с; стадию ассоциации в растворе белка в PBS – 360 с; стадию диссоциации в PBS – 180 с. Регенерация сенсора производилась трехкратным погружением сенсора на 5 с в раствор этианоламина гидрохлорида и в PBS на 5 с.

Обработку сенсограмм, полученных методом интерферометрии биослоёв проводили с помощью программы OriginPro 2020 в соответствии с моделью связывания Ленгмюра 1:1.

Обработку сенсограмм, полученных методом интерферометрии биослоёв проводили с помощью программы OriginPro 2020 в соответствии с моделью связывания Ленгмюра 1:1.

Для расчёта кинетических констант была использована модель адсорбции Ленгмюра с условием образования бинарного комплекса [154]. Исходя из выбранной модели стадия ассоциации описывалась уравнением:

$$R_t = \frac{R_{max} \cdot [A]}{K_d + [A]} \left(1 - \frac{1}{e^{(k_{on}[A] + k_{off})t}} \right)$$

где R_t – уровень сигнала в режиме реального времени, R_{\max} – максимальный уровень сигнала связывания, $[A]$ – концентрация добавленного в ходе эксперимента белка, K_d – кажущаяся равновесная константа диссоциации комплекса, k_{on} – константа скорости реакции ассоциации, k_{off} – константа скорости реакции диссоциации, t – время, прошедшее с начала эксперимента.

Стадия диссоциации описывалась уравнением:

$$R_t = R_0 e^{-k_{off} t},$$

где R_0 – уровень сигнала в конце стадии ассоциации.

Значения констант скорости ассоциации (k_{on}) и диссоциации (k_{off}) определяли путём аппроксимации сенсограмм экспоненциальными кривыми (BoxLucas1 и Exp2PMod1, OriginPro 2020). Параметры $k_{on} \cdot [A] + k_{off}$ (из экспоненциального уравнения для стадии ассоциации) для каждой сенсограммы наносили на график зависимости от концентрации белка EGFR в растворе, $C_{\text{белка}}$ (нМ). Тангенс угла наклона линейной аппроксимации этого графика для каждого комплекса равен константе скорости ассоциации k_{on} . Кажущаяся равновесная константа диссоциации K_d может быть рассчитана согласно уравнению:

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}},$$

где K_d – кажущаяся равновесная константа диссоциации, k_{off} – константа скорости диссоциации, k_{on} – константа скорости ассоциации.

2.8 Культивирование клеток

В работе использовали стандартные линии клеток эпидермальной аденокарциномы человека A431 (CRL-1555) и глиобластомы человека U87 (HTB-14), люминальной аденокарциномы протоков молочной железы MCF7 (HTB-22) которые были любезно предоставлены сотрудниками Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской Академии Наук. Клетки выращивали с использованием среды DMEM/F12 с пируватом натрия (оба ООО "ПанЭко", Россия), дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS) (Invitrogen, США), 1% HEPES, 1% GlutaMAX и 1% стрептомицина (все Invitrogen, США); при 37°C в атмосфере 5% CO₂, при пассаже клеток использовался 0,05% трипсин-ЭДТА (ООО "ПанЭко", Россия).

Клеточная линия аденокарциномы толстой кишки человека Caco-2 (HTB-37 - ATCC) была получена из НИИ морфологии человека имени А.В. Авцына "Петровского национального исследовательского центра хирургии" (Москва, Российская Федерация). Клетки выращивали в ростовой среде RPMI с пируватом натрия (ООО "ПанЭко", Россия), дополненной 10% FCS (Invitrogen, США), 1% HEPES, 1% GlutaMAX (Invitrogen, США) и 1% стрептомицина (Invitrogen, США); при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Клеточная линия карциномы толстой кишки человека HCT116 (CCL-247 - ATCC) была приобретена в Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия) и любезно предоставлена для исследования сотрудниками Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской Академии Наук. Клетки выращивали с использованием модифицированной среды Дульбекко DMEM (ООО "ПанЭко", Российская Федерация), дополненной 10% FCS (Invitrogen, США), 1% HEPES, 1% GlutaMAX (Invitrogen, США) и 1% стрептомицина (Invitrogen, США); при 37°C в 5% CO₂.

Клетки культур G01, Sus/fP2, 107, 90, выделенные из опухолей пациентов с глиобластомой для проведения исследования любезно предоставлены лабораторией нейрогенетики ФГАУ «НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, с разрешения Комитета по этике Национального медицинского исследовательского Нейрохирургического центра имени Н.Н. Бурденко. Клетки, используемые в эксперименте, культивировали в ростовой среде DMEM/F12 с пируватом натрия с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% раствора HEPES для поддержания pH, 1% GlutaMAX и 1% антибиотика/антимикотика (раствор пенициллина/стрептомицина/амфотерицина). Флаконы с клетками помещали в CO₂-инкубатор, поддерживающий температуру 37°C. Клетки сначала промывали PBS (Invitrogen), а затем трипинсизировали добавлением 1 мл 0,05% раствора трипсина-EDTA (ООО "ПанЭко", Россия). Реакцию трипсина останавливали добавлением 5 мл ростовой среды. Клетки отбирали в пробирку и центрифугировали в течение 5 минут при 1000 об/мин. Далее клетки декантировали и добавляли ним 1 мл свежей ростовой среды, клетки ресусPENDИРОвали, выдерживали в течение 1 часа в ростовой среде для восстановления белковых маркеров на их поверхности.

2.9 Количественный анализ мРНК с помощью кПЦР

Измерение уровней экспрессии генов проводили методом количественной ПЦР (кПЦР) посредством готовых «Наборов реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I R-402» (ООО “Синтол”, Россия) с

использованием амплификатора CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). Реакцию проводили в объеме 25 мкл согласно протоколу набора, смесь прямого и обратного праймеров в концентрации 1,5 мкМ каждого добавляли в объеме 5 мкл. Каждую реакцию повторяли в трех технических репликах. Протокол реакции ПЦР: предварительный прогрев при 95°C - 5 мин, 40 основных циклов: денатурация при 95°C - 10 сек, отжиг и элонгация: 60°C - 30 сек.

Таблица 4 - Нуклеотидные последовательности используемых праймеров

Ген	Нуклеотидная последовательность праймеров	
EGFR	EGFR_F	GTGACCGTTGGGAGTTGATGA
	EGFR_R	GGCTGAGGGAGGCCTCTC
1-CD133	CD133_F	TGGATGCAGAACTTGACAACGT
	CD133_R	ATACCTGCTACGACAGTCGTGGT
2-CD133	Prom-1_F	TTCTTGACCGACTGAGACCCA
	Prom-1_R	TCATGTTCTCCAACGCCTCTT
GAPDH	GAPDH_F	AGATCCCTCCAAAATCAAGTGG
	GAPDH_R	GGCAGAGATGATGACCCTTT
ActB	ACTB_F	TCACCATGGATGATGATATCGC
	ACTB_R	AATCCTTCTGACCCATGCC

2.10 Проточная цитофлуориметрия

К суспензии 2×10^5 клеток в ростовой среде добавляли заранее приготовленные растворы аптамеров, содержащих флуоресцентную метку FAM или Cy5, в буфере с добавлением 10 мМ KCl и 5 мМ MgCl₂. Время инкубации клеток с аптамерами составляло 30 минут, финальная концентрация аптамеров составляла 1 мкМ. Контрольные клетки инкубировали с буфером вместо раствора аптамера. Затем клетки трижды промывали 1 мл PBS, ресуспендировали в 200 мкл буфера, проводили анализ. Анализ проводили на приборе CytoFlex (Beckman Coulter, США), оснащенном лазерами с длиной волны 405, 488 и 635 нм. Собирали и анализировали 30 000 событий с помощью программного обеспечения прибора. Данные проточной цитометрии обрабатывались с помощью FlowJo v10.6.2 (FlowJo LCC, США). Интактные клетки идентифицировали, используя график зависимости FSC-H от SSC-H.

Раствор APC-меченых антител к CD133, разведенный 1:50 в ростовой среде с 10% FCS, инкубировали с клетками в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте, трижды промывали DPBS, 5 мМ MgCl₂, ресуспендировали в 300 мкл DPBS, 5 мМ MgCl₂ и оценивали на проточном цитофлуориметре.

Измерения выполнялись на приборах Accuri C6 (BD Bioscience, США), CytoFlex (Beckman Coulter, Канада), Attune NxT (ThermoFisher Scientific, США), SinoCyte (BioSino, Китай).

Все статистические анализы проводились с использованием программы Statistica 6.1 (StatSoft, США). Для оценки статистической значимости между двумя экспериментальными группами использовался t-тест Стьюдента. Результаты выражены как средние \pm SEM не менее чем в трех независимых экспериментах. Статистически значимым считалось значение P менее 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Анти-EGFR аптамеры

3.1.1 Предполагаемые вторичные структуры анти-EGFR аптамеров⁷

Пост-селекционный дизайн аптамеров нацелен на снижение стоимости их синтеза. С учетом возможностей олигонуклеотидного синтеза рациональным представляется сокращение длины отобранного процедурой SELEX аптамера до длины менее 50 нуклеотидов. При удалении служебных участков отобранного исходного аптамера важно сохранить узнавающий мишень участок. Для формулирования гипотезы о минимальном узнавающем мишень участке аптамера может быть полезным теоретический анализ возможности образования аптамером вторичных структур. Такой подход позволяет рассматривать аптамер как трёхмерный каркас с определенным расположением узнавающих петель.

Из множества известных анти-EGFR аптамеров (таблица 1) на основании предварительных измерений аффинности аптамеров к рекомбинантному EGFR' были выбраны несколько аптамеров для дальнейшего исследования: 2'F-Рур-РНК-аптамеры: ME07 (48 нт) и CL4 (39 нт), ДНК-аптамеры: серия U31 (76 нт), GR20 (46 нт); серия U2 (76 нт), U2s (49 нт), G011 (49 нт) (таблица 5).

Таблица 5 - Исследуемые анти-EGFR аптамеры

Аптамер	Длина, нт	Тип НК	Мишень отбора
E07	93	2'F-Рур-РНК	Рекомбинантный EGFR человека [17]
ME07	48	2'F-Рур-РНК	Рациональный дизайн аптамера E07 [2, 108, 155]
CL4	39	2'F-Рур-РНК	EGFR-экспрессирующие клетки линии A549 [110]
U2	76	ДНК	EGFRvIII-экспрессирующие клетки линии U87-
U31	76	ДНК	EGFRvIII [113]

⁷ При подготовке данного раздела диссертации использована публикация [2], выполненная в соавторстве и указанная во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

GR20	46	ДНК	Рациональный дизайн аптамера U31 [118, 156]
Gol1	49	ДНК	Компьютерный дизайн аптамера U2 [119, 120]

Структурная организация аптамеров может влиять на их функциональную активность. Поэтому установление структуры - один из наименее отработанных, но, тем не менее, важных этапов разработки ДНК и РНК-аптамеров. Специфические формы трехмерной организации ДНК, такие, как G-квадруплексы, i-мотивы, имеют разработанный инструментарий для однозначного экспериментального выявления, который включает, например, спектроскопию кругового дихроизма. Часто встречающиеся шпилечные структуры двухцепочечных ДНК, а также трехмерные структуры РНК-молекул, детектировать экспериментально достаточно сложно. Современное решение указанной проблемы включает биоинформационическое моделирование вторичной структуры ДНК/РНК. Однако необходимо отметить, что, несмотря на большое количество алгоритмов и все возрастающие вычислительные мощности, точные расчеты потенциальных функций макромолекул до настоящего времени невозможны, моделирование включает ряд приближений, позволяющих значительно упростить подбор параметров, отражающих трехмерную организацию молекулы. В настоящей работе для предсказания возможных структур исследуемых 2'FY-РНК- и ДНК-аптамеров были использованы несколько доступных инструментов для анализа фолдинга и гибридизации нуклеиновых кислот, включающих алгоритмы mfold и RNAstructure [20-25].

Аналитический инструментарий по анализу возможных вторичных структур олигонуклеотидов был использован для выявления предполагаемых вторичных структур анти-EGFR аптамеров, что, в свою очередь, послужило основой для дизайна коротких технологических вариантов анти-EGFR аптамеров. Среди успешных примеров реализации предложенного алгоритма, необходимо отметить рациональный дизайн первого анти-EGFR РНК-аптамера J18, описанный в Приложении А1 [3]. На основе выявленных предполагаемых вторичных структур исходного РНК-аптамера J18 длиной 104 нт был предложен вариант J18s, сохраняющий способность взаимодействовать с положительными по EGFR клетками A431.

2'F-Рур-РНК-аптамеры

Нуклеотидные последовательности анти-EGFR 2'F-Pyr-РНК-аптамеров E03, E04, E07 совпадают на 93%. Всего 8 нуклеотидов разнятся для всех трех аптамеров, при этом между каждыми двумя отличие составляет 4-5 нуклеотидов (рисунок 9). Сходство первичной последовательности анализируемых аптамеров при небольшой разнице в

константах диссоциации с белком-мишенью дает основания для предположения сходной структурной организации. Сравнение нуклеотидных последовательностей аптамеров E03, E04, E07 с последовательностью короткого аптамера ME07 показало, что нуклеотидная последовательность короткого 2'F-Pyr-PHK-аптамера ME07 содержится во всех трех анализируемых длинных анти-EGFR 2'F-Pyr-PHK-аптамерах (рисунок 9).

E03	GGCGCUCCGACCUUAGUCUCUGUGCUAGUAUAUCGCACGGAUUUAAUCGCCGUAGAAAAG	60
E04	GGCGCUCCGACCUUAGUCUCUGUGCCGCAUAUCACACGGAUUUAAUCGCCGUAGAAAAG	60
E07	GGCGCUCCGACCUUAGUCUCUGUGCCGCUUAUAUGCACGGAUUUAAUCGCCGUAGAAAAG	60
ME07	-----GGACGGAUUUAAUCGCCGUAGAAAAG	26

E03	CAUGUCAAAGCCCGAACCGUGUAGCACAGCAGA	93
E04	CAUGUCAAAGCCCGAACCGUGUAGCACAGCAGA	93
E07	CAUGUCAAAGCCCGAACCGUGUAGCACAGCAGA	93
ME07	CAUGUCAAAGCCCGAACCGUCC-----	48

Рисунок 9 - Выравнивание нуклеотидных последовательностей 2'F-Pyr-PHK-аптамеров E03, E04, E07, ME07

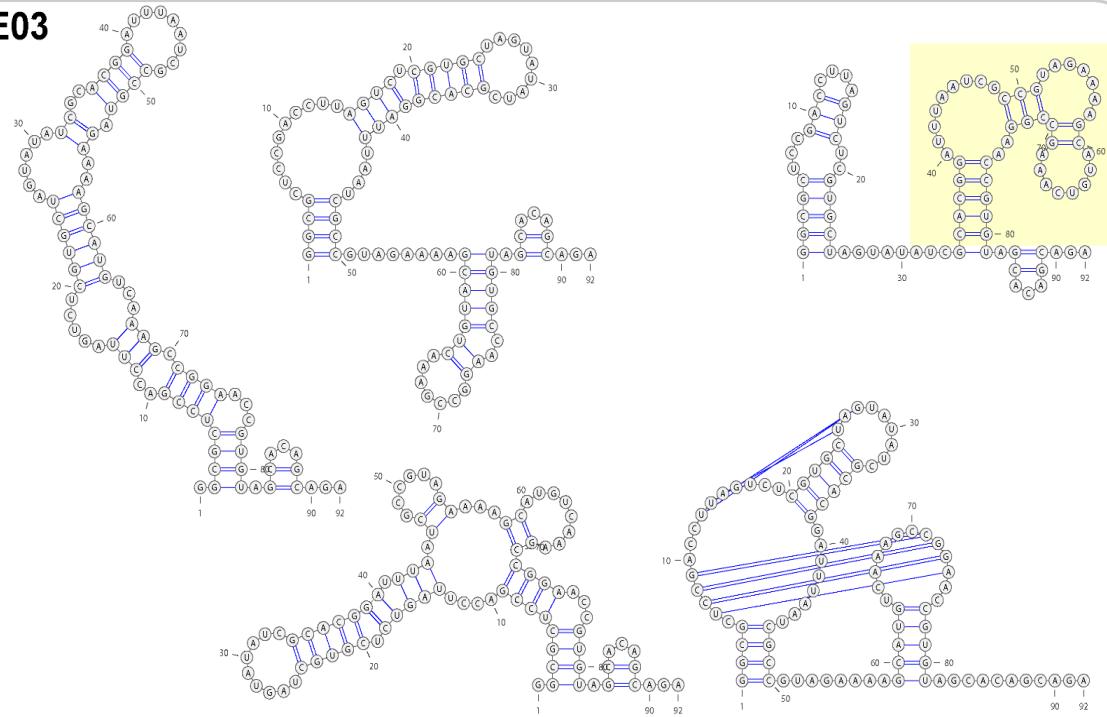
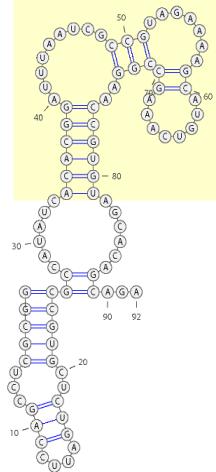
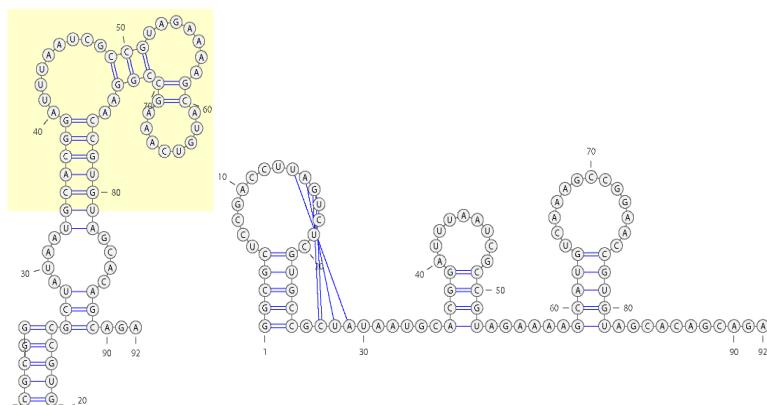
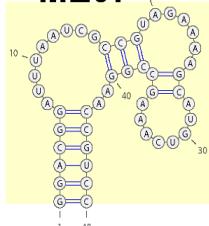
E03**E04****E07****ME07**

Рисунок 10 -- Сравнение предполагаемых вторичных структур 2'F-Pyr-PHK-аптамеров E03, E04, E07, ME07

Для 2'F-Pyr-PHK-аптамеров E03, E04, E07, ME07 аптамеров характерно наличие консенсусного мотива предполагаемой вторичной структуры (рисунок 10).

Полученные результаты анализа вторичных структур для 2'F-Pyr-PHK-аптамера CL4 представлены на рисунке 11: предложены две вторичные структуры, обе из шпилек четырех-пяти пар нуклеотидов.

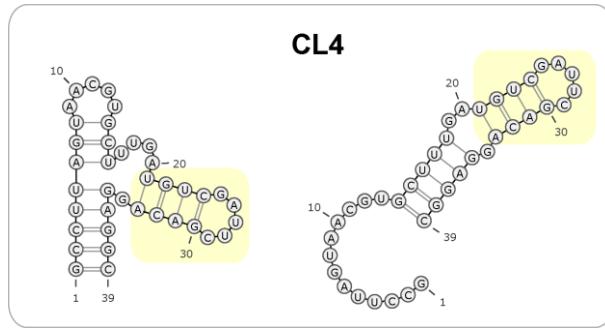


Рисунок 11 - Предполагаемые вторичные структуры 2'F-Pyr-PHK-аптамера CL4

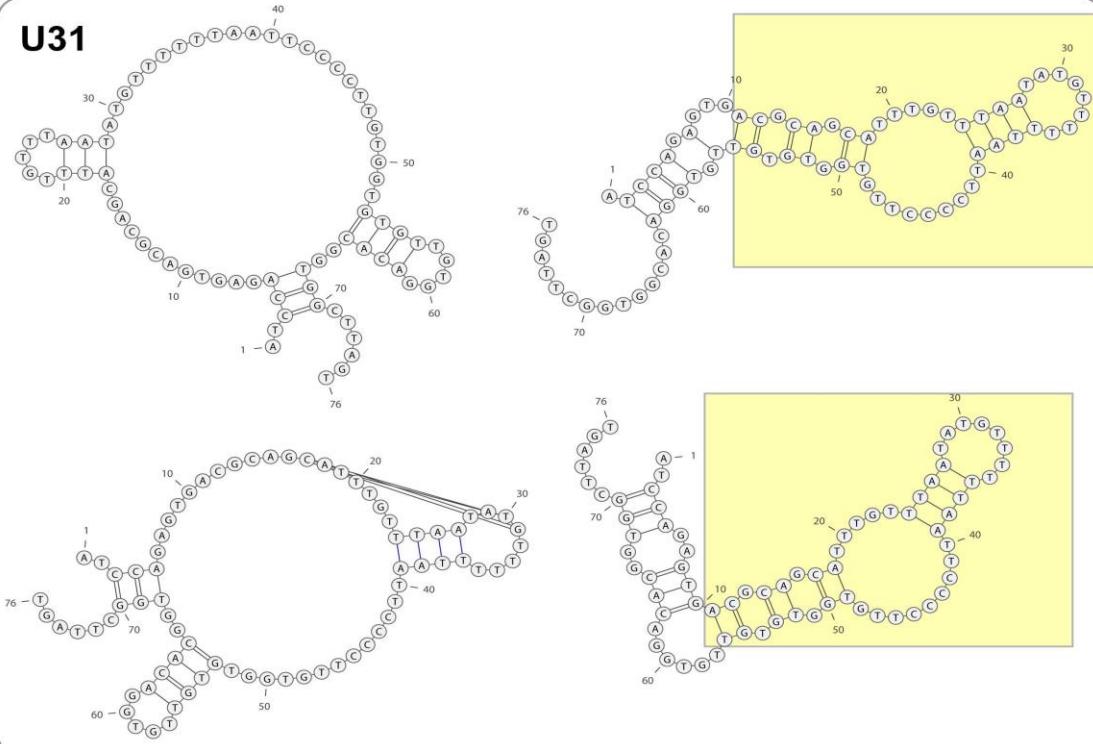
Результаты анализа вторичных структур для 2'F-Pyr-PHK-аптамеров ME07 и CL4 демонстрируют возможность наличия вторичной структуры этих аптамеров. Стратегия сокращения нуклеотидной последовательности авторами 2'F-Pyg-PHK-аптамера E07 до короткого аптамера ME07 привела к унификации предполагаемой вторичной структуры. В случае короткого аптамера CL4 могут образовываться две возможные вторичные структуры. Приведенные вторичные структуры 2'F-Pyr-PHK-аптамеров ME07 и CL4 предложены впервые, и согласуются с опубликованными данными экспериментальных исследований пробинга указанных аптамеров и поиска их узнающих мотивов [157].

ДНК-аптамеры

Аналитический инструментарий по поиску элементов вторичной структуры был применен к анти-EGFR ДНК-аптамеру TuTu20 длиной 74 нт, отобранному к рекомбинантному EGFR человека [112] (Приложение 2). В случае анти-EGFR аптамера Tutu20 было выявлено несколько предполагаемых вторичных структур и стратегия дизайна коротких производных была направлена на унификацию определенного варианта предполагаемой структуры родительского анти-EGFR ДНК-аптамера Tutu20: предложенные короткие производные Tutu20s3 и Tutu20s4 различались по предполагаемой вторичной структуре, что, возможно, повлияло на их аффинность к мишени (Приложение 2).

В нашей лаборатории предложен вариант дизайна известного анти-EGFR ДНК-аптамера U31 [113], полученный сокращением нуклеотидной последовательности до 46 нт, короткий аптамер GR20 [118, 157].

U31



GR20

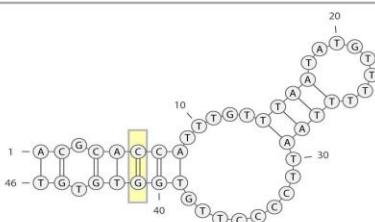


Рисунок 12 - Набор предполагаемых вторичных структур родительского аптамера U31 и полученного после рационального сокращения нуклеотидной последовательности короткого аптамера GR20

Согласно проведенному анализу, аптамер U31 может образовывать четыре возможные вторичные структуры, стабилизированные шпильками из трех-четырех пар оснований (Рисунок 12).

Сокращение нуклеотидной последовательности и ведение одонуклеотидной замены (G16C) в короткий вариант аптамера GR20 позволяет стабилизировать конкретную предполагаемую структуру.

Предсказанная вторичная структура аптамера GR20 содержит набор из 3+5+4 Уотсон-Криковских пар. Для аптамера GR20 был зарегистрирован ^1H ЯМР-спектр (рисунок 13), в котором представлены сигналы протонов сахаро-фосфатного остова в области 2-3,5 м.д. и протонов гетероциклических оснований в области 5,5-8,0 м.д. Наиболее интересная область 9,0-13,0 м.д. на рисунке 13 вынесена отдельно. В данной области проявляются сигналы имино-протонов комплементарных пар оснований, сигналы в области 12,3 - 13,8 м.д. соответствуют имино-протонам G-C пар и в области 10,0 - 11,5 м.д. - принадлежат имино-протонам A-T-пар.

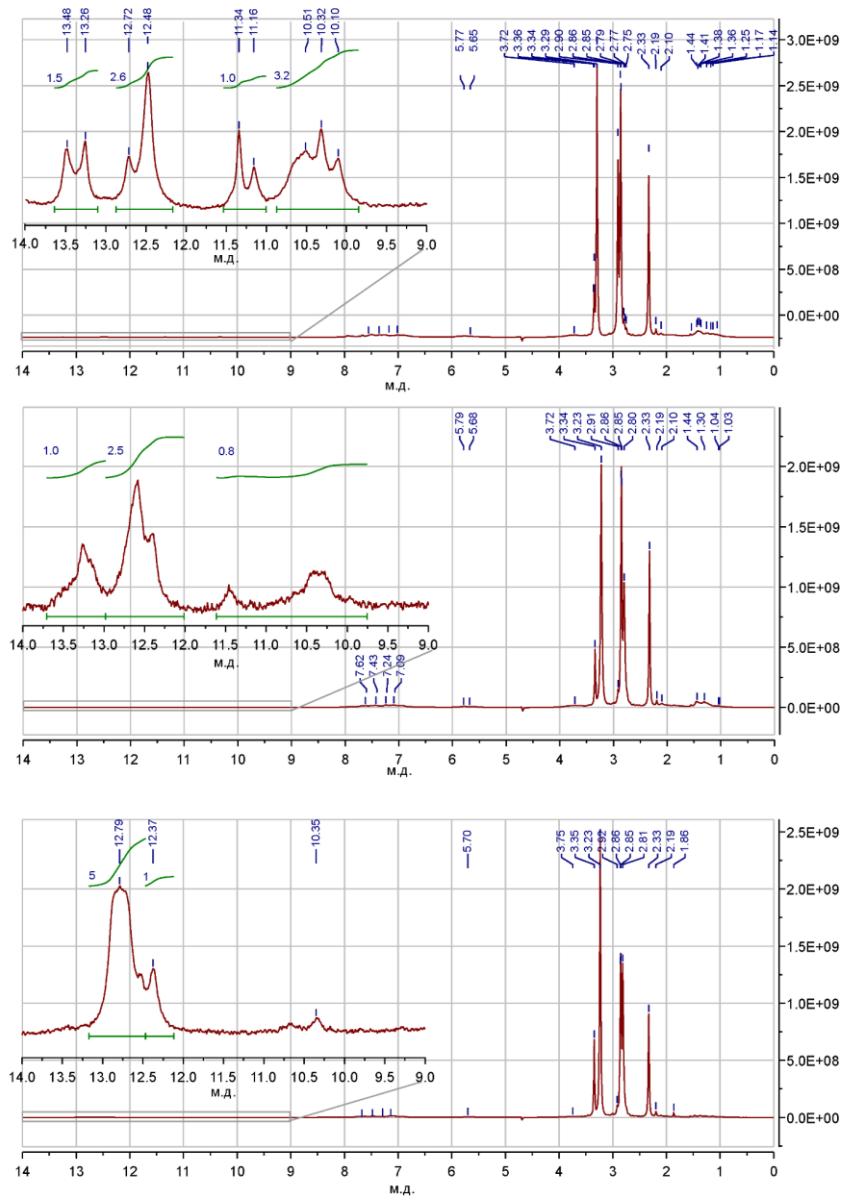


Рисунок 13 - ^1H ЯМР-спектры коротких анти-EGFR аптамеров GR20, U2s и Goll в концентрации 220 мкM в PBS с добавлением 10% D_2O при +4°С на приборе «Bruker AVANCE III HD 300» (300,1 МГц). Отдельно показана область имино-протонов комплементарных пар оснований.

Исследование проведено совместно с Новиковым Р.А.

Несмотря на ограничения метода ЯМР-спектроскопии олигонуклеотидов, в том числе отличие температурных условий регистрации ^1H ЯМР-спектра и используемых концентраций аптамера от условий рутинного использования аптамера на клетках, полученные экспериментальные результаты свидетельствуют о наличии трехмерной структуры аптамера GR20, стабилизированной двухцепочечными участками. Структура GR20 стабилизирована А-Т и Г-С-парами, поскольку в спектре присутствуют сигналы имино-протонов обоих типов пар.

Предполагаемая вторичная структура известного из литературы ДНК-аптамера U2 с максимальным выигрышем энергии приведена на рисунке 14. Короткий вариант

аптамера U2s был получен усечением нуклеотидов 1–11 с 5'-конца и нуклеотидов 61–76 с 3'-конца длинного аптамера U2 (рисунок 14).

Предложен вариант дизайна аптамера U2, основанный на максимальной стабилизации наиболее вероятной возможной вторичной структуры родительского аптамера U2, получивший шифр G01 [119]. Дизайн аптамера G01 помимо сокращения нуклеотидной последовательности аптамера U2, как описано для U2s, дополнительно включал замены всех предполагаемых А-Т-пар на пары Г-С, что должно стабилизировать вторичную структуру аптамера G01 (рисунок 14) [119].

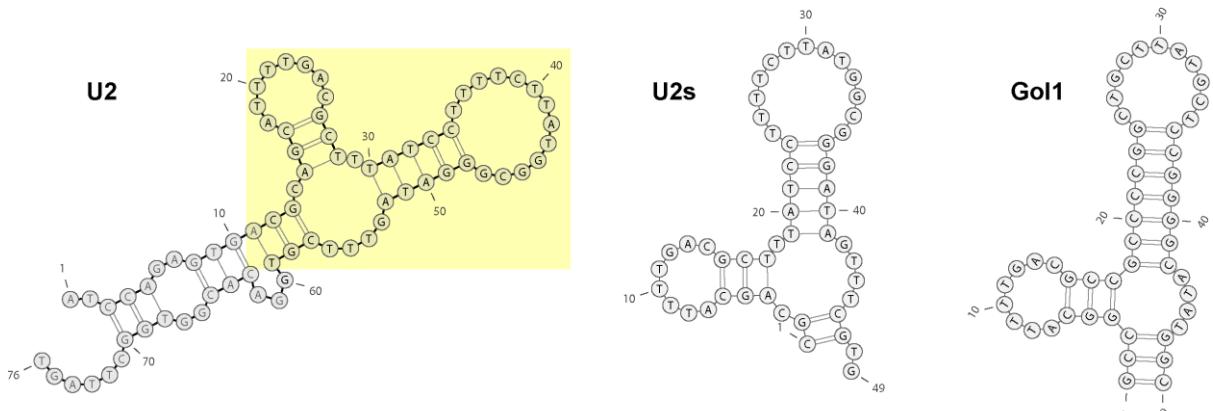


Рисунок 14 - Сравнение предполагаемых вторичных структур ДНК-аптамера U2 и его производного короткого аптамера U2s, и спроектированного на основе второй структуры U2 аптамера G01

Неожиданно, несмотря на весьма рыхлую предполагаемую структуру аптамера U2s, в спектре протонного магнитного резонанса аптамера U2s детектированы сигналы в области имино-протонов структурированных Уотсон-Криковских пар (Рисунок 13). Сигналы в области 12,3 - 12,8 м.д., а также сдвинутый в более высокопольную область сигнал в области 13,0 - 13,6 м.д., соответствуют имино-протонам Г-С пар, что говорит о наличии в структурированном аптамере U2s пар гуанин-цитозин с различным молекулярным окружением. Сигналы протонов в области 10,0 - 11,5 м.д. соответствуют имино-протонам спаренных оснований А-Т-пар. Соотношение сигналов имино-протонов Г-С пар и А-Т-пар составляло приблизительно 3:1.

Для структурированного оригинального аптамера G01 в спектре протонного магнитного резонанса наблюдаются характерные сигналы протонов в области 12–14 м.д. (Рисунок 13), что соответствует сигналам имино-протонов Г-С-пар. Таким образом, наличие вторичной структуры аптамера G01, образованного водородными связями Г-С-пар оснований, было показано экспериментально.

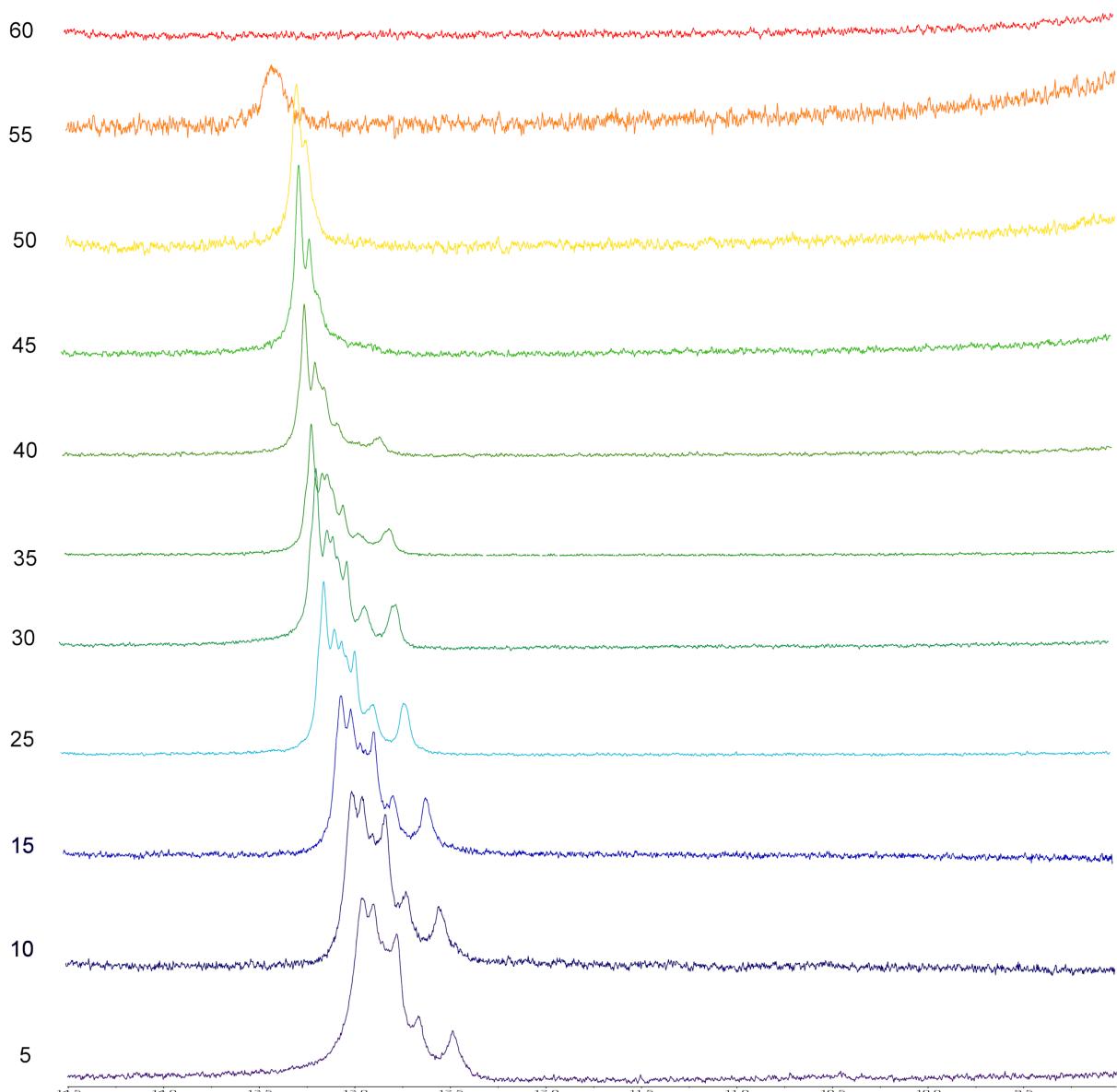


Рисунок 15 - Сравнение областей имино-протонов спектров ^1H ЯМР образца ДНК-аптамера Goll, зарегистрированных в диапазоне температур от +5 до +60 °C с шагом в 5 °C на приборе Bruker AVANCE 600, совместно с Марьиной С.М.

Термическая стабильность структуры ДНК-аптамера Goll была исследована при помощи ЯМР-спектроскопии, спектры протонного магнитного резонанса были зарегистрированы в диапазоне температур от +5 °C до +60 °C с шагом в 5 °C (Рисунок 15), для каждой температуры регистрации в течение 10 минут проводилось предварительное термостатирование образца аптамера Goll. В данном случае регистрация ^1H ЯМР-спектров произведена на более высокочастотном приборе Bruker AVANCE 600, что позволило не только снизить время накопления сигнала, но и привело к повышению разрешения сигналов имино-протонов (для ^1H ЯМР-спектра аптамера Goll при +5°C).

При повышении температуры происходит разрыв водородных связей между азотистыми основаниями, плавление структуры ДНК-аптамера Goll, в результате чего

наблюдается снижение интенсивности сигналов имино-протонов водородных связей в спектрах ^1H ЯМР. Общий сдвиг сигналов в область больших значений м.д. при увеличении температуры обусловлен ослаблением водородных связей при нагревании. В области имино-протонов ^1H ЯМР образца ДНК-аптамера Goll наблюдается шесть сигналов при 12,5 - 13,2 м.д. К сожалению, количественный анализ отнесения пиков имино-протонов за счет обменных процессов с растворителем в случае одномерного ^1H ЯМР-спектра образца ДНК-аптамера Goll затруднен, поэтому наблюдаемые интенсивности сигналов имино-протонов можно сравнивать только между собой.

При 37 °C – температуре, соответствующей физиологическим условиям, структура аптамера Goll сохраняется, о чем свидетельствует наличие сигналов имино-протонов пар оснований G-C в области 12–14 м.д. в спектрах ^1H ЯМР, зарегистрированных при температурах 35 °C и 40 °C. Термическая деструкция водородных связей происходит не одномоментно, сигналы различных имино-протонов пропадают в спектре ^1H ЯМР при разной температуре. Плавление структуры явно проявляется при температурах выше 40 °C, количество индивидуальных сигналов снижается, аптамер Goll расплывается полностью по данным ^1H ЯМР только при 60°C, при этой температуре полностью исчезают сигналы имино-протонов G-C-пар.

Таким образом, в результате проведенного анализа структурного разнообразия опубликованных 2'FY-РНК и ДНК аптамеров к EGFR, было показано, что исследуемые аптамеры способны к образованию вторичной структуры, предложены возможные структуры. Нуклеотидные последовательности ДНК-аптамеров U31 и U2 укорачивали с учетом возможных структур, чтобы оригинальные короткие анти-EGFR ДНК-аптамеры GR20, U2s и Goll сохраняли вторичные структуры. Для трех коротких анти-EGFR ДНК-аптамеров GR20, U2s и Goll наличие шпилечных участков, образованных Уотсон-Криковскими парами нуклеотидов, показано экспериментально с помощью ^1H ЯМР-спектроскопии. Удалось оценить термическую стабильность оригинального искусственного компьютерного аптамера Goll, показано, что при физиологических условиях данный аптамер сохраняет структурированные Уотсон-Криковскими парами нуклеотидов участки, плавление структуры аптамера происходит при температурах выше 40°C.

3.2.2 Анти-EGFR аптамеры узнают рекомбинантный внеклеточный домен EGFR человека (EGFR)⁸

Способность детектировать EGFR в опухоли для анти-EGFR аптамеров во многом определяется аффинностью аптамеров к их мишени, внеклеточному домену EGFR. Однако, несмотря на обилие данных об аффинности каждого индивидуального аптамера, сравнение опубликованных результатов невозможно, поскольку исследования аффинности, как правило, выполнены различными методами, и даже в случае одного применяемого метода, часто различны используемые реагенты (например, могут различаться рекомбинантные белки, полученные в различных системах экспрессии).

В работе методом интерферометрии биослов (ИБС) в унифицированных условиях была исследована аффинность анти-EGFR аптамеров при взаимодействии с рекомбинантным EGFR [156]. В настоящей работе использовался вариант исполнения метода ИБС с иммобилизацией аптамера на поверхность сенсора [158]. Пучок белого света, проходя по стекловолокну сенсора, попадает на поверхность слоя стрептавидина с иммобилизованными на нем биотинилированными аптамерами. Свет частично отражается от аптамера, другая часть светового потока отражается от нижней поверхности слоя взаимодействующих аптамера и мишени. В точку наблюдения приходят отраженные световые волны, прошедшие разные расстояния, при их наложении наблюдается интерференция (рисунок 16).

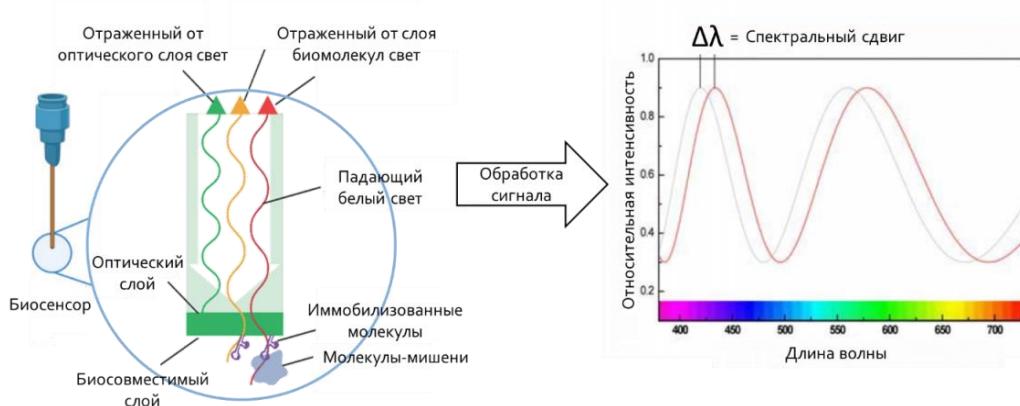


Рисунок 16 - Схема метода интерферометрии биослоев [адаптировано из 158].
При образовании комплекса аптамер-мишень наблюдается спектральный сдвиг интерференционной картины, что и является аналитическим сигналом

⁸ При подготовке данного раздела диссертации использованы публикации [2, 5], выполненной в соавторстве и указанной во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

На стадии ассоциации комплекса сенсор с иммобилизованным аптамером погружается в раствор аналита. С интервалом в доли секунды регистрируется значение интерферометрии сигнала, на основании изменения которого рассчитывается кинетическая константа ассоциации комплекса k_{on} . Затем сенсор с иммобилизованным аптамером, связанным в комплекс с анализом, погружается в раствор буферного раствора, регистрируется сигнал, который позволяет рассчитать кинетическую константу диссоциации комплекса k_{off} . Отношение кинетических констант диссоциации и ассоциации составляет равновесную кажущуюся константу диссоциации комплекса K_D (рисунок 17).



Рисунок 17 - Общий вид сенсограммы интерферометрии биослоев

Метод ИБС представляет собой наиболее чувствительный современный инструмент для изучения комплексов аптамер-мишень: с помощью ИБС возможно проводить измерения в режиме реального времени с малыми количествами вещества, возможно проводить параллельные измерения для нескольких сенсоров, что позволяет накапливать статистические данные. Диапазон аффинностей компонентов комплекса, детектируемых методом интерферометрии биослоев, чрезвычайно широк, от миллимолов до пикомолов. Ограничения метода интерферометрии биослоев связаны с размером комплекса, по заявлению производителя минимальная молярная масса аналита должна быть не менее 150 Да, в этом случае изменение толщины оптического слоя оказывается достаточным для наблюдения достоверного спектрального сдвига интерференционной картины. Методом интерферометрии биослоев сложно изучать высокоаффинные комплексы с низкой скоростью диссоциации.

В случае маркера EGFR внеклеточный домен структурирован, может быть клонирован и получен отдельно. Молекулярный вес рекомбинантного внеклеточного домена EGFR человека (EGFR') составляет 95 кДа. Метод интерферометрии биослоев прекрасно подходит для детекции образования комплексов аптамеров с рекомбинантным внеклеточным доменом EGFR, исследование аффинности аптамеров в полной мере отвечает возможностям метода.

Взаимодействие антител к рецептору с рекомбинантным EGFR

Первым этапом оценки аффинности анти-EGFR аптамеров было тестирование используемой системы интерферометрии биослоев. В качестве образцов положительного контроля были выбраны три типа известных анти-EGFR антител.

Таблица 6. Характеристики исследуемых антител к EGFR.

№	Шифр антител	Кат. номер	Производитель антител	Иммуноген	Характеристики связывания EGFR
1	C4	MAA757Hu22 (моноклональное, мышью)	Cloud-Clone Corp. (Китай)	рекомбинантный участок внеклеточного домена EGFR, Leu25~Ser645, экспрессированный в 293F с N-концевым His-тагом	чувствительность 173 нМ (1.21 нг/мл) диапазон определения 44,5 нМ - 2,85 мкМ (3,12 - 200 нг/мл)
2	C225	GR13L (цетуксимаб, моноклональное, мышью, экспрессированное в клетках гибридомы)	Sigma Aldrich, Германия	человеческий EGFR, частично очищенный из клеток A431	Блокирует автофосфорилирование рецептора при концентрации 400 нМ, связывается с EGFR в наномолярном диапазоне [159]
3	H11	MA5-13070 (моноклональное, мышью)	Merck Millipore, США	клетки HC2 20 d2, экспрессирующие как EGFR, так и его мутантный вариант EGFRvIII	[160]

Тестирование антител методом интерферометрии биослоев проводили по следующей схеме: покрытый стрептавидином биосенсор инкубировали с биотинилизованными кроличьими антителами к IgG мыши, после чего инкубировали с мышьюми анти-EGFR антителами. Для каждого эксперимента использовали разведение рекомбинантного EGFR' в диапазоне концентраций от 0,8 до 104 нМ. Сигнал взаимодействия антител с EGFR' сравнивали с сигналом антител с высокими концентрациями белка БСА, растворы которого готовили из навески сухого белка с концентрациями от 10 до 325 мкМ.

Антитела C4 давали отличный от нуля сигнал в растворах рекомбинантного EGFR' с концентрациями выше 25 нМ белка, что соответствует заявленным характеристикам производителей. При этом в растворах БСА в концентрациях вплоть до 325 мкМ сигнала интерферометрии биослоев для антител не наблюдали (рисунок 18).

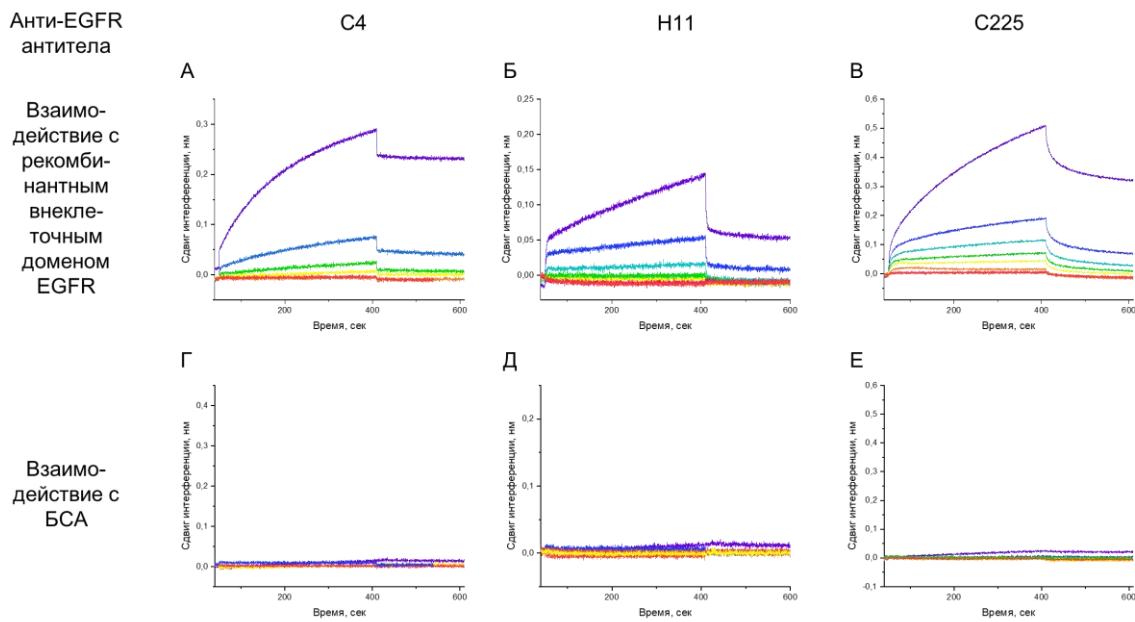


Рисунок 18 - ИБС взаимодействия иммобилизованных антител с растворами EGFR' в концентрациях от 0,8 нМ до 104 нМ, ИБС, ступенчатое двукратное увеличение концентрации EGFR' (от красной до фиолетовой линии) (А, Б, В) или с растворами БСА в концентрациях от 10 до 325 мкМ ступенчатое двукратное увеличение концентрации БСА (от красной до фиолетовой линии) (Г, Д, Е): антитела C4 (А, Г), H11 (Б, Д), C225 (В, Е)

Антитела C225 к EGFR представляют собой терапевтические антитела (цетуксимаб), связывающие внеклеточный домен человеческого EGFR с наномолярной константой диссоциации [159]. Антитела C225 давали сигнал ИБС при ассоциации в растворах рекомбинантного человеческого EGFR вплоть до минимальных исследуемых концентраций белка, 0,8 нМ. При этом в растворах БСА в концентрациях вплоть до 325 мкМ сигнала ассоциации интерферометрии биослоев не наблюдали (рисунок 18).

Используемые в проточной цитометрии антитела H11 [160] давали сигнал в растворах EGFR' с концентрациями выше 12 нМ белка. В растворах БСА в концентрациях вплоть до 165 мкМ сигнала ассоциации интерферометрии биослоев не наблюдали (рисунок 18).

Для всех протестированных образцов антител из полученных сенсограмм были рассчитаны кинетические параметры взаимодействия с EGFR', константы скоростей ассоциации k_{on} и диссоциации k_{off} (таблица 7).

Таблица 7 - Рассчитанные из экспериментальных данных интерферометрии биослоев кинетические константы скорости ассоциации и диссоциации и равновесные константы диссоциации комплексов исследуемых антител с EGFR'

Шифр антител	Кинетическая константа скорости диссоциации $k_{off} \cdot 10^4 \text{ c}^{-1}$	Кинетическая константа скорости ассоциации $k_{on} \cdot 10^{-5} (\text{M} \cdot \text{c})^{-1}$	Равновесная кажущаяся константа диссоциации $K_D = k_{off}/k_{on}$ нМ	Чувствительность, нМ	Мишень	Использование
C4	20 ± 1	69 ± 14	2.9 ± 0.6	25 нМ	внеклеточный домен EGFR человека	ИФА
H11	138 ± 10	41 ± 2	33 ± 3	12 нМ	клетки НС2 20 d2	Проточная цитометрия
C225	99 ± 3	57 ± 3	17 ± 1.4	0,8 нМ	участок связывания EGF внеклеточного домена EGFR человека	Терапия

Таким образом, система интерферометрии биослоев, предлагаемая для оценки аффинности анти-EGFR антамеров, давала положительные сигналы при тестировании взаимодействия антител с рекомбинантным внеклеточным доменом EGFR' человека. Необходимо отметить, что антитела к EGFR не давали сигнала с тысячекратно более высокими концентрациями нецелевого белка БСА. Установлены количественные характеристики аффинности выбранных антител к EGFR', кинетические константы скорости ассоциации k_{on} и диссоциации k_{off} антител с рекомбинантным внеклеточным доменом человеческого EGFR', которые в результате давали наномолярные значения констант диссоциации K_D (таблица 7). Тем не менее, сравнение аффинности разных антител к EGFR между собой показало, что антитела C4 демонстрировали превосходные значения скоростных характеристик ассоциации и диссоциации комплекса с белком, результирующее значение K_D антител C4 к рекомбинантному EGFR также было минимальным, однако чувствительность антител C4, выраженная в минимальной концентрации белка, которая дает сигнал, была минимальной. Терапевтические антитела C225 оказались наиболее выигрышными для детекции EGFR', поскольку данные антитела демонстрировали высокие значения константы

ассоциации с небольшим разбросом, что также подтверждалось высокой чувствительностью этих антител к рекомбинантному рецептору EGFR'.

2'F-Pyr-RНК-аптамеры

Аффинность к рекомбинантному внеклеточному домену EGFR' известных 2'F-Pyr-RНК-аптамеров: ME07, короткого варианта аптамера E07, отобранного рекомбинантному белку EGFR, и CL4, сокращенного варианта аптамера, отобранного к EGFR-экспрессирующим клеткам A549, соответственно, впервые напрямую сравнили с помощью метода интерферометрии биослоев [156]. Биотинилированные иммобилизовали на биосенсор со стрептавидиновым покрытием. Оба аптамера демонстрировали связывание с EGFR', в то время как сигнал взаимодействия 2'F-Pyr-RНК-аптамеров с более высокими концентрациями нецелевого белка БСА отсутствовал, что видно на сенсограммах (рисунок 19).

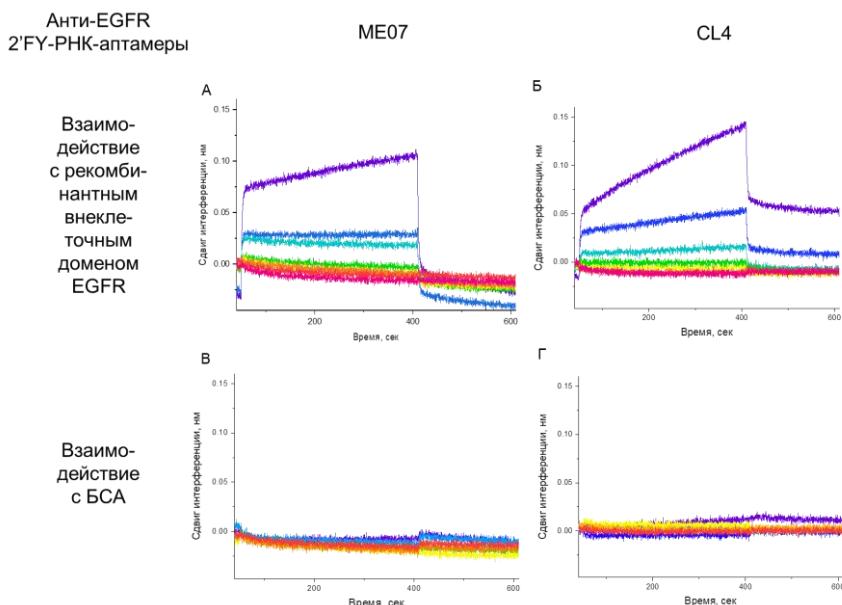


Рисунок 19 - ИБС взаимодействия иммобилизованных 2'F-Pyr-RНК-аптамеров ME07 (A, B) и CL4 (Б, Г) с растворами EGFR' в концентрациях от 0,8 нМ до 104 нМ, ступенчатое двукратное увеличение концентрации от красной к фиолетовой линии (A, Б) или с растворами БСА в концентрациях от 10 до 325 мкМ, ступенчатое двукратное увеличение концентрации от красной к фиолетовой линии (B, Г)

Если рассматривать чувствительность к рекомбинантному EGFR' 2'F-Pyr-RНК-аптамеров ME07 и CL4, то можно заметить, что в случае иммобилизованных аптамеров появление сигнала интерферометрии биослоев наблюдалось для растворов белка EGFR с минимальной концентрацией 12 нМ, так же, как и в случае антител H11.

Рассчитанные равновесные кажущиеся константы диссоциации $K_D = 25$ нМ для аптамера ME07 и $K_D = 37$ нМ для аптамера CL4 оказались близки, однако для аптамера

CL4 константа скорости ассоциации k_{on} немного выше, $5 \cdot 10^5$ ($M \cdot c$) $^{-1}$, и константа скорости диссоциации k_{off} выше $190 \cdot 10^{-4}$ c^{-1} , следовательно, как образование, так и диссоциация комплекса аптамера CL4 с рекомбинантным внеклеточным доменом EGFR' человека происходят быстрее, чем в случае аптамера ME07 (таблица 8).

2'F-Pyr-PHK-аптамеры ME07 и CL4 демонстрировали связывание рекомбинантного внеклеточного домена EGFR' человека (рисунок 19). При этом практически не наблюдалось взаимодействия аптамеров ME07 и CL4 с высокими концентрациями БСА, вплоть до 325 мкМ. Чувствительность к рекомбинантному EGFR' 2'F-Pyr-PHK-аптамеров ME07 и CL4 согласно полученным методом интерферометрии биослоев данным оказалась на одном уровне с исследуемыми антителами H11 и C4. Значения равновесных кажущихся констант диссоциации комплексов K_D 2'F-Pyr-PHK-аптамеров ME07 и CL4 с рекомбинантным внеклеточным доменом EGFR' человека в среднем превосходили соответствующие значения для антител к EGFR, свидетельствуя о снижении аффинности. Указанное различие обусловлено более низкими константами скорости ассоциации k_{on} комплексов 2'F-Pyr-PHK-аптамеров ME07 и CL4 с EGFR'.

ДНК-аптамеры

ДНК-аптамеры U31 и U2 изначально были отобраны в одной селекции, опубликованные характеристики аффинности к трансфицированным EGFRvIII клеткам U87 довольно близки, 8 и 3.3 нМ, соответственно. Показано, что ДНК-аптамер U31 со сравнимой аффинностью связывает также рекомбинантный внеклеточный домен рецептора EGFR', опубликованное значение равновесной кажущейся константы диссоциации комплекса составило 3.7 ± 0.7 нМ [118].

Взаимодействие ДНК-аптамера U31 и его оригинального производного короткого ДНК-аптамера GR20 с рекомбинантным внеклеточным доменом EGFR' человека исследовали методом интерферометрии биослоев (рисунок 20). ДНК-аптамеры U31 и GR20 демонстрируют незначительное взаимодействие с высокими концентрациями нецелевого белка БСА, хотя амплитуды сигналов взаимодействия ДНК-аптамеров с БСА оказались на порядок ниже, чем амплитуды сигналов взаимодействия ДНК-аптамеров с EGFR' [156].

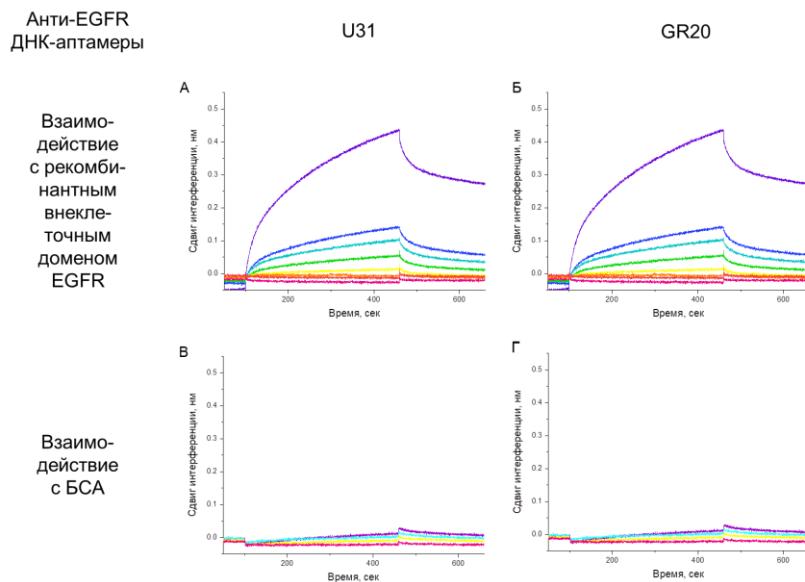


Рисунок 20 - ИБС взаимодействия иммобилизованных ДНК-аптамеров с растворами EGFR' в концентрациях от 0,8 нМ до 104 нМ, ступенчатое двухкратное увеличение концентрации от красной к фиолетовой линии (А, Б) или с растворами BCA в концентрациях от 10 до 325 мкМ, ступенчатое двухкратное увеличение концентрации от красной к фиолетовой линии (В, Г):
ДНК-аптамеры U31 (А, В) и GR20 (Б, Г)

Рассчитанные K_D для комплексов ДНК-аптамеров U31 и GR20 с рекомбинантным EGFR' составили 24 и 26 нМ соответственно (таблица 8). Следовательно, что при рациональном дизайне аптамера GR20 удалось сохранить узнавающий мотив аптамера, который ответственен за аффинность к белку EGFR', при этом длина исходного аптамера уменьшена с 76 до 46 нуклеотидов.

Характеристики ДНК-аптамера U31 описаны в литературе, так какущаяся константа диссоциации с клетками U87MG-EGFRvIII, полученная методом аптаферментного анализа, составляет $K_D = 8,1 \pm 2,4$ нМ [116]. Ранее аффинность аптамера U31 и его короткого производного GR20 по отношению к рекомбинантным EGFR' и мутантному варианту EGFRvIII были измерены в нашей лаборатории [118]. Было показано, что при сокращении аптамера U31 до GR20 аффинность к EGFR' сохраняется, опубликованные значения равновесных какущихся констант диссоциации комплекса аптамера U31 с рекомбинантным EGFR' K_D составила $3.7 \pm 0,7$ нМ, в то время как для комплекса аптамера GR20 с EGFR' K_D составила 5 ± 2 нМ. В настоящей работе приведены данные интерферометрии биослоев, полученные для рекомбинантного EGFR' другого производителя, что, возможно и объясняет разницу в опубликованных и полученных значениях констант. В настоящей работе рассчитанные равновесные K_D для комплексов ДНК-аптамеров U31 и GR20 с рекомбинантным EGFR', как и опубликованные ранее, практически совпадали,

составляя 24 и 26 нМ, соответственно. Следовательно, что при рациональном дизайне аптамера GR20 удалось сохранить узнавающий мотив аптамера, который ответственен за аффинность к EGFR', при этом выполнено значительное сокращение нуклеотидной последовательности исходного аптамера с 76 до 46 нуклеотидов.

Аффинность ДНК-аптамера U2 и двух его оригинальных укороченных производных – аптамеров U2s и Gol1 к рекомбинантному внеклеточному домену EGFR' человеку оценивали методом интерферометрии биослоев [156]. На сенсограммах всех трёх аптамеров U2, U2s и Gol1 наблюдали сигнал связывания EGFR' в исследуемой пробе начиная с концентрации 12 нМ (рисунок 21), в то время как сигнал взаимодействия ДНК-аптамеров с БСА был слабым и наблюдался только для концентраций БСА выше 100 мкМ.

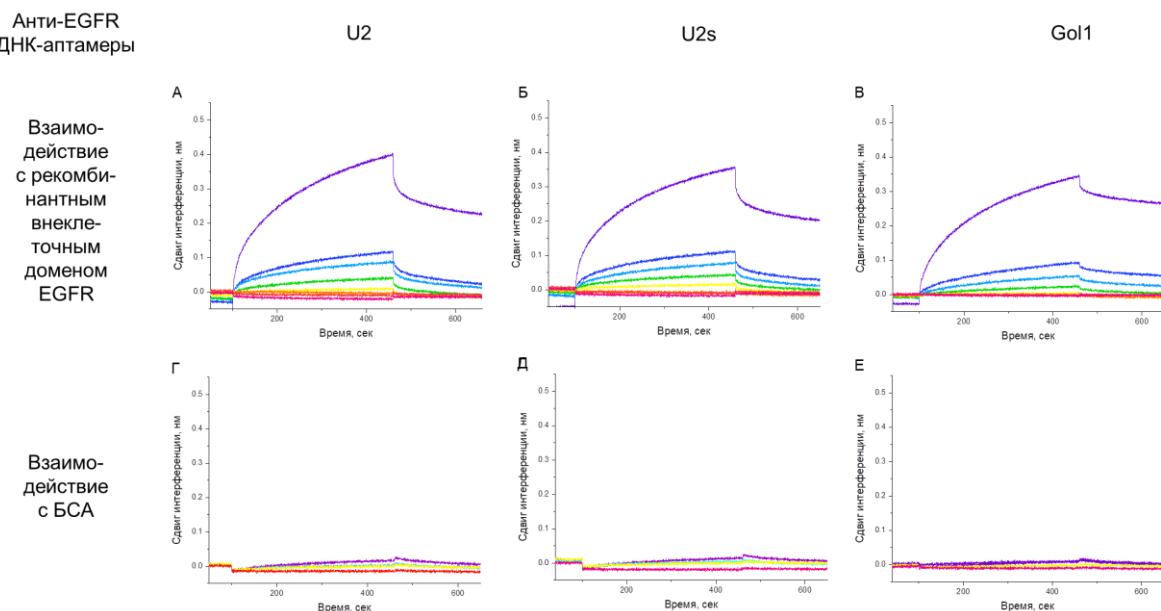


Рисунок 21 - ИБС взаимодействия иммобилизованных ДНК-аптамеров серии U с растворами EGFR' в концентрациях от 0,8 нМ до 104 нМ, ступенчатое двухкратное увеличение концентрации от красной к фиолетовой линии (A-B) или с растворами БСА в концентрациях от 10 до 325 мкМ, ступенчатое двухкратное увеличение концентрации от красной к фиолетовой линии (Г-Е):
ДНК-аптамеры U2 (A, Г), U2s (Б, Д) и Gol1 (В, Е)

Сравнение кинетики связывания полноразмерного аптамера U2 и двух его оригинальных укороченных производных аптамеров U2s и Gol1 с рекомбинантным белком EGFR' показало сходные профили сенсограмм интерферометрии биослоев. Рассчитанные для аптамеров U2, U2s и Gol1 K_D комплексов с рекомбинантным внеклеточным доменом EGFR человека составляли 18, 25 и 17 нМ соответственно, что говорит о высокой аффинности аптамеров U2, U2s и Gol1 к рекомбинантному EGFR' (таблица 8). Аффинность короткого U2s немного снижается по сравнению с

родительским аптамером U2, в случае аптамера Gol1 значение кажущейся K_D практически не меняется по сравнению с его родительским аптамером U2, следовательно, при стабилизации вторичной структуры в аптамере Gol1 сохраняется аффинность аптамера с EGFR' без потери узнавания.

Короткие ДНК-аптамеры оказались хорошими молекулярными узнающими элементами. Константы скорости диссоциации k_{off} коротких ДНК-аптамеров Gol1 и GR20 были минимальными. Короткий ДНК-аптамер GR20 медленно связывается с EGFR' и медленно диссоциирует, стабилизированный GC-парами искусственный короткий ДНК-аптамер Gol1 имеет более низкую равновесную K_D , уступая в константе скорости ассоциации, но имеет более высокую константу скорости диссоциации (таблица 8).

Таблица 8 - Константы скорости ассоциации и диссоциации комплексов антител/аптамеров с EGFR', рассчитанные из экспериментальных данных интерферометрии биослоев

Шифр	Химическая природа	Кинетическая константа скорости диссоциации k_{off} , $10^{-4} c^{-1}$	Кинетическая константа скорости ассоциации k_{on} , $10^5 (M \cdot c)^{-1}$	Кажущаяся константа диссоциации $K_d = k_{off}/k_{on}$, nM
ME07	2'F-Рур-РНК	64 ± 2	2.5 ± 0.8	25 ± 7
CL4	2'F-Рур-РНК	190 ± 30	5.1 ± 0.7	37 ± 6
U31	ДНК	18 ± 2	0.7 ± 0.2	24 ± 6
GR20	ДНК	13 ± 3	0.5 ± 0.1	26 ± 5
U2	ДНК	20 ± 1	1.1 ± 0.2	18 ± 3
U2s	ДНК	23 ± 2	0.9 ± 0.1	25 ± 2
Gol1	ДНК	22 ± 2	1.3 ± 0.3	17 ± 3

Таким образом, по результатам экспериментов интерферометрии биокомплексов были рассчитаны константы скорости ассоциации k_{on} и диссоциации k_{off} , а также кажущиеся константы диссоциации K_D для аптамеров к рекомбинантному внеклеточному домену EGFR': для модифицированных 2'F-Рур-РНК-аптамеров к EGFR

ME07 и CL4, ДНК-аптамеров U2, U31, а также оригинальных разработанных в нашей лаборатории вариантов коротких аптамеров U2s, Gol1 и GR20 (таблица 8).

Впервые проведено сравнение констант скорости ассоциации k_{on} и диссоциации k_{off} , а также рассчитанных кажущиеся констант диссоциации K_D для антител и нескольких наборов аптамеров к рекомбинантному внеклеточному домену EGFR человека (таблицы 7 и 8). В настоящей работе использованы антитела, узнающие внеклеточный домен 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 аптамеров определяет более высокая k_{on} антител. Константы скорости диссоциации k_{off} антител C225 и C4 были сравнимы с k_{off} ДНК-аптамеров и составляли $99 \cdot 10^{-4}$ и $20 \cdot 10^{-4}$ c^{-1} соответственно. Равновесная K_D антител C4 составила 2,9 нМ, что на порядок лучше, чем значения для аптамеров; аффинность антител C225 и аптамеров была одинакова $K_D = 17$ нМ.

Различается кинетика связывания анти-EGFR 2'F-Pyr-PHK-аптамеры ME07 и CL4 с EGFR' (таблица 8, фиолетовые строки). Замена 2'-ОН на 2'-F используется для повышения гидролитической стабильности PHK-аптамеров. Константы скорости ассоциации k_{on} 2'F-Pyr-PHK-аптамеров ME07 и CL4 были максимальными среди аптамеров (таблица 8), что определяет высокую аффинность 2'F-Pyr-PHK-аптамеров к EGFR'.

ДНК-аптамеры U31 и U2 были отобраны в одной селекции, поэтому неудивительно, что они имели близкие аффинности, $K_D = 24$ 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 ранее.

Равновесные K_D для комплексов всех трёх аптамеров серии U2, U2s и Gol1 с EGFR' оказались в наномолярном диапазоне. Аффинность короткого U2s немного снижается по сравнению с родительским аптамером U2 (таблица 1, желтые строки). Равновесная K_D для искусственного аптамера Gol1 практически совпадает с K_D исходного длинного ДНК-аптамера U2 (таблица 1, желтые строки).

Короткие ДНК-аптамеры оказались хорошими узнавающими элементами. Константы скорости диссоциации k_{off} коротких ДНК-аптамеров Gol1 и GR20 были минимальными. Короткий ДНК-аптамер GR20 медленно связывается с EGFR' и медленно диссоциирует, стабилизированный GC-парами искусственный короткий

ДНК-аптамер G011 имеет более низкую равновесную K_D , уступая в константе скорости ассоциации, но имеет более высокую константу скорости диссоциации (таблица 1).

Аффинность коротких ДНК-аптамеров GR20 и G011 по сравнению с длинными родительскими U31 и U2 сохраняется. Константы скорости ассоциации и диссоциации коротких ДНК-аптамеров были ниже, чем для 2'F-Pyr-RHK-аптамеров ME07 и CL4. Аффинность ДНК-аптамеров была сопоставима с антителами С4.

Вариант сокращения нуклеотидной последовательности ДНК-аптамера из другой селекции Tutu20 с сохранением различных элементов возможной вторичной структуры и определение аффинности исходного аптамера и полученных коротких вариантов описан в Приложении А3. В случае ДНК-аптамера Tutu20 было выполнено два варианта сокращения нуклеотидной последовательности исходного родительского аптамера, при этом только один из них сохранял аффинность родительского аптамера Tutu20 к EGFR' по данным ИБС.

Для узнающих элементов разной химической природы доминанты аффинности к белку оказались различны, в частности, для белок-белковых аффинных комплексов характерны высокие константы скорости ассоциации. Константы скорости ассоциации и диссоциации коротких ДНК-аптамеров с EGFR' были ниже, чем для 2'F-Pyr-RHK-аптамеров ME07 и CL4. Тем не менее, нужно отметить, что значения равновесных констант диссоциации K_D для антител цетуксимаб и аптамеров оказались сравнимыми, значения находятся в диапазоне 15-40 нМ.

3.1.3 Взаимодействие анти-EGFR 2'F-Pyr-RНК- и ДНК-аптамеров с линейными клетками A431, U87, MCF7⁹

Анализ взаимодействия анти-EGFR аптамеров с клетками проводили для различных линий клеток. Выбор исследуемых линий клеток определялся исходя из конкретных задач для конкретного аптамера. В большинстве случаев исследование взаимодействия аптамеров с EGFR-положительными клетками проводится на клетках с максимальной представленностью рецептора, в случае EGFR такой модельной линией клеток может служить линия эпидермальной аденокарциномы А-431. Многие задачи настоящей работы связаны с проводимыми в нашей лаборатории исследованиями клеток глиобластомы (ГБ), поэтому анти-EGFR аптамеры тестировали также на клетках линий глиобластомы U87 и U251. В частности, сами по себе анти-EGFR РНК- и 2'F-Pyr-РНК-аптамеры не оказывали влияния на жизнеспособность клеток ГБ U251 (Приложение А3). Важным фактором, определяющим применимость противоопухолевого аптамера в качестве терапевтического агента, является отсутствие действия на клетки условной нормы, поэтому действие исследуемых анти-EGFR аптамеров тестировали на жизнеспособность клеток дермальных фибробластов DF1 (Приложение А3), при этом показано, что влияния на жизнеспособность клеток DF1 анти-EGFR РНК- и 2'F-Pyr-РНК-аптамеры не оказывают.

Относительное количество мРНК EGFR в исследуемых клетках

Аптамеры - биомолекулы, высокоаффинно связывающие свою мишень. Логично считать, что взаимодействие анти-EGFR аптамеров с клетками будет во многом определяться количеством рецептора на поверхности клетки. Для оценки представленности белка в клетке можно использовать различные подходы, однако наиболее простой - по относительному количеству мРНК нарабатываемого белка в клетке методом количественной ПЦР (кПЦР). Нужно отметить, что метод кПЦР не измеряет напрямую количество рецептора на поверхности клетки и результат определения может довольно сильно разниться в зависимости от стадии жизненного цикла клетки, внешних факторов воздействия на клетку [161]. Однако, на сегодняшний день общепризнана необходимость первичной оценки относительного количества мРНК для формирования ожиданий уровня представленности белка на поверхности

⁹ При подготовке данного раздела диссертации использована публикация [2] выполненная в соавторстве и указанная во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

клетки. Нашими коллегами из НИМЦ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко проведен сравнительный анализ относительного количества мРНК EGFR для разных линий клеток, используемых в настоящей работе (рисунок 22А). Особенную ценность для настоящей работы представляют эти данные, поскольку анализ проводился с использованием тех же праймеров и нормирован на те же гены “домашнего хозяйства”, которые далее были использованы для анализа относительного количества мРНК EGFR клеток перевиваемых клеточных культур ГБ пациентов (ПКГБП). На рисунке 22 приведены результаты экспериментального определения относительного количества мРНК EGFR, а также референсные значения экспрессии мРНК EGFR, представленные в базе данных The Human Protein Atlas [162].

Лидерной линией клеток по уровню транскриптов EGFR является линия клеток эпидермальнойadenокарциномы A431, значение относительного количества мРНК EGFR клеток A431 на полтора порядка превосходит уровень мРНК EGFR в клетках стандартной линии глиобластомы U87.

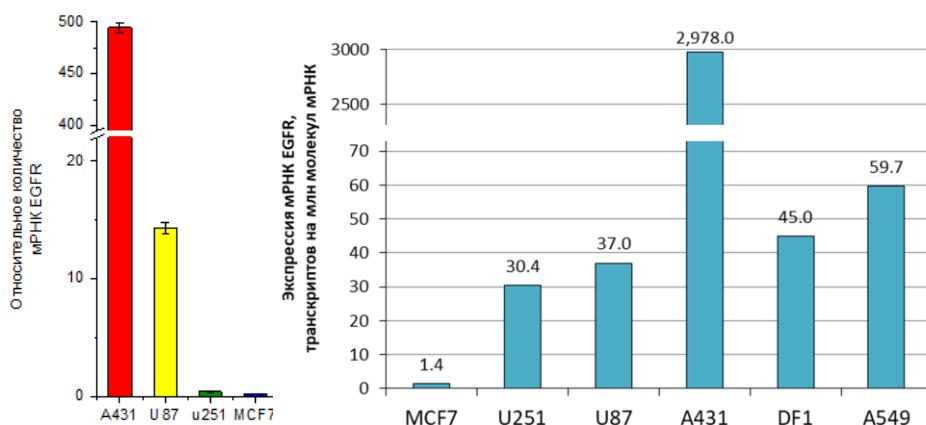


Рисунок 22 - А -Экспериментально определенное относительное количество мРНК EGFR в клетках стандартных линий: A-431, U87, U251, MCF-7; **Б** - значения экспрессии мРНК EGFR из базы данных The Human Protein Atlas для линий клеток MCF-7, U251, U87, A-431, DF1 (дермальные фибробласти человека), A549 [162]

Экспериментально определенное относительное количество мРНК EGFR в клетках другой стандартной линии глиобластомы U251 на порядок ниже, по сравнению с клетками линии U87. Клетки линии рака груди MCF-7 во многих исследованиях, связанных с EGFR, используются в качестве отрицательного контроля. По нашим результатам относительное количество мРНК EGFR в клетках MCF-7 было крайне низким, уровень транскрипции EGFR в клетках MCF-7 оказался почти пятидесятикратно ниже, чем в клетках линии глиобластомы U87, что согласуется с табличными данными базы данных The Human Protein Atlas [162]. В целом полученные

нами данные хорошо согласуются с характеристиками указанных линий клеток, приведенными в The Human Protein Atlas (рисунок 22) [162].

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

Метод проточной цитофлуориметрии позволяет анализировать взаимодействие флуоресцентно-меченого аптамера с целыми клетками, экспрессирующими белок-мишень. Данный метод позволяет детектировать собственную флуоресценцию конкретной клетки и флуоресценцию аптамеров, связавшихся с клеткой, что позволяет изучать свойства отдельных клеток в целой популяции. Преимуществом метода проточной цитофлуориметрии является возможность работы с живыми клетками, а также возможность статистически исследовать клетки по заданным параметрам.

Взаимодействие аптамеров с клетками исследовали методом проточной цитофлуориметрии (ПЦФ), для всех флуоресцентных аптамеров использовали стандартную концентрацию 1 μM для инкубации с клетками.

Для детекции взаимодействия аптамеров с клетками были использованы два типа флуоресцентных меток: зеленая флуоресцентная метка, карбоксифлуоресцеин, FAM-метка (λ возбуждения = 493 нм, λ эмиссии 517 нм), и метка сигнала в дальней красной области спектра цианин-5, Cy5 (λ возбуждения = 651 нм, λ эмиссии 670 нм). Использование карбоксифлуоресцеина обусловлено универсальностью его длин волн поглощения и эмиссии, подходящими не только для детекции в проточной цитометрии, но и с помощью других используемых в нашей лаборатории методик, например флуоресцентной микроскопии (Приложение А4). В частности, методом флуоресцентной микроскопии для 2'F-Руг-РНК-аптамера CL4 и ДНК-аптамеров GR20, Goll и Tutu20s3 с FAM-меткой показано взаимодействие аптамеров с EGFR-положительными клетками A431 (Приложение А4).

Модифицированный 2'F-Руг-РНК-аптамер CL4 представляет собой короткий 39-нг аптамер, отобранный к высокоэкспрессирующим EGFR клеткам рака легкого человека A549 [110]. До настоящего момента не было проведено прямого сравнения двух анти-EGFR 2'F-Руг-РНК-аптамеров ME07 и CL4, и сравнение двух приведенных в литературе кажущихся констант диссоциации комплекса аптамер-белок, 0,3 нМ для ME07 и 10 для CL4, неправомерно, так как они получены различными методами и в различных условиях. Сравнение взаимодействия аптамеров ME07 и CL4 с клетками эпидермальной аденокарциномы A431 методом проточной цитометрии впервые показало, что аптамер CL4 связывается с EGFR-положительными клетками A431, а

также позволяет провести сравнительную оценку эффективности связывания с клетками - среднее значение интенсивности флуоресценции (СЗИФ) клеток A431 с аптомером ME07 оказалось несколько больше, чем СЗИФ клеток A431 с аптомером CL4 (рисунок 23), что, тем не менее, согласуется с приведенным выше сравнением опубликованных констант диссоциации комплексов аптомер-белок [108, 110] и с экспериментально определенными в настоящей работе константами диссоциации для комплекса аптомер-белок, составившими 25 нМ для аптомера ME07 и 37 нМ для аптомера CL4.

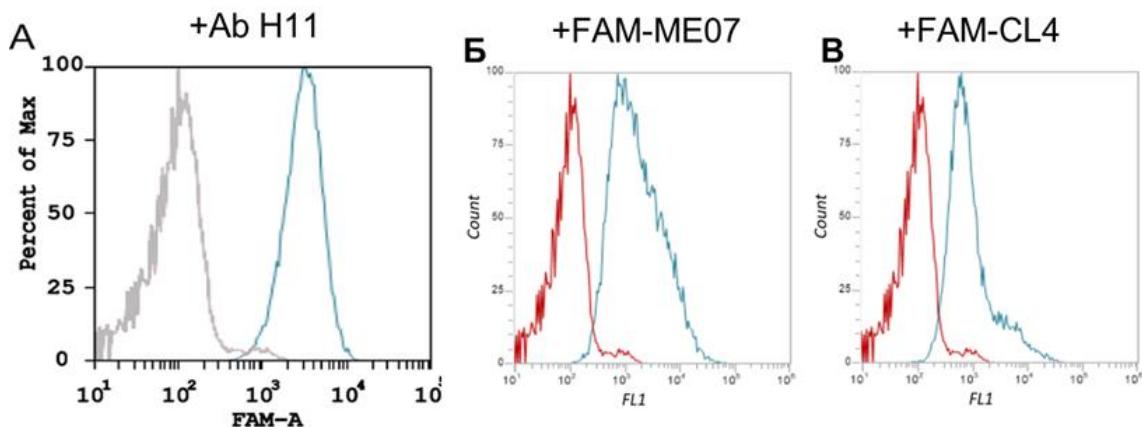


Рисунок 23 - Проточная цитометрия клеток линии A431 с (A) антителами H11 в составе сэндвич-структурь с вторичными антителами с Cy2-меткой (голубая линия); с FAM-меченными 2'F-Pyr-RHK-аптамерами (Б) ME07 и (В) CL4, автофлуоресценция клеток показана серым и красным

Сигнал комплекса оригинального короткого РНК-аптамера J18h, гибридизованного с флуоресцентно-меченым ДНК-зондом FAM-h на клетках A431 говорит о взаимодействии комплекса аптомера J18h с EGFR-положительными клетками A431 (Приложение А1). Сигнал FAM-меченного неаптамерного ДНК-зонда FAM-h на клетках A431 практически не отличался от сигнала автофлуоресценции клеток, следовательно, взаимодействие обусловлено аптомерной частью гибридизованного комплекса. Более того, сходные СЗИФ клеток A431 в присутствии РНК-аптамера J18h, гибридизованного с флуоресцентно-меченым ДНК-зондом FAM-h и в присутствии 2'FY-RHK-аптамера CL4 говорят о сходной аффинности этих двух различных аптомеров (Приложение А1, рисунок 23).

Фторированные производные РНК не только лишены части 2'-гидроксильных групп с их донорно-акцепторными свойствами, но и имеют специфический заместитель - атом F. Хотя двухцепочечные фтор-модифицированные РНК сохраняют конформацию А-формы, повышенная гидрофобность сахарофосфатного остова приводит к плохо предсказуемой термической стабильности и, в некоторых случаях к

более высокому сродству к белкам [114, 163]. Это может быть причиной того, что некоторые РНК-аптамеры, содержащие 2'-дезокси-2'-фторпиримидиновые нуклеозиды, используемые для обнаружения EGFR на клетках, проявляют повышенное неспецифическое связывание [164], что требует более тщательного изучения специфичности для применения в терапии глиом.

При исследовании связывания 2'F-Pyr-RНК-аптамера ME07 с различными клетками использовали коммерчески синтезированный ковалентно спитый с флуоресцентной меткой 2'F-Рут-РНК-аптамер FAM-ME07; в этом случае включение флуоресцентной метки флуоресцеина (FAM) осуществляли в ходе олигонуклеотидного синтеза на 5'-конец нуклеотидной последовательности.

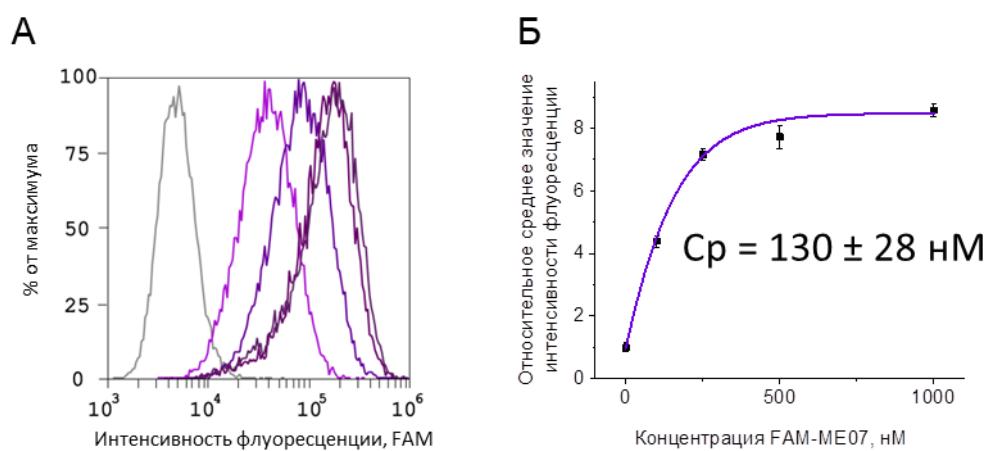


Рисунок 24 - (А) Титрование клеток A431 методом проточной цитометрии аптамером FAM-ME07: 0 нМ, 100 нМ, 250 нМ, 500 нМ, 1000 нМ; автофлуоресценция клеток показана серым цветом; Б) расчет параметра связывания аптамера ME07 с клетками A431

С помощью метода проточной цитометрии можно оценить аффинность аптамеров к клеткам и рассчитать усредненный параметр связывания аптамер-клетка, который по будет до некоторой степени аналогичен кажущейся константе диссоциации комплекса аптамер-мишень. Из данных зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации аптамера серии экспериментов проточной цитометрии с разными концентрациями флуоресцентно-меченого аптамера параметр связывания аптамер-клетка можно рассчитать, используя уравнение:

$$Y = \frac{B_{max} \cdot X}{C_p + X},$$

где Y – процент связавшихся клеток, рассчитанный из интенсивности флуоресценции, B_{max} – максимальный процент связавшихся клеток, C_p – усредненный параметр связывания аптамер-клетка, характеризующий аффинность аптамера, X – молярная концентрация аптамера.

Результаты титрования EGFR с помощью FAM-ME07 на поверхности клеток A431 подтвердили специфичность данного аптомера по отношению к рецептору. Сдвиг флуоресценции по оси абсцисс увеличивался при увеличении концентрации аптомера (рисунок 24), при этом характер увеличения сигнала соответствует стандартной кривой связывания. Это позволило оценить кажущуюся константу диссоциации для комплекса аптомера с EGFR-положительными клетками A431, значение Ср составило 130 нМ. Полученные результаты определения аффинности FAM-меченого 2'F-Pyr-RНК-аптамера ME07 согласуются с ранее опубликованными данными, в частности, параметр связывания аптомера ME07 с клетками U87, с меньшим уровнем мРНК EGFR был 209 нМ [165]. Количественное значение аффинности к высокоэкспрессирующему клеткам A431 разительно отличалось от значения кажущейся константы диссоциации аптомера ME07 к рекомбинантному внеклеточному домену EGFR, которая варьировалась по разным источникам в диапазоне 0,3 - 25 нМ [17, 108, 156], измеренное в настоящем исследовании значение константы составляло 25 нМ. Подобная ситуация была описана и ранее, в частности, для аптомеров E01, E03, E04, E07, которые ингибирировали киназную активность EGFR на клетках A431 при концентрации аптомера около ~300 нМ, в то время как кажущиеся константы связывания указанных аптомеров с рекомбинантным белком EGFR находились в диапазоне 2-10 нМ [17].

Взаимодействие анти-EGFR аптомера ME07 с клетками со средним относительным количеством мРНК EGFR, линии ГБ U87, оценивалось методом проточной цитофлуориметрии в работе швейцарских коллег [165], при титровании клеток U87 различными концентрациями Су5-меченого аптомера ME07 был установлен количественный параметр аффинности, аналогичный предложенному нами, который составил 209 ± 46 нМ. Опубликованное значение аффинности аптомера ME07 для линии U87 с меньшим количеством EGFR хорошо коррелирует с определенной в настоящей работе концентрацией полунасыщения для клеток линии A431 с высоким количеством EGFR, составившей 130 ± 28 нМ.

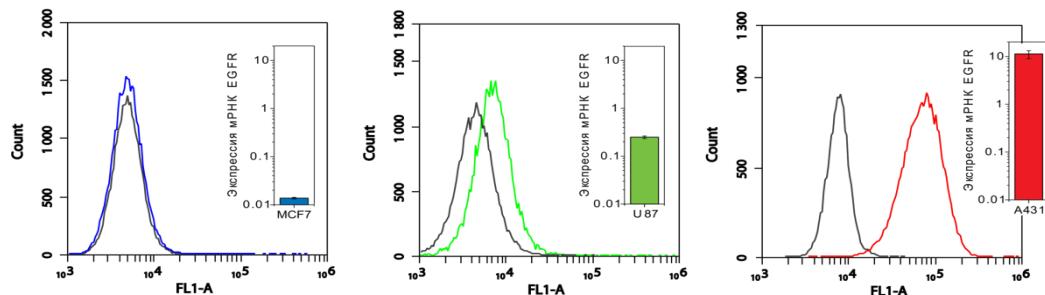


Рисунок 25. Связывание FAM-ME07 с клетками, имеющими различное количество молекул EGFR на поверхности клеток: А) клетки A431, Б) клетки U87, В) клетки MCF7; относительное количество мРНК EGFR показано отдельно

Еще более убедительными оказались данные, полученные для стандартных линий опухолевых клеток с различным количеством EGFR на поверхности (Рисунок 25). Клетки эпидермальной аденокарциномы человека A431 сверхэкспрессируют EGFR в количестве до 3×10^6 молекул рецептора на клетку [166]. Клетки глиобластомы человека U87 экспрессируют в сотни раз меньше молекул EGFR (2×10^4 молекул на отдельную клетку) [167]. Клетки люминальной аденокарциномы молочной железы человека MCF7 экспрессируют минимальное количество рецепторов EGF (2×10^3 молекул на клетку) [168]. Интенсивность флуоресцентного сигнала клеток после инкубации с флуоресцентным аптамером FAM-ME07 уменьшалась с уменьшением количества рецепторов на клетку в ряду A431, U87, MCF7.

Таким образом, проточная цитометрия с флуоресцентным аптамером FAM-ME07 может быть использована для полуколичественной оценки представленности молекул EGFR на поверхности клеток. Более того, сигнал флуоресценции для клеток MCF7 практически не отличался от сигнала автофлуоресценции клеток, что указывает на возможный предел обнаружения при оценке количества рецепторов с помощью аптамера ME07 меченого флуоресцентной FAM-меткой.

Взаимодействие анти-EGFR ДНК-аптамеров со стандартными линейными клетками глиобластомы U87 оценивали методом проточной цитофлуориметрии (рисунок 26). Аптамеры содержали флуоресцентную метку FAM на 5'-конце.

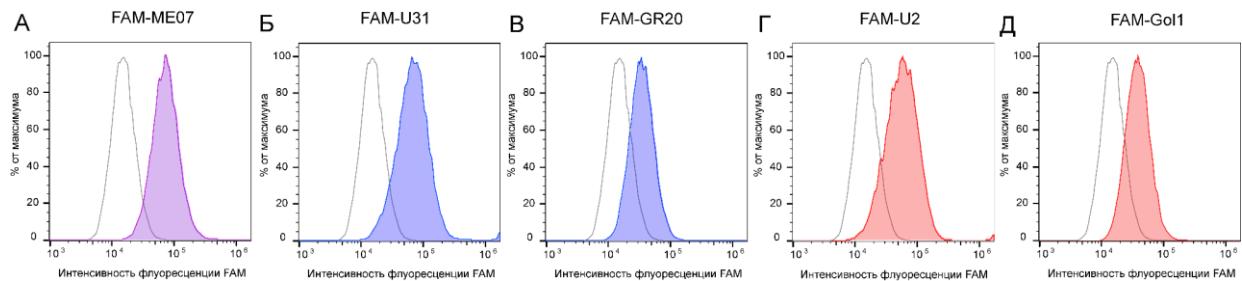


Рисунок 26 - Проточная цитометрия стандартных клеток глиобластомы U87 после инкубации с FAM-меченными аптамерами: А) 2'F-Pyr-PHK ME07, ДНК; Б) U31, В) GR20, Г) U2, Д) Gol1; автофлуоресценция клеток показана серым

Исходные длинные анти-EGFR ДНК-аптамеры U31 и U2 взаимодействовали со стандартными клетками линии глиобластомы U87 примерно с равной эффективностью: средние значения интенсивности флуоресценции (СЗИФ) клеток после инкубации с 1 μM ДНК-аптамеров U31 и U2 практически совпадали (рисунок 26). Более того, СЗИФ взаимодействия анти-EGFR аптамеров различной химической природы, 2'FY-PHK-аптамера FAM-ME07 и ДНК-аптамеров FAM-U31 и FAM-U2 также практически совпадали.

В отличие от длинных ДНК-аптамеров U31 и U2 взаимодействие оригинальных коротких ДНК-аптамеров GR20 и G011 с клетками U87 происходит несколько менее эффективно по сравнению с исходными длинными ДНК-аптамерами U31 и U2, что не соответствует соотношению значений равновесных кажущихся констант диссоциации комплекса аптамер-белок EGFR для коротких и длинных ДНК-аптамеров (Рисунок 26). Возможно, снижение амплитуды сигнала проточной цитометрии объясняется унификацией конформационного состава в случае коротких аптамеров, уменьшением возможностей разнообразия вторичных структур при уменьшении длины аптамеров.

Таким образом, аптамеры, будучи эффективными узнавающими элементами, проявляют аффинность как к рекомбинантному белку внеклеточному домену рецептора эпидермального фактора роста, так и к EGFR-положительным стандартным линейным клеткам. Специфичность связывания FAM-ME07 с рецептором на клетках подтверждена проточной цитометрией, определен параметр аффинности - концентрация полусыщения для аптамера FAM-ME07 с EGFR-положительными клетками A431. Показана возможность полу количественной оценки числа молекул EGFR для линий опухолевых клеток, имеющих различную представленность рецептора EGF: A431 (10^6 копий на клетку), U87 (10^4 копий на клетку), MCF7 (10^3 копий на клетку).

Аптамеры различной химической природы, 2'F-Pyr-RНК- и ДНК-аптамеры, взаимодействуют с EGFR-положительными стандартными клетками линий, в том числе и клетками линии глиобластомы U87. При этом экспериментально показана сходная эффективность взаимодействия анти-EGFR аптамеров различной химической природы. Между длинными и короткими анти-EGFR ДНК-аптамерами при взаимодействии с клетками U87 наблюдается явное различие. Это различие совместно с различием аффинностей аптамера ME07 к белку и к EGFR-экспрессирующими клеткам дает основание предположить вклад различных типов взаимодействий в сигнал аптамеров, взаимодействующих с клетками.

3.1.4. Взаимодействие анти-EGFR 2'F-Pyr-РНК-, ДНК аптамеров с клетками перевиваемых культур ГБ пациентов 107, G01 и Sus/fP2¹⁰

Экспрессия мРНК EGFR в исследуемых клетках ПКГБП

Анализ уровня транскриптов EGFR клеток культур ГБ пациентов был выполнен совместно с сотрудниками НИМЦ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко, данные были нормированы на уровень мРНК в клетках культуры G01. Для сравнения на рисунке 27 приведено относительное количество мРНК EGFR для стандартной линии глиобластомы U87.

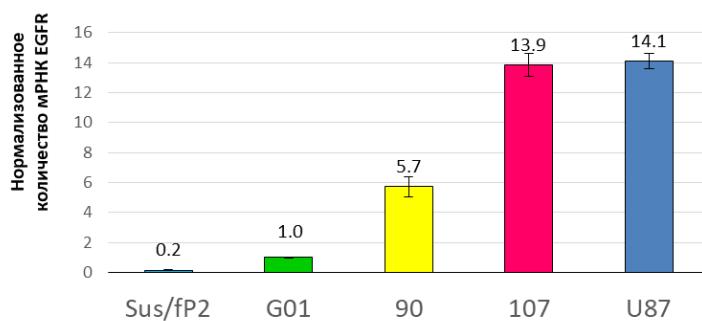


Рисунок 27 -Экспериментально определенное относительное количество мРНК EGFR в клетках ПКГБП: Sus/fP2, G01, 90, 107, стандартной линии клеток U87

Экспериментально определенное относительное количество мРНК EGFR в клетках культур глиобластом сравнивали с уровнем в клетках U87. Относительное количество мРНК EGFR в клетках перевиваемой культуры ГБ пациента Sus/fP2 было крайне низким, мРНК EGFR практически отсутствовала в этих клетках. Относительное количество мРНК EGFR в клетках культуры ГБ пациента 107 было довольно высоким и соответствовало уровню мРНК EGFR в клетках стандартной линии ГБ U87. Для дальнейшей работы были выбраны три образца клеток перевиваемых культур из ГБ пациентов с различным относительным количеством мРНК EGFR с соотношением 0,2 : 1 : 6 : 14 для ПКГБП Sus/Pf2, G01, 90 и 107 соответственно.

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

Взаимодействие различных анти-EGFR аптамеров с различными клетками перевиваемых культур ГБ из постоперационных образцов пациентов оценивали методом проточной цитофлуорометрии в унифицированных условиях. Концентрация

¹⁰ При подготовке данного раздела диссертации использована публикация [2] выполненная в соавторстве и указанная во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

аптамера является критическим параметром для сопоставления результатов анализа с помощью проточной цитофлуориметрии. С одной стороны, чтобы упростить скрининг различных типов клеток, аптамер должен быть в избытке, чтобы гарантировать насыщение связывания EGFR. С другой стороны, избыток аптамера может приводить к поглощению флуоресцентно-меченного аптамера мембраной, что маскирует сигнал, обусловленный EGFR. Наиболее эффективно взаимодействующий со стандартными линейными клетками 2'F-Pyr-PHK-аптамер ME07 связывается с клетками сверхэкспрессирующей EGFR линии A431 с аффинностью, выраженной как концентрация полунасыщения, составляющей 130 нМ. В данном исследовании для анализа всех клеточных линий и всех первичных клеточных культур использовалась постоянная концентрация флуоресцентно-меченых аптамеров, равная 1 мкМ. Такой выбор позволяет анализировать клетки в присутствии избытка аптамера, что дает основание для интерпретации сигнала проточной цитометрии среднего значения интенсивности флуоресценции (СЗИФ) клеток в контексте взаимодействия с аптамером.

Два Су5-меченные 2'-F-Pyr-PHK-аптамера - 48 нт ME07 и 39 нт CL4 протестировали на клетках ПКГБП. При использовании флуоресцентного красителя цианина-5 (Су5, максимум эмиссии 662 нм) спектр эмиссии флуоресценции флуоресцентно-меченого аптамера меньше перекрывался со спектром эмиссии автофлуоресценции собственных белков клетки, а также за счет большей стабильности флуорофора сигналы клеток, инкубированных с одним и тем же аптамером в случае использования Су5-метки оказывались гораздо сильнее сдвинуты в область больших значений интенсивности флуоресценции, чем при использовании метки FAM.

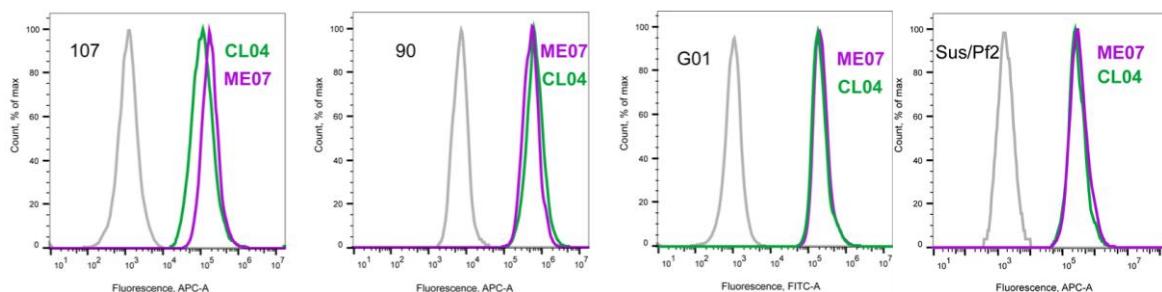


Рисунок 27 - Проточная цитофлуориметрия анти-EGFR 2'F-Pyr-PHK-аптамеров ME07 (фиолетовый) и CL4 (зеленый) с клетками ПРКГБП (А) 107, (Б) 90, (В) G01 и (Г) Sus/fP2.

Клетки перевиваемых культур взаимодействуют с двумя Су5-мечеными 2'F-Pyr-PHK-аптамерами по-разному, сигналы не совпадали с распределением относительного количества мPHK EGFR в клетках ПКГБП. Это подчеркивает важность понимания баланса между взаимодействием анти-EGFR аптамеров с клетками с

участием мишени и адсорбцией на клеточной мемbrane клеток культур ГБ. Для ПКГБП G01 и Sus/fP2 получены очень высокие значения в присутствии Су5-меченных 2'FY-PHK-аптамеров (рисунок 27). Учитывая низкое относительное количество мРНК EGFR в клетках этих ПКГБП, это не EGFR-зависимое взаимодействие. Существенно, что клетки культуры пациента 107 в случае 2'F-Pyr-PHK-аптамеров демонстрируют различное поведение по отношению к разным аптамерам, сигнал клеток 107, инкубированных с анти-EGFR аптамером ME07 сдвигался заметно сильнее, чем для аптамера CL4, что подтверждает специфические свойства самих клеток перевиваемой культуры 107 по отношению к анти-EGFR аптамерам.

ПКГБП 107 после инкубации с анти-EGFR аптамерами CL4 и ME07 дает положительный сигнал. Можно предположить, что для анти-EGFR аптамеров существуют пороговые значения мРНК EGFR, ниже которых целевое мишень-зависимое взаимодействие не дает сигнала. Относительное количество мРНК EGFR для клеток, достоверно узнаваемых анти-EGFR 2'F-Pyr-PHK-аптамерами ME07 и CL4, соответствует клеткам ПКГБП 107.

Были протестированы два коротких FAM-меченых ДНК-аптамера, Gol1 и GR20, обладающие привлекательным балансом структурно-функциональных свойств для дальнейшего применения в биомедицине. ДНК-аптамеры тестировали с флуоресцентной меткой FAM - карбоксифлуоресцеином. Данная метка была использована для детекции взаимодействия анти-EGFR 2'FY-PHK- и ДНК-аптамеров с клетками ПКГБП 107 методом флуоресцентной микроскопии совместно с сотрудниками ИВНД и НФ РАН Дзариевой Ф.М. и Фаб Л.В. (Приложение А5). Таким образом, по сравнению с исследованием 2'F-Pyr-PHK-аптамеров для ДНК-аптамеров меняются и химия олигонуклеотидной основы, и флуоресцентный краситель, не говоря уже о том, что 2'F-Pyr-PHK- и ДНК-аптамеры имеют разное сродство к рекомбинантному EGFR'.

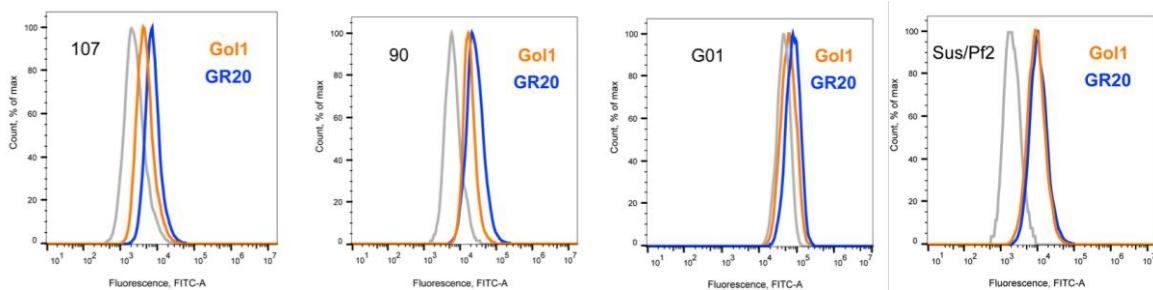


Рисунок 28 - Проточная цитофлуориметрия анти-EGFR ДНК-аптамеров Gol1 (оранжевые линии) и GR20 (синие линии) с клетками ПКГБП 107, 90, G01 и Sus/fP2

Интересно, что клетки ПКГБП взаимодействуют с двумя анти-EGFR FAM-меченными ДНК-аптамерами по-разному, также, как и в случае 2'F-Pyr-RНК-аптамеров, не согласуясь с относительным количеством мРНК EGFR. Удивительно четко прослеживается разница во взаимодействии двух FAM-меченых ДНК-аптамеров GR20 и G01 с клетками ПКГБП 107, аптамер GR20 дает явно более сильный сдвиг сигнала проточной цитометрии, чем аптамер G01. Инкубация клеток с аптамерами при проведении проточной цитофлуориметрии продолжалась 30 мин. Более длительная инкубация FAM-меченых аптамеров с клетками, в течение 180 мин, приводила к более яркому сигналу флуоресценции от аптамера G01 по сравнению с аптамером GR20 на фотографиях микроскопии (Приложение А5). Причины такого различия пока не выяснены.

Среднее значение интенсивности флуоресценции для инкубированных с анти-EGFR 2'FY-RНК- и ДНК-аптамерами клеток Sus/fP2, имеющими низкий уровень EGFR, выше, чем СЗИФ для случая 107 клеток, имеющих высокий уровень EGFR. Единственное разумное объяснение - EGFR-независимое мембранные взаимодействие FAM-меченых 2'F-Pyr-RНК- и ДНК-аптамеров с клетками Sus/Pf2, являющееся уникальным свойством этой ПКГБП. Это подчеркивает важность понимания баланса между связыванием аптамеров мишенью, EGFR, и адсорбцией на клеточной мембране при взаимодействии аптамеров с клетками ГБ.

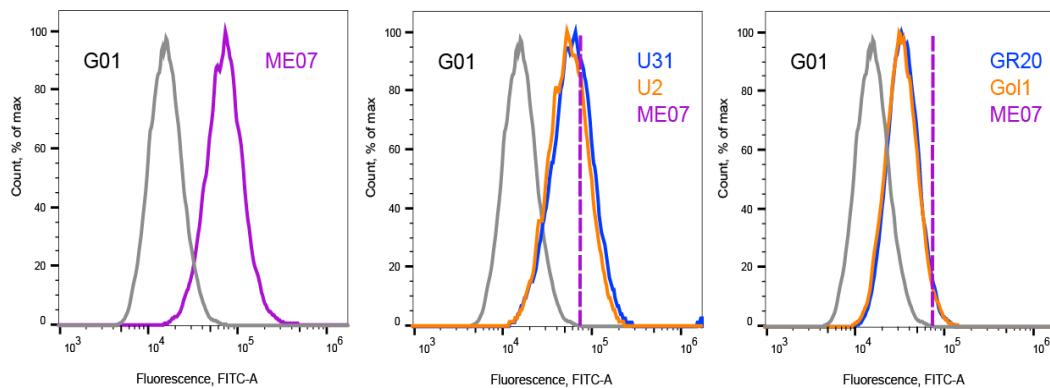


Рисунок 29 - ПЦФ с клетками ПКГБП G01: (А) - 2'F-Pyr-RНК-аптамера ME07; (Б) - ДНК-аптамеры U31 (синяя линия) и U2 (оранжевая линия); (В) - короткие ДНК-аптамеры GR20 (синяя линия) и G01 (оранжевая линия), СЗИФ клеток G01 с аптамером ME07 показан штриховой линией, автофлуоресценция клеток показана серым

Относительное количество мРНК EGFR в клетках перевиваемой первичной культуры G01 [169-171] на порядок ниже, чем в линейных клетках U87 (рисунок 27). Флуоресцентно меченный 2'F-Pyr-RНК FAM-ME07 взаимодействовал с клетками ПКГБП G01, при этом СЗИФ соответствовало эффективности, наблюдавшейся на

линейных клетках U87 (рисунок 27, рисунок 29). Исходные длинные ДНК-аптамеры U31 и U2 также эффективно взаимодействовали с клетками культуры G01. Короткие ДНК-аптамеры GR20 и G01 взаимодействовали с клетками ПКГБП G01, однако наблюдаемые СЗИФ, так же, как и в случае линейных клеток U87, оказывались немного ниже, чем для исходных длинных ДНК-аптамеров U31 и U2 (рисунок 29). Уровни сигнала проточной цитометрии для инкубированных с анти-EGFR аптамерами клеток G01 совпадает с СЗИФ клеток U87, в то время как относительное количество мРНК EGFR клеток ПКГБП G01 на порядок более низкое по сравнению с линейными клетками U87. Можно предположить, что аптамеры взаимодействуют с ПКГБП G01 EGFR-независимо, что маскирует специфическое взаимодействие с EGFR, как это было замечено ранее. Тогда образование комплекса анти-EGFR аптамера с поверхностью клетки является суммой результатов событий, обусловленных связыванием мишени аптамера, маркера EGFR, наряду с которым происходит взаимодействие нуклеиновой кислоты с мембранный опухолевой клетки.

Необходимо отметить, что узнавание рецептора на клетке с использованием набора различных аптамеров позволяет получить информацию о статусе рецептора, комплексном факторе включающем как количественное наличие рецептора на поверхности клетки, так и качественные параметры, такие как, например, наличие мутаций, делеций, пост-трансляционных модификаций, конформацию рецептора, наличие связанного лиганда, димеризацию и т.д. Прямое взаимодействие анти-EGFR аптамеров с клетками ГБ представляет собой попытку оценить статус рецептора для сложной поверхности клетки. Способом решения задачи оценки статуса рецептора, имеющего фоновое мембранные связывание, является изучение поведения набора аптамеров, имеющих как различную химическую природу (ДНК, 2'F-РУГ-РНК), так и различное селекционное происхождение.

Аптамеры, полученные из различных процедур селекции, демонстрировали различные сигналы с EGFR-положительными клетками ПКГБП (ME07 и CL4), одна и та же процедура отбора дает аптамеры со сходным сродством (U2 и U31). Интересным оказывается поведение двух различных коротких аптамеров GR20 и G01, полученных в результате разных протоколов сокращения нуклеотидной последовательности: в случае GR20 сохранялась нуклеотидная последовательность исходного аптамера U31, в то время как в случае G01 стабилизирована наиболее вероятная предполагаемая вторичная структура U2. Короткий ДНК-аптамер GR20 давал большие СЗИФ при взаимодействии с клетками ПКГБП 107, чем искусственный ДНК-аптамер G01. В данной работе клетки перевиваемой культуры ГБ пациента 107 показали различный

результат при взаимодействии с различными 2'F-Pyr-RНК- и ДНК-аптамерами, что может быть обусловлено либо различием в сайтах связывания разных аптамеров, либо разной аффинностью аптамеров к различным вариантам EGFR, возможно присутствующим на поверхности клеток ПКГБП. Уникальная возможность иметь реальную приближенную к клиническим клеточную модель позволяет изучить многие аспекты связывания аптамеров с клетками ГБ. Открытие такого поведения перевиваемой культуры клеток ГБ 107 дает возможность расширить дальнейшее изучение деталей связывания с EGFR и адсорбции на клеточной мембране при взаимодействии аптамеров с клетками ГБ, включая, например, эксперименты конкуренции специфического и неспецифического связывания, скрининг и дифференциальное добавление различных аптамеров, исследование последующих этапов эндоцитоза и трансцитоза, аптахистохимия - аспекты, которые очень важны для аптатераностики ГБ и терапевтического применения нуклеиновых кислот в целом.

Исследование клеток перевиваемых культур глиобластом пациентов - необходимый шаг для трансляции аптамеров, наиболее ярко демонстрирующий преимущества и недостатки применения аффинных агентов на наиболее приближенной к реальной опухоли пациента модели. Сложность модели перевиваемой культуры совокупно с применением нового аффинного агента обуславливает необходимость разработки подходящих протоколов использования, основания для которых подготовлены результатами, представленными в настоящей работе.

3.1.6 Заключение по анти-EGFR аптамерам

Получены следующие результаты для анти-EGFR аптамеров применительно к рекомбинантному внеклеточному домену EGFR' и положительным по EGFR клеткам.

1. ДНК-аптамеры и 2'F-Рур-РНК-аптамеры взаимодействуют с рекомбинантным EGFR' со сравнимой аффинностью: K_D составляют 10-30 нМ, при этом для ДНК-аптамеров константы скорости ассоциации и диссоциации k_{on} и k_{off} ниже в 5-10 раз. Короткие аптамеры Goll и GR20 сохраняют аффинность к рекомбинантному внеклеточному домену EGFR'. При укорочении U2 до U2s аффинность аптамера к EGFR снижается за счет падения скорости ассоциации, но может быть восстановлена при введении в U2s нуклеотидных замен, давая Goll.

2. Эффективность взаимодействия 2'F-Рур-РНК-аптамера ME07 с клетками линий коррелирует с представленностью EGFR на поверхности клеток. Проточная цитометрия позволяет идентифицировать связывание анти-EGFR аптамеров с клетками. Измерен параметр связывания аптамер–клетка для 2'F-Рур-РНК-аптамера ME07 с клетками A431, концентрация полунасыщения, $C_p = 130$ нМ.

3. В случае клеток перевиваемых культур из глиобластом пациентов (ПКГБП) взаимодействие анти-EGFR аптамеров с клетками может происходить не только за счет взаимодействия с мишенью, особенно малопредставленного EGFR, как например, в случае ПКГБП Sus/fP2, а по неизвестному механизму. Установлено пороговое значение относительного количества мРНК EGFR для однозначного дифференцирования EGFR+ клеток ПКГБП, оно соответствует уровню мРНК EGFR в клетках линии U87.

3.2 Анти-CD133 аптамеры

3.2.1 Предполагаемые вторичные структуры анти-CD133 аптамеров¹¹

Известные анти-CD133 аптамеры, выбранные для исследования, имели приемлемую длину от 15 до 72 нуклеотидов, и не требовали сокращения нуклеотидной последовательности (Таблица 2).

Для исследуемых анти-CD133 аптамеров был проведен анализ возможности образования вторичных структур (Рисунок 37). Короткие 2'F-Руг-РНК-аптамеры A15 и B19 могут образовывать короткие шпильки с длиной стема в 4 и 5 пар нуклеотидов соответственно.

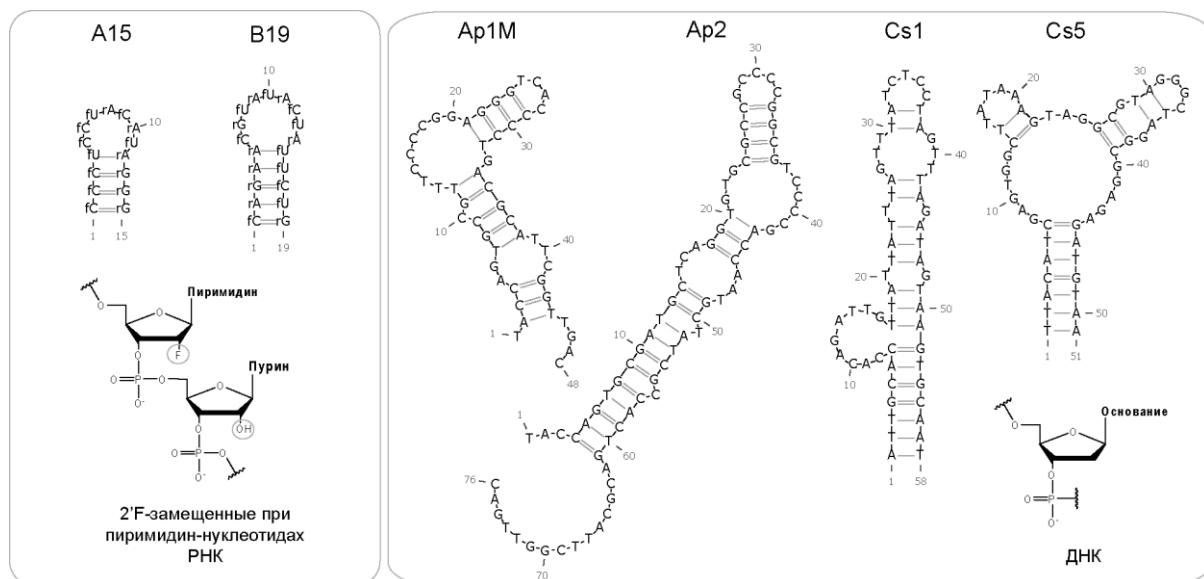


Рисунок 37 - Возможные вторичные структуры исследуемых анти-CD133 аптамеров, полученные для опубликованных нуклеотидных последовательностей с помощью алгоритма ViennaRNA [172]

ДНК-аптамеры имели больше возможностей для образования вторичных структур. Анти-CD133 аптамеры Ap1M и Ap2 представляли собой наборы нескольких слабых шпилечных структур из 3-4-х пар нуклеотидов сформированных основаниями нуклеотидов средней части последовательности, аптамер Ap2 стабилизирован образованием шпильки из четырех GC-пар, ограничивающей петлю из цитидинов. Аптамеры Cs1 и Cs5, напротив, представляли собой набор слабо структурированных петель, ограниченных дуплексами от одной до трех пар комплементарных нуклеотидов

¹¹ При подготовке данного раздела диссертации использована публикация [1], выполненная в соавторстве и указанная во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

в середине аптамера, в то время как концевые шпильки аптамеров Cs1 и Cs5 содержали по 7 пар нуклеотидов (Рисунок 37).

Использование алгоритмов анализа возможности образования вторичных структур нуклеиновых кислот, ДНК и 2'F-Рур-РНК, не может дать полной информации о трехмерной организации аптамера, однако это ценный инструментарий, позволяющий выдвигать предположения о сборке и стабильности аптамера, об участках аптамера, отвечающих за узнавание аптамерами их мишени, прогнозировать поведение аптамера при физиологических условиях. Анализ известных анти-CD133 аптамеров показал, что исследуемые аптамеры способны образовывать стабилизирующие вторичные структуры, однако вторичные структуры анти-CD133 аптамеров образованы небольшим количеством пар комплементарных нуклеотидов и слабой стабильны, как следствие, прямая экспериментальная детекция образования структур анти-CD133 аптамеров осложнена и представляет собой отдельную задачу, выходящую за рамки настоящего исследования.

3.2.2 Взаимодействие анти-CD133 2'F-Рур-РНК-, ДНК-аптамеров с клетками CD133+ стандартных линий Сасо-2 и НСТ116¹²

Для трансмембранных белка CD133 не показана возможность образовывать стабильный отдельный структурированный домен из аминокислотных последовательностей внеклеточных петель, что означает, что для связывания с анти-CD133 аптамерами белок может быть собран только в составе мембраны клетки. По этой причине и описанные в литературе, и предпринятое нами исследование анти-CD133 аптамеров проводилось на клетках. В качестве модельных клеток для исследования анти-CD133 аптамеров в настоящей работе использовали преимущественно линию клеток колоректальной аденокарциномы Сасо-2. Уровень экспрессии мРНК CD133 в клетках линии Сасо-2 высокий, один из максимальных среди не только рассматриваемых в настоящей работе, но и среди всех каталогизированных стандартных клеточных линий [173].

Экспрессия мРНК CD133 в исследуемых линейных клетках

Для клеток стандартной линии колоректальной аденокарциномы Сасо-2 была определена экспрессия мРНК CD133 с помощью двух наборов праймеров, 1-CD133 и 2-CD133 (рисунок 38).

¹² При подготовке данного раздела диссертации использована публикация [1], выполненная в соавторстве и указанная во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

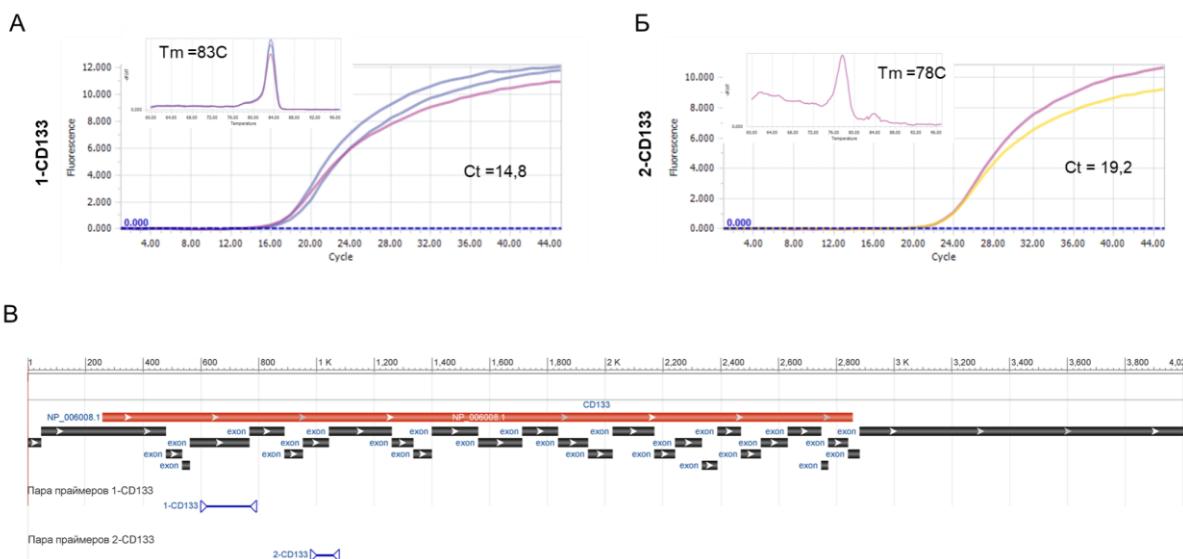


Рисунок 38 – Сравнение кривых амплификации кДНК мРНК CD133 в клетках Сaco-2 при определении с помощью двух наборов праймеров, обозначенных 1-CD133 (А) и 2-CD133 (Б); (В) - соотнесение транскрипта мРНК NM_006017.3 с отмеченными стыками экзонов и транслируемой в белок областью (верхняя панель, красная лента - белок, средняя панель, серые ленты - мРНК) с положениями отжига праймеров 1-CD133 (верхняя синяя линия) и 2-CD133 (нижняя синяя линия)

Сигнал амплификации кДНК CD133 в модельных линейных клетках Сaco-2, определяемый двумя наборами праймеров, заметно различался. Праймеры 1-CD133 отжигаются в области кДНК CD133, соответствующей участку мРНК CD133, транслируемому во вторую внутриклеточную петлю белка CD133, в то время как праймеры 2-CD133 дают продукт ПЦР с участка мРНК CD133, который соответствует первой внеклеточной петле CD133. Праймеры 2-CD133 давали на порядок меньшую эффективность амплификации, что могло происходить вследствие возможной ошибки синтеза 3'-концевого праймера (рисунок 38).

Настоящая работа нацелена на исследование аптамеров в контексте аптатерапии глиом. Однако для клеток линий глиом, например, линий ГБ U251 и U87, документирована крайне низкая экспрессия CD133 (рисунок 38А). Исследование экспрессии мРНК CD133 с использованием пары праймеров 1-CD133 на доступных линиях клеток А431, MCF7, U87, Сaco-2, давало результаты, сопоставимые с опубликованными данными (рисунок 39Б).

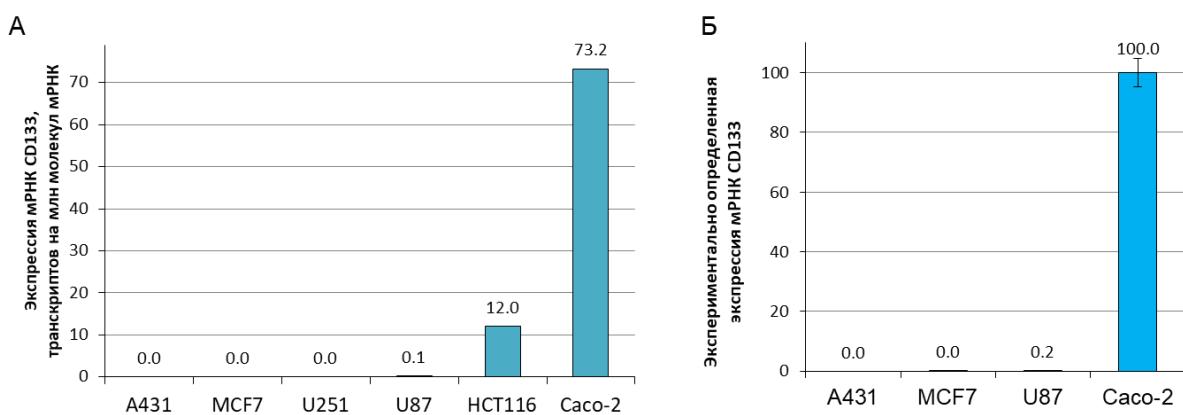


Рисунок 39 – Экспрессия мРНК CD133 в клетках различных линий: А - согласно данным *The Human Protein Atlas* [173]; Б - экспериментально определенная кПЦР с использованием выбранных праймеров 1-CD133, нормализованная на уровень мРНК CD133 в клетках Caco-2, принятый за сто

Таким образом, на нескольких типах клеток была валидирована система оценки экспрессии мРНК CD133 в образцах кДНК исследуемых клеток.

Взаимодействие анти-CD133 2'F-Рур-РНК-, ДНК-аптамеров с клетками CD133+ стандартных линий Caco-2 и HCT116

В качестве модельных клеток для исследования анти-CD133 аптамеров использовали традиционные для исследования CD133 линии клеток колоректальной карциномы HCT116 и колоректальной аденокарциномы Caco-2. Уровень экспрессии мРНК CD133 в клетках Caco-2 примерно на порядок выше, чем в клетках HCT116 (рисунок 39). При тестировании клеток Caco-2 и HCT116 с антителами к CD133, коньюгированными с флуоресцентным белком аллофикациином (APC), в обоих случаях наблюдали положительный сдвиг сигнала флуоресценции клеток (рисунок 40). Разница в сдвигах для клеток Caco-2 и HCT116 коррелирует с разницей в уровнях экспрессии мРНК CD133: для клеток Caco-2 сдвиг сигнала с антителами более выражен и статистически значимо различается от сигнала автофлуоресценции клеток, в то время как сдвиг сигнала флуоресценции клеток HCT116 с антителами не был статистически отличен от сигнала автофлуоресценции клеток HCT116 (рисунок 40).

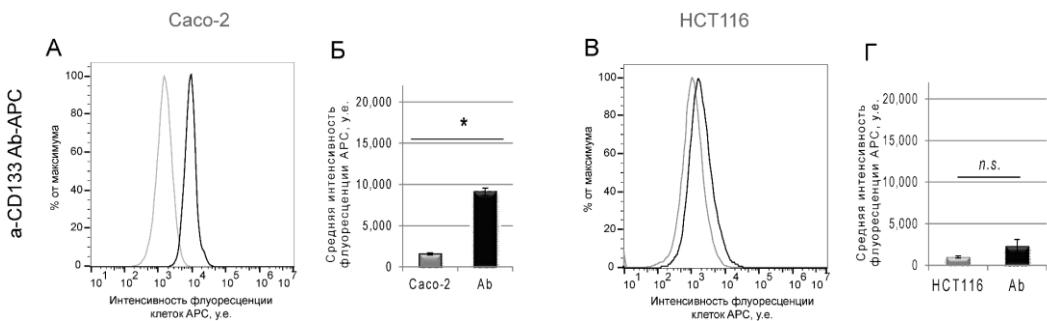


Рисунок 40 - Данные проточной цитометрии взаимодействия клеток линий Caco-2 (А, Б) и HCT116 (В, Г) с APC-меченными антителами к CD133; клетки инкубировали с раствором антител согласно рекомендации производителя антител при комнатной температуре в течение 1 часа в темноте; на гистограммах (Б, Г) представлены статистические данные, п.с. - не значимое различие, * - $p<0.05$

Интересно отметить, уровень CD133 для стандартных клеток HCT116 оказывается граничным для детекции CD133 на поверхности клетки с помощью антител.

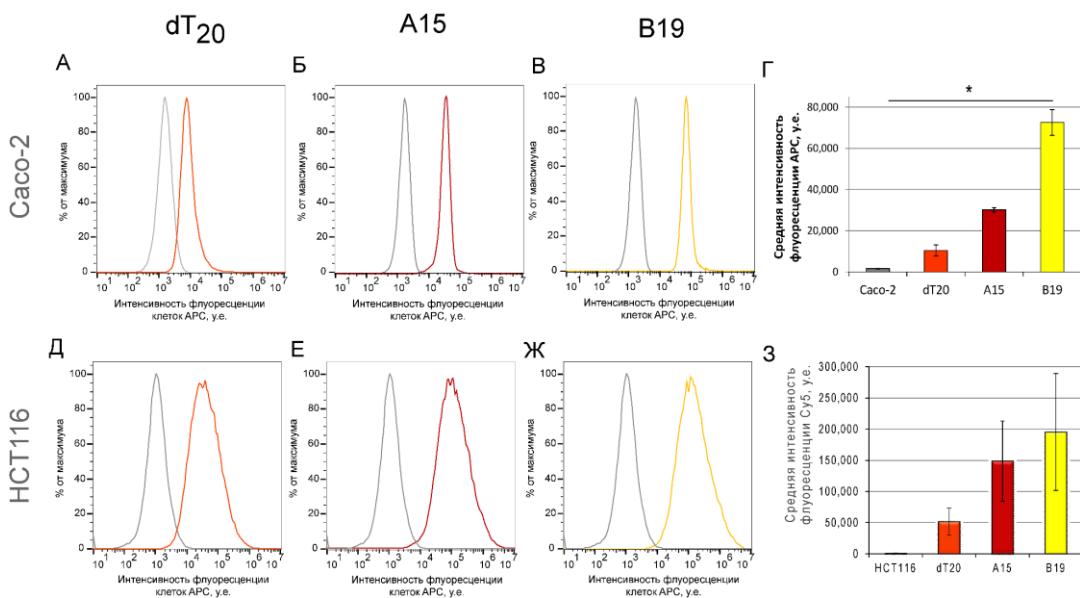


Рисунок 41 - Данные проточной цитометрии взаимодействия клеток линий Caco-2 (А-Г) и HCT116 (Д-З) с Су5-меченными олигонуклеотидами, неаптамерным ДНК-олигонуклеотидом dT₂₀ (А, Д), 2'-F-замещенными по тиримидин-нуклеотидам РНК-аптамерами A15 (Б, Е) и B19 (В, Ж); клетки инкубировали в растворе 1 мкМ олигонуклеотида при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте; на гистограммах (Г, З) представлены статистические данные, * - $p<0.05$

2'F-Pyr-RНK-аптамеры A15 и B19 [149] давали сдвиг сигнала флуоресценции клеток для обеих исследуемых линий, более того, для клеток HCT116 несмотря на более низкий уровень мРНК CD133 по сравнению с клетками Caco-2, мы наблюдали более сильные сдвиги сигнала (рисунок 41). Тестирование неаптамерного ДНК-

олигонуклеотида dT₂₀ с той же флуоресцентной меткой Cy5, детектируемой в канале APC проточного цитофлуориметра, показало, что Cy5-меченные олигонуклеотиды могут окрашивать клетки, причем в случае HCT116 сдвиг интенсивности флуоресценции клеток после инкубации с неаптамерным Cy5-меченым олигонуклеотидом был почти на порядок сильнее, чем для клеток Caco-2 (рисунок 41).

Об анти-CD133 ДНК-аптамерах известно мало. Чтобы получить информацию, позволяющую сопоставить ДНК-аптамеры с 2'F-Pyr-РНК-аптамерами A15 и B19, мы аналогичным образом протестировали ДНК-аптамеры серий Cs [151] и Ap [152]. Возможные вторичные структуры ДНК-аптамеров Ap1M, Ap2, Cs1 и Cs5 представлены на рисунке 37. Мы исследовали взаимодействие FAM-ДНК-аптамеров с клетками Caco-2 и HCT116 (рисунок 41). Клеточные линии имеют разное количество мРНК CD133; для Caco-2 количество мРНК CD133 почти на порядок выше, рисунок 39 [173]. Для обеих стандартных клеточных линий наблюдались сдвиги сигнала интенсивности флуоресценции клеток после инкубации с флуоресцентно-меченными аптамерами. Клетки Caco-2 практически не взаимодействовали с неаптамерным олигонуклеотидом FAM-NADO (рисунок 42А), значение средней интенсивности флуоресценции клеток Caco-2 после инкубации с FAM-NADO составляло 2500 у.е. и не имело значимого различия со значением автофлуоресценции клеток Caco-2, которое составляло 2300 у.е. Для клеток Caco-2 значения средней интенсивности флуоресценции составили 3800 у.е. для клеток, инкубированных с FAM-Ap1M, и 4400 у.е. для клеток с FAM-Cs5 (рисунок 42А, В, D), при этом статистически отличны от значений интенсивности флуоресценции клеток, инкубированных с неаптамерным олигонуклеотидом NADO (рисунок 42Л).

В случае инкубации клеток HCT116 с FAM-меченым неаптамерным олигонуклеотидом NADO наблюдалось слабое взаимодействие, средний сигнал интенсивности флуоресценции, 2800 у.е. значимо отличался от значения сигнала автофлуоресценции клеток HCT116, 1700 у.е. Однако и средние значения интенсивности флуоресценции для клеток HCT116 после инкубации с аптамерами были больше: 6 500 у.е. для клеток HCT116, инкубированных с FAM-Ap1M, и 5 200 у.е. для клеток с FAM-Cs5 (рисунок 42Ж, К). Результаты для взаимодействия клеток Caco-2 и HCT116 с FAM-меченными аптамерами Ap2 и Cs1 были схожи с уже описанными ранее результатами для Ap1M и Cs5, как показано на рисунке 42.

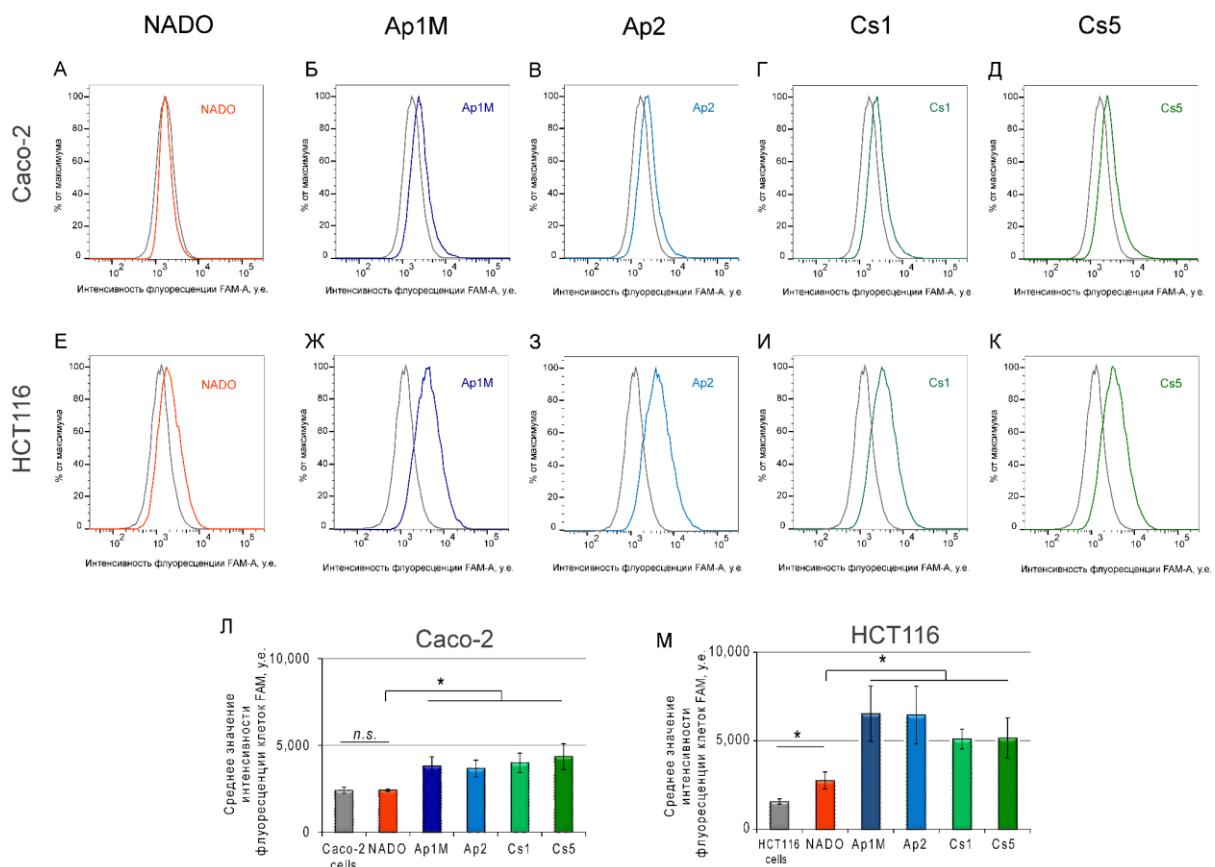


Рисунок 42 – Данные проточной цитометрии клеток Caco-2 (А-Д) и HCT116 (Е-К) после инкубации с FAM-меченным неаптамерным олигонуклеотидом (А, Е) и FAM-меченными анти-CD133 ДНК-аптамерами: Б, Ж - Ap1M, В, З - Ap2, Г, И - Cs1, Д, К - Cs5; концентрация олигонуклеотидов для эксперимента составляла 1 мкМ, инкубация проводилась при комнатной температуре в темноте; Л, М - количественное сравнение интенсивностей флуоресценции, ns - не значимое различие, * - p<0.05

Взаимодействие FAM-ДНК-аптамеров Ap1M, Ap2, Cs1, Cs5 с клетками стандартной линии Caco-2 приводило к сдвигу сигнала вправо (рисунок 42Б-Д). В случае контрольного неаптамерного ДНК-олигонуклеотида (FAM-NADO, рисунок 42А) сдвига сигнала не наблюдалось. Взаимодействие ДНК-аптамеров с клетками линии HCT116, несмотря на меньшее количество мРНК CD133, приводило к еще большему сдвигу, а также к уширению гистограмм (рисунок 42Ж-К), что, вероятно, связано с нецелевыми мембранными ассоциированными событиями. Таким образом, аномальная тенденция взаимодействия FAM-ДНК-аптамеров с клетками линий, подобная наблюдавшейся для Су5-меченых 2'F-Pyr-RНК-аптамеров A15 и B19, сохранилась, несмотря на различия в химической природе как основы, так и флуоресцентной метки. Поведение неаптамерных олигонуклеотидов FAM-NADO и Су5-dT₂₀ закономерно вписывается в эту тенденцию.

3.2.3 Взаимодействие анти-CD133 2'F-Pyr-РНК-, ДНК-аптамеров с клетками ПКГБП 107, G01 и Sus/fP2¹³

Важно использовать перевиваемые клеточные культуры ГБ пациентов для тестирования аптамеров, поскольку поведение линий клеток значительно отличается от поведения клеток опухоли. Сравнение свойств уже открытых аптамеров крайне важно проводить из-за различий в условиях отбора и применения аптамеров. Первые попытки сравнения аптамеров уже были предприняты [148]. Аптамерный Консорциум, ассоциация, объединяющая исследовательские группы аптамеров по всему миру, работает над рекомендациями по унификации этого вопроса [147]. Проточная цитометрия, при всех ограничениях накладываемых на методы, использующие флуоресценцию, является предпочтительным количественным методом для изучения взаимодействия аптамеров с клетками. Кроме того, для исследований опухолей крайне важно использовать уникальные перевиваемые культуры клеток из ГБ пациентов. Около двухсот публикаций описывают применение проточной цитометрии для изучения CD133 на клетках ГБ, и только несколько из них посвящены использованию аптамеров, и ни в одной нет использования перевиваемых опухолевых культур ГБ. Стоит отметить, что применение аптамеров в биомедицине строго ограничивает условия эксперимента, например, исключает наличие дополнительных конкурирующих агентов, в отличие от обычных исследований аптамеров, которые сосредоточены на измерении аффинности и специфичности [149]. Поэтому валидация аптамеров и тестирование их взаимодействия с клетками на моделях, приближенных к реальной опухоли, крайне важны.

Одним из основных направлений в развитии таргетной терапии опухолей является тераностика - сочетание диагностики и терапии. В иммунотераностике антитела используются в качестве молекулярных распознающих элементов (МузЭли) для обнаружения молекулярных онкомаркеров в опухолях, а затем конъюгаты антитело-лекарство используются для уничтожения клеток-мишеней. Ярким и успешным примером тераностики является нацеливание на онкомаркер EGFR-2 [174].

Рассматривая возможности применения тераностики, гетерогенную опухоль можно условно классифицировать как содержащую различные типы клеток. Активно пролиферирующие клетки имеют как высокую представленность клеток, так и большое количество маркеров на клетку, поскольку они ответственны за рост опухоли.

¹³ При подготовке данного раздела диссертации использованы публикации [1], выполненные в соавторстве и указанные во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

Для «спящих» опухолевых стволовых клеток (ОСК) или стволовых клеток глиобластомы (СКГ) пока не существует единого мнения о наборе молекулярных маркеров. Поэтому очень важно разработать новые методы и подходы для тераностики ОСК, включая разработку новых МузЭли, таких как скаффолды и аптамеры. Выбирая CD133 в качестве маркера для настоящего исследования, мы понимаем, что как количество CD133+ клеток, так и количество CD133 *на* клетку в клетках опухоли может быть низким, не говоря уже о внутриклеточной локализации маркера CD133. Аптораностика требует понимания прямого взаимодействия аптамеров с CD133 на клетках. Кроме того, прогресс в тераностики с использованием новых МузЭлей может помочь идентифицировать новые типы опухолевых клеток, как это показано в настоящем исследовании.

Относительное количество мРНК CD133 в исследуемых клетках ПКГБП

Для образцов клеток исследуемых культур было определено относительное количество мРНК CD133 с помощью праймеров, показавших лучший результат на модельных клетках культуры Caco-2 (рисунок 43).

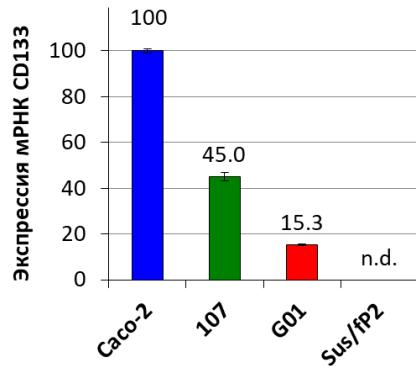


Рисунок 43 – Относительное количество мРНК CD133 в различных клетках Caco-2, ПКГБП: 107, G01 и Sus/fP2. Данные нормированы на значение экспрессии мРНК CD133 в клетках Caco-2, принятое за 100

По сравнению со стандартной линией клеток Caco-2, уровень экспрессии мРНК CD133 в клетках культуры глиобластомы пациента 107 был ниже более чем в 2 раза. Из исследуемых перевиваемых культур уровень экспрессии мРНК CD133 был ниже на порядок в клетках G01. В клетках культуры Sus/fP2 уровень мРНК CD133 был настолько низким, что не детектировался с помощью используемого исполнения кПЦР.

Детекция положительных по CD133 опухолевых клеток реализована в ряде успешных работ [135, 175, 176].

Клетки культуры 107 демонстрировали наибольший уровень экспрессии мРНК CD133, в клетках Sus/fP2 экспрессия мРНК CD133 отсутствовала. Сравнение полученных результатов экспрессии мРНК исследуемого маркера CD133 образцов культур клеток со стандартными линейными клетками Caco-2 показало, что экспрессия мРНК CD133 в клетках линии Caco-2 в разы превосходила уровни мРНК CD133 клеток культур глиобластом. В случае клеток культур глиом уровни CD133 могут значительно различаться для разных клеток культур ГБ.

Взаимодействие анти-CD133 антител с клетками ПКГБП 107, G01 и Sus/fP2

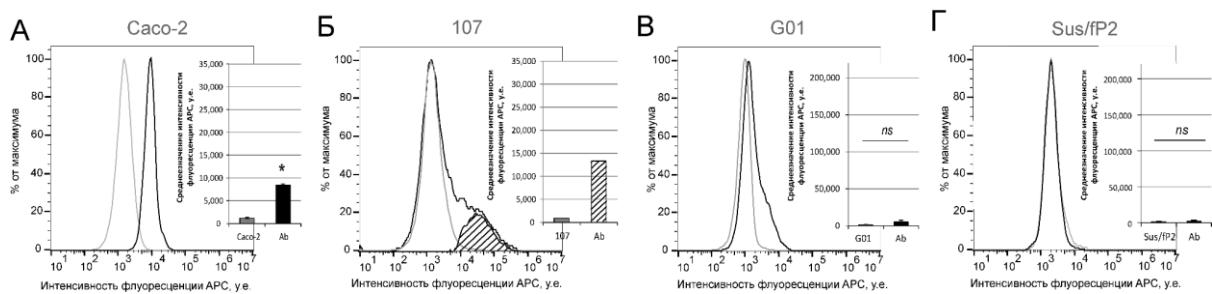
Интересно сравнить данные о экспрессии мРНК CD133 с представленностью маркера CD133 на поверхности. Для этого клетки культур инкубировали с флуоресцентно-меченными антителами к CD133, после чего оценивали сигнал методом проточной цитофлуориметрии (рисунок 44). Антигеном для выбранных для анализа антител к CD133 служил пептидный фрагмент второй, считая от N-конца, внеклеточной петли белка CD133, AC133 [177]. В качестве оценочных были взяты количества мРНК CD133, а не белка. Несмотря на то, что количество белка кажется более разумным, оно дает вариабельные данные из-за различий в процессинге и гликозилировании CD133, полиморфизма антител и дискуссий о функционировании CD133 [1, 4, 134, 178]. Хотя количество транскриптов мРНК CD133 не должно коррелировать с количеством белка, для оценки сценариев взаимодействия оно может быть более удобным. Стандартные клетки Caco-2 имеют высокое количество мРНК CD133. Для клеток перевиваемых культур 107 количество мРНК CD133 было в 2,9 раза больше, чем для клеток перевиваемой культуры G01, а для клеток культуры Sus/fP2 количество мРНК CD133 было ниже предела детекции метода. Взаимодействие антител с клетками Caco-2 давало большой сдвиг флуоресценции клеток (рисунок 44А).

Клетки культуры глиобластомы 107 демонстрировали гетерогенность по CD133. После инкубации с антителами к CD133 клетки 107 давали сложный профиль гистограммы распределения флуоресценции, отвечающий двум субпопуляциям клеток с различной представленностью CD133 на поверхности (рисунок 44). Среднее значение уровня флуоресценции клеток в этом случае теряет смысл и информативным оказывается профиль сигнала проточной цитофлуориметрии.

Для культуры G01 со средними значениями экспрессии мРНК CD133 после инкубации с антителами к CD133 сигнал проточной цитометрии оказался уширенным, что соответствует негомогенной популяции клеток, как и ожидалось для перевиваемой

культуры, полученной из опухоли пациента (рисунок 44). Данные о связывании антител, меченых APC, с CD133 на клетках суммировали в гистограммы, которые приведены справа от результатов проточной цитометрии. Для гетерогенной популяции 107 после инкубации с антителами на гистограмме показан сигнал APC-положительных клеток; эта популяция выделена заштрихованной областью на исходном графике проточной цитометрии. Значения уровня флуоресценции клеток G01 оказались ниже, чем для клеток культуры 107 с более высокой экспрессией мРНК CD133. Для образца G01 было сложно выделить отдельную популяцию APC+ клеток G01, поэтому на гистограмме для G01 показано среднее значение сигнала без разделения на CD133-положительные и CD133-отрицательные клетки.

Если рассматривать клетки культуры Sus/fP2, для которых не было выявлено детектируемой экспрессии мРНК CD133, то в случае инкубации клеток Sus/fP2 с антителами методом проточной цитометрии сигнала также не наблюдалось. Наблюдалась корреляция между количеством мРНК CD133 и средним значением интенсивности флуоресценции клеток после инкубации с флуоресцентными антителами (рисунок 44А-Г).



*Рисунок 44 – Данные проточной цитометрии распределения флуоресценции клеток культур глиобластом пациентов 107, G01, Sus/fP2 после инкубации с флуоресцентно-мечеными APC антителами к CD133. Статистическое представление данных приведено справа от каждого графика: * - p<0.05, n.s. - не значимое.*

Исследуемые культуры ГБ демонстрируют три сценария взаимодействия клеток с антителами. Во-первых, для клеток Caco-2 антитела выявили гомогенную популяцию со смещением сигнала проточной цитометрии вправо (рисунок 44А). Во-вторых, для перевиваемых культур 107 и G01 гистограммы распределения флуоресценции клеток были гетерогенными (рисунок 44Б, В), что обусловлено наличием в культурах популяций клеток с разным содержанием CD133. В-третьих, для клеток перевиваемой культуры Sus/fP2, имеющих ничтожное количество мРНК CD133, сдвиг сигнала проточной цитометрии с антителами к CD133 отсутствует (рисунок 44Г).

**Взаимодействие анти-CD133 2'F-Рур-РНК-, ДНК-аптамеров с клетками ПКГБП
107, G01 и Sus/fP2**

2'F-Pyr-RNК аптамеры

Модифицированные 2'F-Рур-РНК-аптамеры A15 и B19 [149] имеют замещенную на фтор 2'-гидроксильную группу рибозы при пиримидиновых нуклеотидах. Исследование с клетками перевиваемых культур глиобластом проводили для аптамеров A15 и B19, содержащих флуоресцентную метку цианин-5 (Cy5). Флуоресцентный сигнал данной метки детектирован в канале APC прибора проточного цитофлуориметра. Для выявления неспецифических взаимодействий в настоящей работе взаимодействие аптамеров A15 и B19 сравнивали с поведением неаптамерного 2'F-Рур-РНК-олигонуклеотида Cy5-NARO той же химической природы. Применяемая концентрация аптамеров и неаптамерного олигонуклеотида 1 мкМ была достаточно высока [179], чтобы выровнять условия взаимодействия для клеток с разным количеством CD133. Инкубацию клеток с олигонуклеотидами проводили при комнатной температуре в течение 30 мин в отсутствии конкурирующих/блокирующих нуклеиновых кислот.

Коммерчески доступный 2'F-Рур-РНК-аптамер A15 взаимодействует с гликозилированным эпитопом AC133 (CD133/1) [149], в то время как эпитоп аптамера B19 - отличался от AC133. В отличие от большинства исследований аптамеров [145, 147], все эксперименты в настоящей работе проводили без предварительного блокирования клеток какими-либо дополнительными нуклеиновыми кислотами, например дрожжевой tРНК, или двухцепочечной ДНК, рассматривая в дальнейшем возможность применения аптамеров в биомедицине. Прямое взаимодействие аптамера A15 с клетками Сасо-2 приводило к большому сдвигу среднего значения интенсивности флуоресценции клеток вправо, до значения 30 000 у.е. (рисунок 45А), сравнимому со сдвигом при взаимодействии клеток с антителами (Cy5-метка аптамеров детектируется в том же канале флуоресценции проточного цитофлуориметра, что и APC-метка антител) (рисунок 44А).

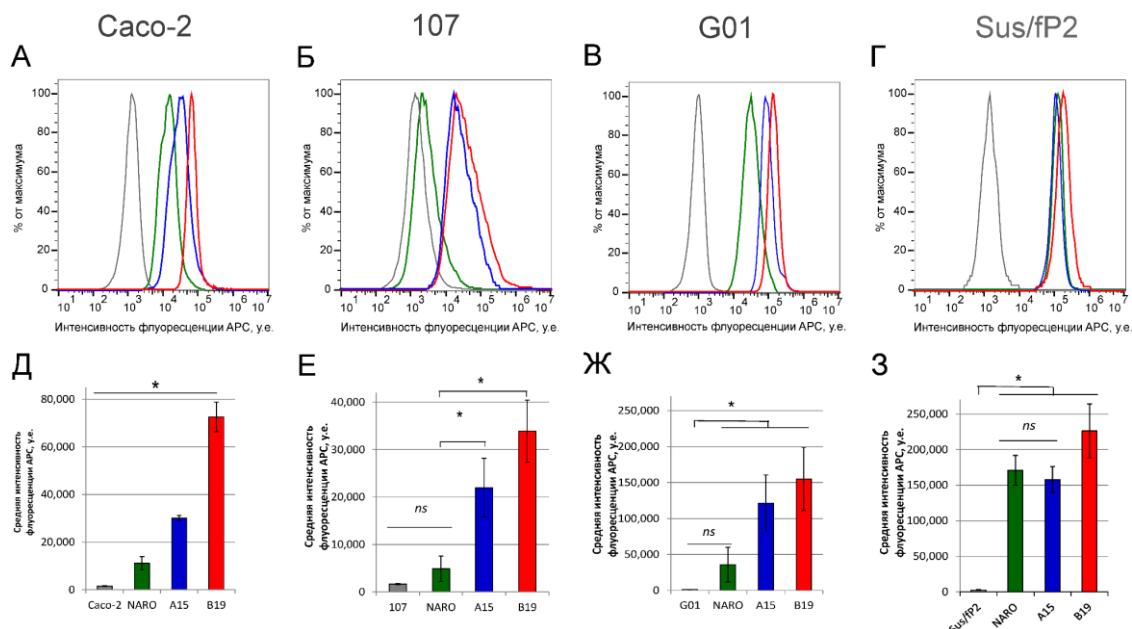


Рисунок 45 - Данные проточной цитометрии для клеток Caco-2 (A) и перевиваемых культурах 107 (Б), G01 (В), Sus/fP2 (Г), инкубированных с неаптамерным 2'FY-RНК-олигонуклеотидом Cy5-NARO (зеленые линии), анти-CD133 аптамером Cy5-A15 (синие линии), анти-CD133 аптамером Cy5-B19 (красные линии); концентрация олигонуклеотидов составляла 1 мкМ, время инкубации с клетками - 30 мин при комнатной температуре, в темноте. На гистограммах (Д-3) представлена статистическая обработка данных проточной цитометрии, * - $p < 0.05$

При уменьшении относительного количества мРНК CD133, инкубация клеток 107 с аптамером A15 приводила к уширению пика гистограммы распределения флуоресценции клеток проточной цитометрии с максимумом при 22 000 у.е. (рисунок 45Б). Дальнейшее уменьшение количества мРНК CD133 для клеток перевиваемой культуры G01 привело к появлению узкого пика с неожиданно сильным смещением среднего значения интенсивности флуоресценции клеток после инкубации с Cy5-A15 к 150000 у.е., (рисунок 45В), который перекрывает с правым плечом гистограммы для клеток культуры 107. Количество мРНК CD133 в клетках перевиваемой культуры 107 можно рассматривать как пороговое значение для обнаружения с помощью проточной цитометрии взаимодействий, обусловленных связыванием аптамером A15 мишени CD133. Это условное значение уровня транскрипции для аптамера A15 (45) выше, чем для антител (15), что может соответствовать различиям в аффинности аптамера и антител.

Клетки перевиваемой культуры Sus/fP2, несмотря на низкий уровень мРНК CD133, демонстрировали такой же большой сдвиг сигнала, как и клетки культуры G01 - 150000 у.е. (рисунок 45Г). Вероятно, большие значения среднего значения интенсивности флуоресценции клеток после инкубации с Cy5-A15 отражают

существенный вклад мембрано-ассоциированных событий. Аналогичный эффект был обнаружен ранее [148]. Неаптамерный олигонуклеотид той же химической природы, 2'-фтор замещенный при пиримидин-нуклеотидах 16-ти звенных 2'F-Pyr-RНК-олигонуклеотид NARO также взаимодействовал с исследуемыми клетками культур, давая сдвиги, составляющие примерно треть от сдвигов при взаимодействии клеток с аптамером (рисунок 45Д-Ж). Исключение составляют клетки перевиваемой культуры Sus/fP2, для которых средние значения интенсивности флуоресценции клеток, инкубированных с NARO и с аптамером A15, равны (рисунок 45Г, Ж), что означает преобладание нецелевых мембрано-ассоциированных событий.

Таким образом, сам по себе сдвиг сигнала проточной цитометрии для клеток, инкубированных с анти-CD133 аптамером A15, не указывает на наличие рецептора CD133 на клетках. Сигнал клеток а присутствии аптамера формируется в результате как минимум двух событий: взаимодействия аптамера с CD133-мишенью и событий, ассоциированных с мембраной без участия мишени. Сдвиг сигнала для второго типа событий зависит только от природы клетки, и пока для них не установлено никаких правил. Отсутствие корреляции сдвигов сигналов клеток в присутствии аптамера A15 с табличными уровнями мРНК CD133 для клеточных линий HT-29, PLC/PRF/5 и PA-1 также было отмечено в литературе [149], но приведено без комментариев. Неудивительно, что для 2'F-Pyr-RНК-аптамера A15 по сравнению с антителами более выражены мембрано-ассоциированные события. Причиной может быть повышенная гидрофобность основы 2'F-Pyr-RНК [180]. Это предположение получает дополнительную поддержку, если рассмотреть поведение другого 2'F-Pyr-RНК-аптамера, 19-ти звенного B19. Аптамер B19 имеет большую длину, 19 нуклеотидов из которых 10 - пиримидин-нуклеотиды, по сравнению с A15, 15 нуклеотидов из которых 9 пиримидин-нуклеотиды. Инкубация клеток с флуоресцентно-меченным аптамером Cy5-B19 приводит к более сильным сдвигам сигнала интенсивности флуоресценции, по сравнению с аналогичным экспериментом с более коротким Cy5-A15.

Клетки культуры 107 с высокой экспрессией мРНК CD133 после инкубации с меченными флуоресцентным красителем, цианином-5, аптамерами A15 и B19 давали сильный сдвиг сигнала проточной цитометрии (рисунок 45). Необходимо отметить, что сигнал аптамера был уширен, но явного разделения различных популяций клеток, как после инкубации с антителами к CD133, в случае аптамеров A15 и B19 не наблюдалось. Несколько больший сдвиг проточной цитометрии наблюдался для аптамера B19 по сравнению с аптамером A15.

Для клеток перевиваемой культуры глиобластомы G01 с более низким уровнем экспрессии мРНК CD133 по сравнению с клетками 107, при инкубации клеток с флуоресцентно-меченными 2'F-Рур-РНК-аптамерами A15 и B19 сигналы проточной цитометрии клеток G01 имели гораздо более сильные сдвиги, чем сигналы клеток 107. Гетерогенность популяции клеток G01, наблюдаемая в виде уширения и асимметрии пика проточной цитометрии после инкубации с флуоресцентно меченными антителами к CD133 (рисунок 44), не детектирована в случае инкубации клеток G01 с аптамерами A15 и B19 (рисунок 45). Как и в случае клеток культуры 107, несколько более сильный сдвиг наблюдался для клеток G01, инкубированных с аптамером Cy5-B19, по сравнению с инкубацией с аптамером Cy5-A15.

Клетки перевиваемой культуры глиобластомы Sus/fP2 демонстрировали крайне низкий уровень экспрессии мРНК CD133, однако при инкубации с аптамерами A15 и B19 клетки Sus/fP2 давали самые сильные сдвиги сигналов проточной цитометрии (рисунок 45).

К сожалению, разница в наблюдаемых сигналах от разных аптамеров не всегда оказывалась статистически значимой, и не может сравниваться количественно. По-видимому, разница в сигналах проточной цитометрии для клеток культур не может быть обусловлена различием в аффинности двух различных анти-CD133 аптамеров. Ранее в литературе описана аффинность аптамеров A15 и B19 к клеткам HT-29, которая составила 83.2 ± 82.9 нМ для A15 и 145.1 ± 75.4 нМ для B19, и аффинность к клеткам Нер3В: 33.9 ± 12.5 нМ для A15 и 52.3 ± 15.8 для B19 [149]. Эти данные говорят о приблизительно одинаковом сродстве двух аптамеров A15 и B19 с учётом погрешностей. В качестве объяснения наблюданной нами разницы можно предположить возможность неспецифического взаимодействия модифицированных 2'F-Рур-РНК-аптамеров с мембранный клетки за счет химической природы нуклеиновой кислоты. Аптамер A15 имеет 9 модифицированных фтором нуклеотидов, причем четыре из них расположены в структурированной области аптамера, образуют стем возможной мономолекулярной структуры. У аптамера B19 количество модифицированных нуклеотидов на молекулу немногим больше, десять нуклеотидов, четыре из которых расположены в структурированной области аптамера возможной мономолекулярной структуры аптамера B19 (рисунок 37). Продолжительные последовательности 2'F-Рур-РНК, несмотря на сохранение структурных параметров [163, 181], могут обладать гидрофобными свойствами [180]. В случае мономолекулярных структур анти-CD133 аптамеров A15 и B19 можно предположить более гидрофобный характер аптамера A15, поскольку модифицированные фтором

нуклеотиды для этого аптамера более последовательны, существует возможность образования области сахаро-фосфатного остова аптамера с особыми свойствами (полярность, гидрофобность), в отличие от аптамера B19, где нуклеотиды с модификацией сахара 2'-фтором распределены по последовательности. Для аптамера B19, несмотря на большую длину по сравнению с аптамером A15, нет оснований считать более сильное взаимодействие аптамера B19 с клетками культур следствием большей длины аптамера B19 или большего количества нуклеотидов модифицированных по сахару 2'-фтором.

A15 15 нт **CCCUCCUACAUAGGG**

B19 19 нт **CAGAACGUUAUCUAUUCUG**

Неаптамерный РНК-олигонуклеотид, содержащий 2'-дезокси-2'-фторпиrimидиновые нуклеозиды

При инкубации анти-CD133 2'F-Pyr-RНK-аптамеров A15 и B19, содержащих флуоресцентную метку цианин-5, методом проточной цитометрии положительные сигналы получены для всех исследуемых клеток культур глиобластом. Положительные сигналы клеток после инкубации с аптамерами A15 и B19 не коррелировали с сигналами клеток, инкубированных с антителами к CD133. Не удалось установить корреляцию сигналов клеток после инкубации с анти-CD133 аптамерами A15 и B19 с экспрессией мРНК CD133. Интересным представлялось проверить, как с клетками перевиваемых культур взаимодействует неаптамерный 2'F-Pyr-RНK-олигонуклеотид той же химической природы, содержащий 2'-дезокси-2'-фторпиrimидиновые нуклеозиды, содержащий ту же флуоресцентную метку цианин-5.

Клетки культуры глиобластомы пациента 107 после инкубации с NARO демонстрировали небольшой сдвиг сигнала проточной цитометрии, однако различие с сигналом автофлуоресценции клеток не было значимым. При этом не наблюдалось заметного уширения сигнала клеток, в отличие от сигнала клеток, инкубированных с анти-CD133 аптамером A15, который значимо отличался как от сигнала автофлуоресценции клеток, так и от сигнала клеток, инкубированных с NARO.

Клетки культуры глиобластомы пациента G01 взаимодействовали с NARO, сигнал инкубированных с NARO клеток G01 отличался от автофлуоресценции клеток, однако значимого различия между NARO и анти-CD133 аптамера A15 не было.

Клетки культуры глиобластомы пациента Sus/fP2 после инкубации с NARO давали сильный сигнал проточной цитометрии, который не отличался от сигнала анти-CD133 аптамера A15.

Наблюдаемое распределение сигналов анти-CD133 аптамеров и неаптамерного олигонуклеотида свидетельствует о том, что сигнал анти-CD133 аптамеров является суммой нескольких явлений. Кроме целевого взаимодействия анти-CD133 аптамера и его мишени, CD133 на поверхности клетки, значимый вклад в результат может давать нецелевое взаимодействие опухолевой клетки и флуоресцентно-меченной цианином-5²F-Pyr-RНК. При этом вклад в нецелевое взаимодействие с клеткой флуоресцентной метки и нуклеиновой кислоты оказывается различным.

Считается, что мембрана клетки, включающая фосфолипиды, не может взаимодействовать с отрицательно заряженной нуклеиновой кислотой [182], что обуславливает создание методов транспорта необходимой нуклеиновой кислоты внутрь клетки, как например, использование липосом. Однако наши результаты говорят о том, что существуют клетки культур глиобластом пациентов, способные взаимодействовать с 2²F-Pyr-RНК. Получается, что для детекции сигнала аптамер-мишень на клетке, необходимо учитывать возможность взаимодействия клетки с нуклеиновой кислотой.

ДНК-аптамеры с FAM-меткой

ДНК-аптамеры, несмотря на снижение возможностей образования вторичных структур, в целом имеют ряд преимуществ перед РНК-аптамерами, наиболее важным из которых можно признать более стабильные и дешевые реагенты для исходного синтеза. За счет более низкой стоимости синтеза ДНК-аптамеры оказываются более доступны, что играет важную роль на стадиях масштабного синтеза аптамера.

Изначально ДНК-аптамеры исследовали с FAM-меткой, поскольку это было удобно для использования аптамеров в ряде других исследований.

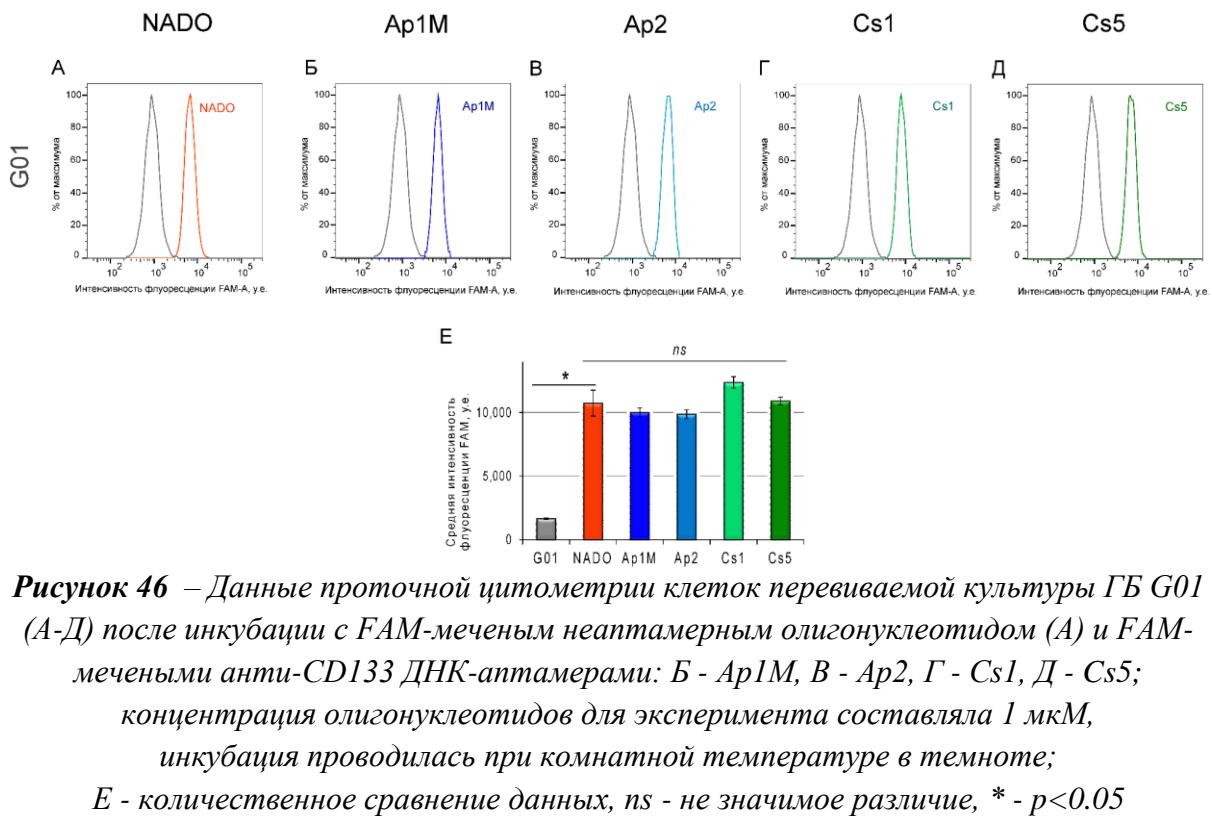


Рисунок 46 – Данные проточной цитометрии клеток перевиваемой культуры ГБ G01 (А-Д) после инкубации с FAM-меченным неаптамерным олигонуклеотидом (А) и FAM-меченными анти-CD133 ДНК-аптамерами: Б - Ap1M, В - Ap2, Г - Cs1, Д - Cs5; концентрация олигонуклеотидов для эксперимента составляла 1 мкМ, инкубация проводилась при комнатной температуре в темноте; Е - количественное сравнение данных, ns - не значимое различие, * - $p < 0.05$

На клетках культуры глиобластомы пациента G01 со средним значением экспрессии мРНК CD133 были исследованы ряд анти-CD133 аптамеров, Ap1M, Ap2, Cs1 и Cs5 с флуоресцентной меткой FAM. Взаимодействие FAM-меченых ДНК-аптамеров с клетками культуры ГБ G01 имело заметно отличный характер от взаимодействия ДНК-аптамеров с клетками стандартных линейных клеток, Caco-2 и НСТ116 (рисунок 42 и рисунок 45). Линейные клетки демонстрировали явное различие между сдвигами сигналов после инкубации с FAM-меченными неаптамерными олигонуклеотидами и FAM-меченными ДНК-аптамерами (рисунок 42). После инкубации клеток G01 с FAM-меченными анти-CD133 ДНК-аптамерами во всех случаях наблюдали сдвиг сигнала проточной цитометрии относительно автофлуоресценции клеток, что говорит о наличии взаимодействия между анти-CD133 аптамерами и клетками G01. Однако, сигнал клеток G01 после инкубации с неаптамерным олигонуклеотидом NADO имел сдвиг относительно автофлуоресценции клеток на том же уровне, что и сигнал клеток G01 инкубированных с анти-CD133 аптамерами (рисунок 45).

Возможно, наблюдаемый результат обусловлен сниженной экспрессией мРНК CD133 в клетках культуры G01 по сравнению со стандартными линейными клетками (рисунок 43), уровень мРНК CD133 в клетках G01 примерно на порядок ниже, чем в клетках Caco-2 и примерно вдвое ниже, чем в клетках НСТ116. Однако различие между сигналами Су5-меченных анти-CD133 2'F-Рур-РНК-аптамеров A15 и B19 и

неаптамерного 2'F-Pyr-RHK-олигонуклеотида было значительным (рисунок 45). Возможно, недостаток чувствительности сигнала FAM-метки не позволил детектировать сдвиг сигнала для анти-CD133 ДНК-аптамеров, в таком случае имеет смысл перейти к другой флуоресцентной метке, цианину-5 (Cy5), детектируемой в канале APC проточного цитофлуориметра.

ДНК-аптамеры с Cy5-меткой

Помимо того, что разные флуоресцентные метки имеют разные длины волн возбуждения и эмиссии и детектируются в разных каналах проточного цитометра, они могут по-разному взаимодействовать с мембранный клетки. В области флуоресценции карбоксифлуоресцеина, около 488 нм, также довольно сильно выражена собственная флуоресценция клеток, что повышает фоновые значения флуоресценции и снижает наблюдаемые сдвиги от FAM-меченых аптамеров. Цианин-5 флуоресцирует в более длинноволновой области, при 530 нм, по сравнению с карбоксифлуоресцеином. Поэтому детекция взаимодействия Cy-5-меченых аптамеров дает более сильные сдвиги.

Поскольку на линейных клетках FAM-меченные представители двух семейств анти-CD133 ДНК-аптамеров демонстрировали сходное поведение: Cs1 и Cs5 [151], Ap1M и Ap2 [152] (рисунок 46), то для дальнейшего исследования взаимодействия с клетками культурой глиобластом были выбраны аптамеры Cs5 и Ap1M.

Флуоресцентные Cy5-производные ДНК-аптамеров Ap1M и Cs5 были протестированы на клетках стандартной линии Caco-2 (рисунок 47A-B). Инкубация клеток с обоими аптамерами приводила к сдвигу сигнала проточной цитометрии: для аптамера Ap1M среднее значение интенсивности флуоресценции клеток Caco-2 составляло 7400 у.е., а для аптамера Cs5 - 5200 у.е., по сравнению со значением аутофлуоресценцией клеток Caco-2 на уровне 1400 у.е. Существенно, что для клеток перевиваемой культуры 107 гистограммы распределения флуоресценции клеток после взаимодействия с ДНК-аптамерами Ap1M и Cs5 демонстрировали мультиплексные профили (рисунок 47Г, Д).

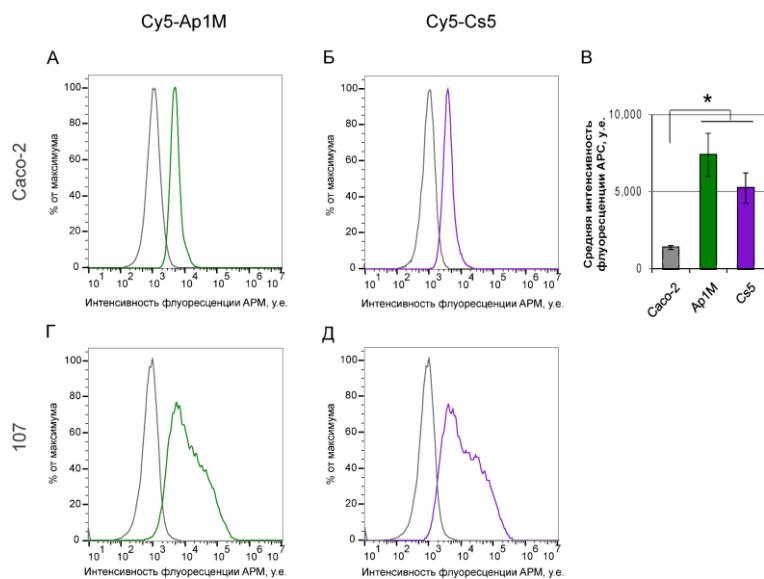


Рисунок 47 - Данные проточной цитометрии взаимодействия клеток стандартной линии Caco-2 (А-В), и клеток ПКГБП 107 (Г, Д) с 1 мкМ Cy5-ДНК: Cs5 (А, Д), Ap1M (В, Е); при комнатной температуре в течение, 30 мин в темноте; В - статистический обсчет данных, * - $p < 0,05$.

Сравнивая Cy5-меченные ДНК-аптамеры Ap1M и Cs5 с 2'F-Pyr-RHK-аптамерами A15 и B19 (рисунок 44Б, Е), мы обнаружили, что клетки стандартной линии Caco-2 и перевиваемой культуры ГБ 107 после инкубации с ДНК-аптамерами показали более низкие средние значения интенсивности флуоресценции (рисунок 47). С учетом особенностей сравнения флуоресценции, это, вероятно, может быть связано с меньшим сродством ДНК-аптамеров по сравнению с 2'F-Pyr-RHK-аптамерами, что явно видно при сравнении рисунков 45 и 47 при исследовании взаимодействия 2'F-Pyr-RHK-аптамера A15 и ДНК-аптамера Cs5 с клетками Caco-2. Тем не менее, подобно антителам (рисунок 45) и в отличие от 2'F-Pyr-RHK-аптамеров A15 и B19 (рисунок 45), ДНК-аптамеры оказались более чувствительны к гетерогенности перевиваемой культуры 107 (рисунок 47), и причиной этого может быть разница в гидрофобности разных типов нуклеиновых кислот.

3.2.5 Разница между взаимодействием неаптамерных олигонуклеотидов и анти-CD133 аптамеров с клетками¹⁴

Существуют ли различия в типе взаимодействия флуоресцентно-меченого неаптамерного олигонуклеотида с клеткой и флуоресцентно-меченого аптамера с мишенью на поверхности клетки? Для ответа на этот вопрос мы попробовали оценить поведение взаимодействия различных концентраций аптамерных и неаптамерных олигонуклеотидов различной химической природы с клетками стандартной линии Caco-2.

Концентрационные параметры связывания (C_p) аптамеров с клетками Caco-2 рассчитывали для следующих Суб-меченых по 5'-концу олигонуклеотидов: для 2'F-Pyr-RНК-аптамера A15, ДНК-аптамера Cs5 и неаптамерных 2'F-Pyr-RНК-олигонуклеотида NARO и ДНК-олигонуклеотида dT₂₀. Эффективные концентрации связывания определяли по данным проточной цитофлуориметрии, полученным после инкубации клеток Caco-2 с растворами аптамеров и неаптамерных олигонуклеотидов в разных концентрациях в диапазоне от 32 нМ до 1 мкМ. К клеткам стандартной линии Caco-2 добавляли различные концентрации Суб-меченых аптамеров A15, Cs5, либо неаптамерных олигонуклеотидов NARO или dT₂₀ (рисунок 48). Полученные данные использовали для построения графика зависимости интенсивности медианы флуоресценции клеток от концентрации олигонуклеотида. Указанные эксперименты с Суб-меченными олигонуклеотидами выявили линейные корреляции для взаимодействия неаптамерных олигонуклеотидов NARO и dT₂₀ (рисунок 48В, Г). Напротив, 2'F-Pyr-RНК-аптамер A15 и ДНК-аптамер Cs5 показали сигмоидный профиль кривых, характерный для специфического взаимодействия (рисунок 48Е, Ж). Результирующие кривые для аптамеров A15 и Cs5 хорошо аппроксимируются моделью Больцмана, которую обычно применяют для описания одноцентрового связывания аптамер-мишень. Рассчитанные концентрации полунасыщения составили 120±27 нМ для 2'F-Pyr-RНК-аптамера A15 и 180±12 нМ для ДНК-аптамера Cs5, соответственно. Аптамер A15 показал несколько большее сродство, чем аптамер Cs5. Точки, соответствующие средним значениям интенсивности флуоресценции для неаптамерных олигонуклеотидов NARO и dT₂₀ аппроксимируются только прямыми, что наглядно демонстрирует различный характер взаимодействия неаптамерных олигонуклеотидов и анти-CD133 аптамеров с клетками Caco-2 (рисунок 48).

¹⁴ При подготовке данного раздела диссертации использована публикация [1], выполненная в соавторстве и указанная во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

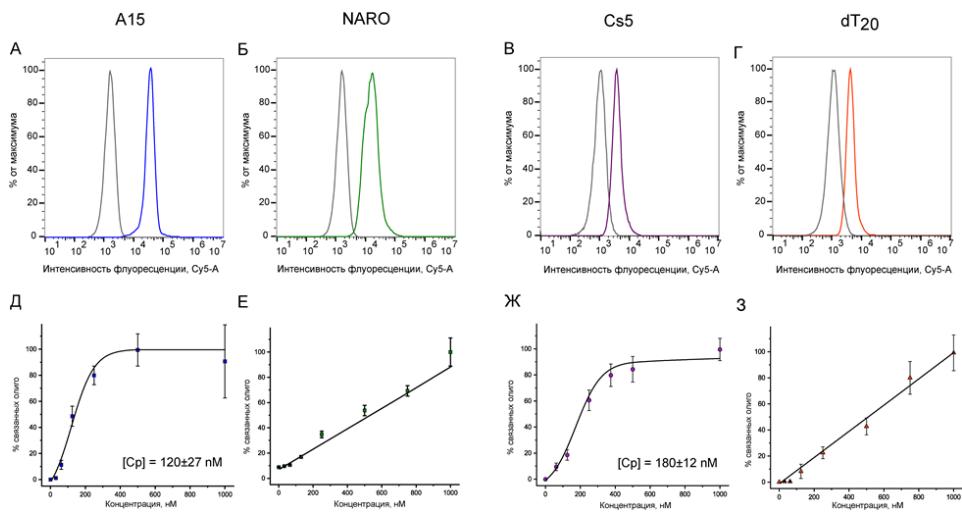


Рисунок 48 - Данные проточной цитофлуориметрии анти-CD133 2'F-Pyr-RНК-аптамера A15 (А), неаптамерного 2'F-Pyr-RНК-олигонуклеотида NARO (Б), анти-CD133 ДНК-аптамера Cs5 (В) и неаптамерного ДНК-олигонуклеотида dT₂₀ (Г) в концентрации 1 мкМ с клетками линии Caco-2; (Д-З) - обсчет результатов ПЦФ для различных концентраций олигонуклеотидов с клетками Caco-2

Среднее значение интенсивности флуоресценции клеток, указывающее на количество связанного лиганда с клеткой-мишенью, само по себе не говорит ни об аффинности, ни о специфичности взаимодействия. Поэтому для того, чтобы детектировать разницу между поведением аптамеров и неаптамерных олигонуклеотидов было необходимо проведение титрационных экспериментов. Поскольку «клетку» невозможно свести даже к комплексу молекул, мы используем термин «концентрация полунасыщения» вместо наименования “константа диссоциации” K_D . Оба изучаемых аптамера были первоначально отобраны против клеток с суперпродукцией CD133 [149, 151]. Опубликованные значения квази- K_D согласуются с полученными результатами: 2'F-Pyr-RНК-аптамер A15 демонстрировал значения 82 нМ для клеточной линии НТ-29 [149] и 32 нМ для Нер3В [150], при уровнях транскрипции 49,7 и 143,2 транскриптов на миллион транскриптов мРНК, соответственно [173]. ДНК-аптамер Cs5 давал значение квази- K_d $16,3 \pm 6,8$ [151] для трансфицированной CD133 клеточной линии (CHO)-K1 с предполагаемым высоким уровнем мРНК CD133. Представленные данные впервые позволили сравнить анти-CD133 аптамеры различной химической природы, отобранные в разных селекциях к различным CD133-экспрессирующим клеткам в единообразных условиях. Более того, имея конечной целью применение аптамеров для аптартераностики глиом, в проведенных экспериментах по сравнительному определению аффинности мы не использовали предварительного блокирования клеток с помощью транспортной РНК дрожжей или ДНК молок лосося. Эксперименты с предварительным блокированием приведены в Приложении 7. Возможно, именно

выбранная постановка эксперимента приводит к появлению сигнала от взаимодействия неаптамерных олигонуклеотидов с клетками. Тем не менее, нам удалось детектировать разницу между взаимодействием с клетками различных типов нукleinовых кислот. При этом интересным оказалось, что как 2'F-Рур-РНК-аптамер A15, так и неаптамерный олигонуклеотид той же химической природы NARO, дают большие сдвиги сигнала интенсивности флуоресценции клеток, чем ДНК-аптамер Cs5 и неаптамерный ДНК-олигонуклеотид dT₂₀ (рисунок 48).

При разработке аптатераностики ГБ неизбежно будут возникать различные ситуации, зависящие от типа аптамера, статуса CD133 и свойств клеточной мембранны. Аптамеры ДНК и 2'F-Рур-РНК по-разному взаимодействуют с клетками, на что влияет повышенная гидрофобность РНК-олигонуклеотидов, содержащих 2'-дезокси-2'-фторпиримидиновые нуклеозиды (рисунок 48). Сигнал проточной цитометрии, вероятно, генерируется двумя событиями: взаимодействием целевого аптамера с CD133 и внецелевыми мембрano-ассоциированными событиями, которые пока не изучены. По-видимому, мембрano-ассоциированные события взаимодействия флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов с клетками зависят от поведения конкретного типа клеток.

3.2.6 Заключение по анти-CD133 аптамерам

Исследование клеток перевиваемых культур глиобластом пациентов необходимый шаг для трансляции аптамеров, наиболее ярко демонстрирующий преимущества и недостатки применения аффинных агентов на основе нуклеиновых кислот на наиболее приближенной к реальной опухоли пациента модели. Сложность модели перевиваемой культуры совокупно с применением нового аффинного агента обуславливает необходимость разработки подходящих протоколов использования, основания для которых подготовлены результатами, представленными в настоящей работе.

Для перевиваемых культур глиобластом пациентов оказалось важным принимать во внимание поведение собственно клеток культуры относительно флуоресцентно-меченых нуклеиновых кислот. Важным оказалось как детекция уровня неспецифического окрашивания клеток флуоресцентным красителем метки, высокого для случая красителя цианина-5, так и поведение клеток культуры опухоли относительно нуклеиновой кислоты. Неожиданно клетки перевиваемых культур глиобластомы в некоторых случаях оказались способны активно взаимодействовать с веществами из внеклеточного пространства, в том числе и с нуклеиновыми кислотами, наиболее ярким примером такого поведения служит культура Sus/fP2, что подтвердили эксперименты с зеленым флуоресцентным декстраном (Приложение 7).

Взаимодействие разных типов аптамеров, ДНК и 2'F-РУГ-РНК, с разными культурами перевиваемых культур глиобластом пациентов показывает, что клетки культур инкубированные с флуоресцентно-меченными как анти-CD133 аптамерами, так и неаптамерными олигонуклеотидами ДНК, обладают меньшими амплитудами сдвигов, чем те же клетки, инкубированные с фтор-замещенными РНК аптамерами или неаптамерными олигонуклеотидами. Однако при использовании ДНК-аптамеров гетерогенная по представленности или количеству маркера CD133 мишени культура 107 сохраняла гетерогенный сигнал. Таким образом, анти-CD133 ДНК-аптамеры с клетками давали результаты наиболее близкие к результатам анализа при помощи антител.

Выводы, которые были сделаны на основе данных по анти-CD133 аптамерам:

1. Метод проточной цитометрии позволяет полуколичественно детектировать взаимодействие флуоресцентно меченых 2'F-Pyr-RHK-аптамера A15 и ДНК-аптамера Cs5 с клетками линии Caco-2 с высоким относительным количеством мРНК CD133. Титрование позволяет рассчитать параметр связывания анти-CD133 аптамеров с клетками Caco-2, концентрации полунасыщения $C_p = 120 \pm 27$ нМ для 2'F-Pyr-RHK-аптамера A15, ДНК-аптамер Cs5 характеризуется значением параметра связывания $C_p = 180 \pm 12$ нМ.
2. Для клеток ПКГБП G01, 107 и Sus/fP2 обнаружена разница в значениях сигнала проточной цитометрии в зависимости от относительного количества мРНК CD133. Ниже порогового значения, так же, как и для анти-EGFR аптамеров, появляется нецелевой сигнал.
3. Сравнение средних значений сигналов проточной цитофлуориметрии ДНК- и 2'F-Pyr-RHK-аптамеров с одинаковой флуоресцентной меткой показало, что сигналы 2'F-Pyr-RHK-аптамеров имеют гораздо большую амплитуду, что не может быть отнесено только к разнице в аффинности аптамеров к CD133+ клеткам. Более того, меньшая гидрофобность ДНК-аптамеров к CD133 позволяет подобно антителам выявлять гетерогенность клеточной популяции, что показано для CD133+ клеток перевиваемой культуры пациента 107.

3.3 Анти-EGFR АККО GR20hh' для доставки доксорубицина в клетки ПКГБП¹⁵

Доксорубицин (ДОКСО) представляет собой противоопухолевый препарат антрациклинового ряда, токсическое действие которого обусловлено способностью ДОКСО интеркалировать в двуцепочечную ДНК, препятствуя репликации. Возможность интеркаляции ДОКСО можно использовать для создания комплексов ДОКСО с аптамерами. Короткие аптамеры содержат небольшое количество структурированных участков, например, предполагаемая вторичная структура аптамера GR20 содержит 5+2+4 комплементарных пар. Введение дополнительных двуцепочечных участков в аптамер необходимо для эффективной интеркаляции доксорубицина. Удлинение аптамера возможно произвести разными способами. В настоящей работе выбран способ удлинения аптамера GR20 с 3'-конца нуклеотидной последовательности с тем, чтобы при гибридизации удлиненного аптамера с комплементарным 18-ти звенным олигонуклеотидом получалась конструкция GR20hh', содержащая 18-ти звенный двуцепочечный участок. Такая схема создания конструкции оставляет тем не менее вопросы, связанные с полнотой гибридизации олигонуклеотида, стабильностью конструкции GR20hh', влиянием дополнительного дуплексного участка на аффинность аптамера.

3.3.1 Адресная конструкция на базе анти-EGFR аптамера

Сборка аптамерного комплекса GR20hh' производилась гибридизацией двух олигонуклеотидов в эквимолярных концентрациях: удлиненного аптамера GR20h с комплементарным ему коротким 18-ти звенным олигонуклеотидом h' с получением аптамерной конструкции с комплементарным олигонуклеотидом (АККО) GR20hh'.

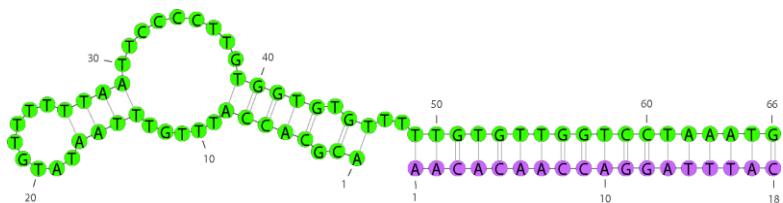


Рисунок 30 - Аптамерная конструкция GR20hh' из двух олигонуклеотидов: удлиненного аптамера GR20h (зеленый) и комплементарного ему короткого олигонуклеотида h' (розовый)

¹⁵ При подготовке данного раздела диссертации использована публикация [5] выполненная в соавторстве и указанная во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

Подобный подход был успешно применен нами ранее для введения флуоресцентной метки в короткий вариант РНК-аптамера J18s (Приложение А1).

Термическая стабильность гибридизованной двуцепочечной ДНК-конструкции может быть установлена методом УФ-спектрофотометрии. Для раствора структурированной двуцепочечной ДНК при повышении температуры увеличение поглощения при 260 нм происходит не линейно: при нарушении стэкинга пар оснований и расплавлении комплементарных пар структурированной дЦДНК происходит усиление поглощения. На кривых плавления 18 нт дуплекса, полученного гибридизацией двух комплементарных 18 нт олигонуклеотидов h и h' явно наблюдается перегиб (рисунок 32), соответствующий плавлению дуплекса длиной 18 пар оснований. В случае самого аптамера GR20 длиной 46 нуклеотидов, как мы показали методом ^1H ЯМР возможно образование структуры 2+5+4 пар нуклеотидов (рисунок 13, раздел 3.1.1 Возможные вторичные структуры анти-EGFR аптамеров). Неожиданно оказалось, что спектрофотометрически невозможно детектировать образование двухцепочных участков структуры самого аптамера GR20, 2+5+4 пар нуклеотидов (рисунок 32, голубая линия). Кривая плавления AKKO GR20hh' соответствовала суперпозиции кривых плавления отдельных элементов, аптамера GR20 и дуплексного модуля hh' (рисунок 32А), незначительное снижение температуры плавления AKKO GR20hh' по сравнению с отдельным дуплексом говорит о снижении термической стабильности дуплексной части аптамерной конструкции GR20hh'.

Тем не менее, температура плавления AKKO GR20hh' составляла 59°C , что значительно превосходит температурные диапазоны, применяемые в биологических исследованиях, и говорит о стабильности гибридизированной дуплексной части AKKO GR20hh' для исследования в физиологических условиях, следовательно AKKO GR20hh' стабильна при работе с клетками.

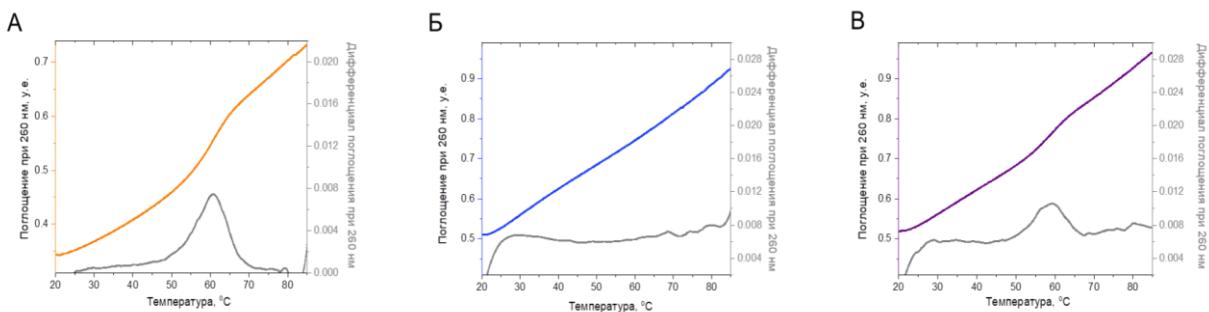


Рисунок 32 - УФ-спектрофотометрическое плавление (A) комплекса hh' (оранжевая линия), (Б) аптамера GR20 (синяя линия), и (В) конструкции GR20hh' (фиолетовая линия), серыми линиями показаны дифференцированные кривые плавления

Количественное измерение AKKO GR20hh' проводили с использованием оригинальной методики эксклюзионной ВЭЖХ, разработанной в нашей лаборатории [183]. Эксклюзионная хроматография позволяет проводить разделение молекул в соответствии с их гидродинамическим диаметром, параметром, пропорциональным размеру/весу молекулы. Чем больше молекула/комплекс, тем меньше возможности у такой молекулы проникнуть в поры полимерного хроматографического сорбента, следовательно, тем легче она преодолевает хроматографическую колонку, и тем меньше время удерживания для такой молекулы/комплекса. Не связанные в комплекс олигонуклеотиды различного молекулярного веса при хроматографическом разделении дают отдельные пики на хроматограмме, в то время как комплекс олигонуклеотидов обладает большим размером, и удерживание комплекса на хроматографической колонке будет отличаться от удерживания отдельных компонентов комплекса. В случае гибридизации дуплекса из двух комплементарных 18-ти звенных олигонуклеотидов на хроматограмме наблюдался основной пик при 17.5 мин, соответствующий дЦДНК (оранжевая линия, рисунок 31). Минорный пик при 19 мин соответствует небольшому избытку одного из исходных одноцепочечных 18-ти звенных олигонуклеотидов (оранжевая линия, рисунок 31). Аптамер GR20, длиной 46 нуклеотидов, имел время удерживания 16.7 мин (синяя линия, рисунок 31). Удлиненный олигонуклеотид GR20h, используемый для сборки конструкции, длиной 66 нуклеотидов, имел время удерживания 15.2 мин (зеленая линия, рисунок 31). Гибридизованная AKKO GR20hh' содержала суммарно 84 нуклеотида (66+18), время удерживания AKKO GR20hh' составляло 14.5 мин, при этом не наблюдали пиков при 15,2 и 19 мин, соответствующих составляющим конструкцию негибридизованным олигонуклеотидам (фиолетовая линия, рисунок 31). Полученные данные говорят о полной гибридизации удлиненного аптамера и его комплемента в аптамерную конструкцию с комплементарным олигонуклеотидом GR20hh'.

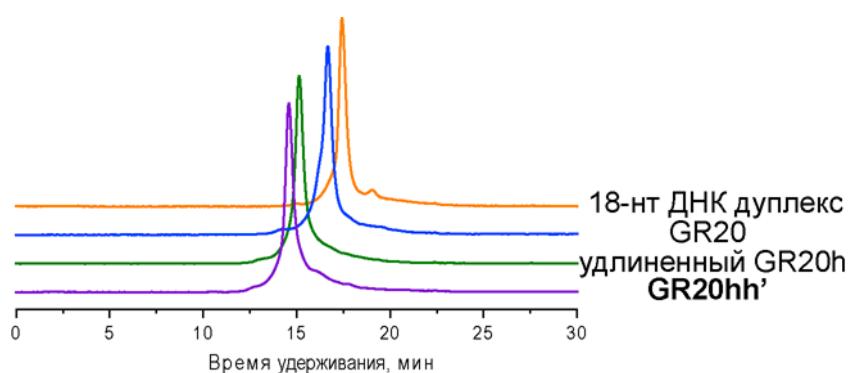


Рисунок 31 - Эксклюзионная ВЭЖХ двухцепочечного комплекса 18-ти звенного дуплекса (оранжевая линия), аптамера GR20 (синяя линия), удлиненного аптамера GR20h (зеленая линия) и гибридизованной AKKO GR20hh' (фиолетовая линия)

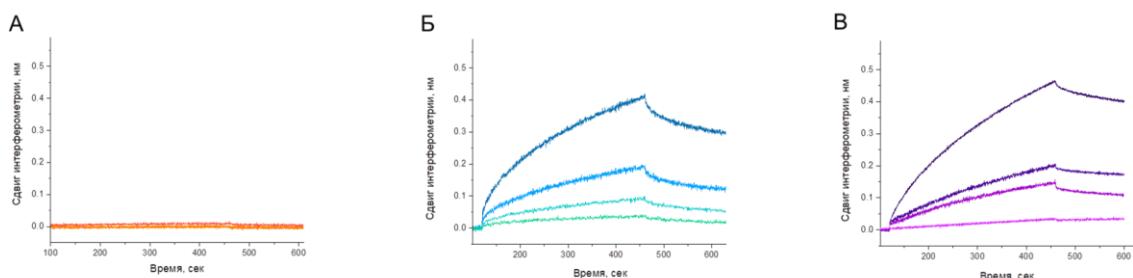


Рисунок 33 - Интерферометрия биослоев с рекомбинантным EGFR в концентрациях от 6,5 до 52 нМ (двухкратное увеличение концентрации с увеличением яркости линии) (A) биотинилированного комплекса 18-ти звленного дуплекса , (Б) аптамера GR20, и (В) конструкции GR20hh'; олигонуклеотиды иммобилизованы на сенсоре посредством ковалентно пришитой на 5'-конце биотиновой метки, в случае дуплекса и конструкции АККО GR20hh' биотиновая метка была на коротком комплементарном 18-ти звленном олигонуклеотиде

Взаимодействие аптамера в составе конструкции с рекомбинантным белком внеклеточным доменом EGFR (EGFR') тестировали методом интерферометрии биослоев. Эксперимент проводили при иммобилизации олигонуклеотида с биотиновой меткой на стрептавидиновый сенсор. Биотиновая метка была введена на стадии синтеза олигонуклеотидов, на 5'-конец для аптамера GR20 и короткого комплементарного олигонуклеотида h в составе дуплекса hh' и GR20hh'. Комплекс собирали следующим образом: комплементарный олигонуклеотид h' с биотиновой меткой на 5'-конце иммобилизовали на поверхность стрептавидинового сенсора и далее гибридизовали с удлиненным аптамером GR20h в течение 10 мин при комнатной температуре в PBS. Биосенсор с дЦДНК hh', GR20 или аптамерной конструкцией GR20hh' погружали в растворы рекомбинантного EGFR с концентрациями от 6,5 до 52 нМ (концентрация белка в эксперименте увеличивалась двукратно). Для дЦДНК hh' взаимодействия с белком не наблюдали. Сигнал сдвига интерферометрии от образования комплекса аптамер-белок детектировали как для случая самого аптамера GR20, так и для АККО GR20hh' (рисунок 33, фиолетовая линия). Аптамерная конструкция с комплементарным олигонуклеотидом GR20hh' сохранила способность связывать EGFR', сенсограммы интерферометрии биослоев биотинилированного аптамера GR20 и аптамерного комплекса GR20hh' оказались сходными (рисунок 33, таблица 9).

Таблица 9 - Кинетические константы скорости ассоциации и диссоциации и равновесные константы диссоциации комплексов аптамера GR20 и AKKO GR20hh' с EGFR'

Шифр олигонуклеотида	Кинетическая константа скорости диссоциации $k_{off} (*10^4) \text{ c}^{-1}$	Кинетическая константа скорости ассоциации $k_{on}, (*10^{-5}) (\text{M}\cdot\text{c})^{-1}$	Равновесная кажущаяся константа диссоциации $K_D = k_{off}/k_{on}$ 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

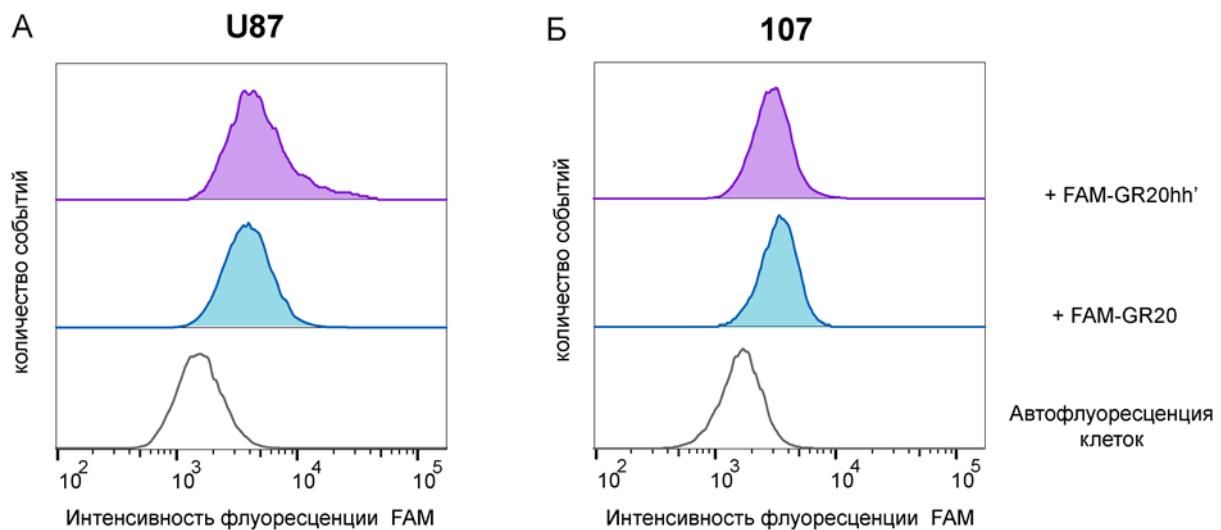


Рисунок 34 - Проточная цитофлуориметрия флуоресцентно-меченого аптамера FAM-GR20 и аптамерного комплекса с комплементарным олигонуклеотидом FAM-GR20hh' в концентрации 1 мкМ с клетками А) линии U87 и Б) клеток перевиваемой культуры ГБ пациента 107

Более того, методом проточной цитофлуориметрии детектировали сдвиг гистограммы распределения флуоресценции клеток глиобластомы U87 и клеток перевиваемой культуры ГБ пациента 107 как в случае инкубации клеток с флуоресцентно-меченым FAM-GR20, так и в случае, когда клетки были инкубированы с AKKO GR20hh', в которой та же флуоресцентная FAM-метка была на 5'-конце неаптамерного 18-ти звленного олигонуклеотида (рисунок 34, фиолетовая линия), что свидетельствует о сохранении взаимодействия аптамера в составе AKKO GR20hh' с EGFR-положительными клетками ПКГБП.

Ранее подход с комплементарной гибридизацией олигонуклеотида был применен для введения флуоресцентной метки в короткий анти-EGFR РНК-аптамер J18s, комплекс короткого аптамера J18shh' взаимодействовал с линейными EGFR-сверхэкспрессирующими клетками А431, в то время как сам по себе короткий FAM-

меченный комплементарный к удлиненному аптамеру ДНК-олигонуклеотид h' не давал сигнала (Приложение А1).

Таким образом, на основе аптамера GR20 можно создать аптамерную конструкцию GR20hh' с использованием подхода гибридизации удлиненного аптамера с комплементарным олигоуклеотидом. Эта конструкция полностью количественно собирается по данным эксклюзионной ВЭЖХ. Аптамерная конструкция содержит в составе двухцепочечный участок, термически стабильный при физиологических условиях. Более того, аффинность аптамера в составе AKKO GR20hh' сохраняется как по отношению к рекомбинантному EGFR', так и при взаимодействии AKKO GR20hh' с EGFR-положительными клетками линии ГБ U87 и ПКГБП 107.

3.3.2 Упаковка доксорубицина в адресную аптамерную конструкцию GR20hh'

Вследствие различного количества пар комплементарных оснований, для самого аптамера GR20 и AKKO GR20hh' (рисунок 35) различалась способность интеркалировать ДОКСО. Рутинное тестирование изменения флуоресценции ДОКСО при добавлении к нему олигонуклеотидов проводили с использованием регистрации спектра флуоресценции при длине волны возбуждения 532 ± 20 нм и регистрации эмиссии в диапазоне 560 - 800 нм. При добавлении к доксорубицину аптамера GR20 происходит гашение флуоресценции ДОКСО вследствие интеркаляции последнего в π -систему между парами комплементарных оснований в ДНК-аптамере (рисунок 35Б). Для содержащего двухцепочечный участок AKKO GR20hh' эффективность гашения флуоресценции изменялась с большей скоростью (рисунок 35В).

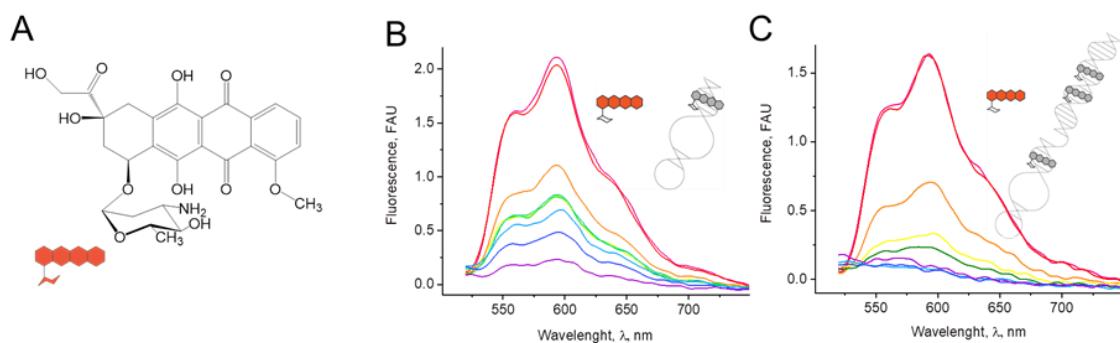


Рисунок 35 - (А) - структурная формула доксорубицина; (Б, В) спектры флуоресценции доксорубицина при добавлении аптамера GR20 (В) и AKKO GR20hh' в соотношении от 0,01 до 2 (от красной до фиолетовой линии)

Добавление дополнительного структурированного участка повышало скорость гашения флуоресценции ДОКСО: при соотношении [аптамер]/[ДОКСО] равном 1:1 наблюдалась более эффективная интеркаляция в AKKO GR20hh', содержащую

4+5+2+18 комплементарных пар нуклеотидов, чем в короткий аптамер GR20, 4+5+2 пар. Для АККО GR20hh' при соотношении [аптамер]/[Докс] равном 1:1 весь доксорубицин оказывался интеркалирован в комплекс GR20hh'+ДОКСО, так как в этом случае наблюдается полное гашение флуоресценции доксорубицина (синяя линия на спектрах).

Таким образом, аптамерную конструкцию GR20hh' удлиненного аптамера, гибридизованного с комплементарным олигонуклеотидом можно использовать для связывания способного интеркалировать в двуцепочечную ДНК известного противоопухолевого препарата доксорубицина. При соотношении компонентов комплекса 1:1 аптамерной конструкции с доксорубицином, доксорубицин оказывается полностью связан в комплекс GR20hh'+ДОКСО.

3.3.3 Доксорубицин в составе комплекса с анти-EGFR аптамерной конструкцией GR20hh' попадает в ПКГБП

Изучение эффективности доставки противоопухолевого препарата доксорубицина интеркалированного в аптамерный комплекс GR20hh' проводили посредством тестирования жизнеспособности клеток.

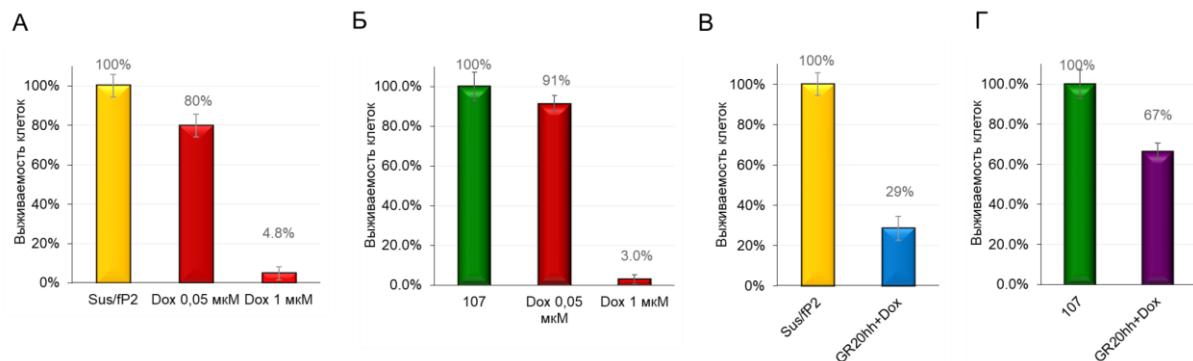


Рисунок 36 - MTS-тест влияния ДОКСО в концентрациях 1 и 0,05 мкМ (А, Б) и 1 мМ интеркалированного в АККО доксорубицина GR20hh' +ДОКСО (В, Г) на выживаемость клеток ПКГБП Sus/fP2 (А, В) и 107 (Б, Г)

Сам по себе ДОКСО попадает в клетку диффузией через мемрану. Мы предполагаем, что комплекс АККО GR20hh'+ДОКСО попадает в клетки по другим механизмам. 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 (рисунок 36). В высокой и низкой концентрации токсичность ДОКСО одинакова для клеток ПКГБП Sus/fP2 и

107: для 1 μM ДОКСО это 4,8% и 3%, соответственно. Аптамерный комплекс GR20hh'+ДОКСО менее токсичен: индекс выживаемости 29% и 67%, соответственно. Такая разница показывает разную способность клеток к интернализации комплекса GR20hh'+ДОКСО, при этом наблюдается корреляция с различиями при взаимодействии самого аптамера GR20 и конструкции GR20hh' с клетками ПКГБП Sus/fP2 и 107 (рисунок 37). Следовательно, различие в действии ДОКСО, интеркалированного в анти-EGFR ДНК-аптамерную конструкцию GR20hh'+ДОКСО, для клеток ПКГБП 107 и Sus/fP2 определяется взаимодействием клеток с конструкцией, что в свою очередь зависит от природы клеток.

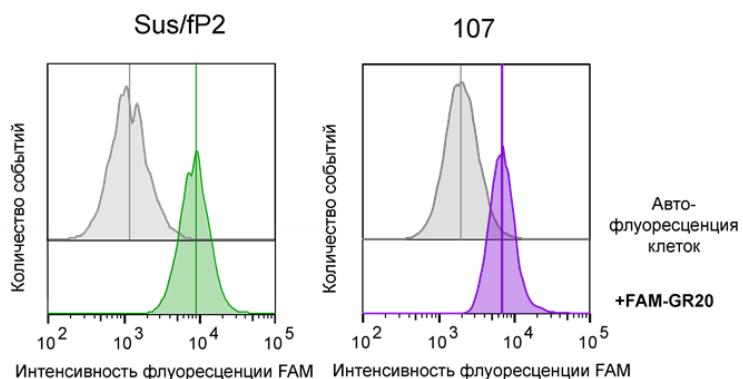


Рисунок 37 - Проточная цитофлуориметрия клеток ПКГБП А) Sus/fP2 и Б) 107 после инкубации с аптамером FAM-GR20, автофлуоресценция клеток показана серым

Впервые нами полностью охарактеризована система для таргетной доставки противоопухолевого агента - ДОКСО, которая представляет собой конструкцию анти-EGFR ДНК-аптамера с комплементарным олигонуклеотидом GR20hh', образующую нековалентный дуплексный участок, пригодный для эффективной интеркаляции ДОКСО. Действие комплекса GR20hh'+ДОКСО определяется взаимодействием аптамера GR20 с клетками. Дополнительно показано, что комплекс АККО GR20hh'+ДОКСО оказывается стабилен в опухоли в животном в течение как минимум 1 часа (Приложение А6), что открывает возможности для использования аптамерных конструкций для доставки терапевтических агентов в опухоль ГБ в животных.

3.3.4 Заключение по анти-EGFR АККО GR20hh' для доставки доксорубицина

Межмолекулярная аптамерная конструкция с комплементарным олигонуклеотидом GR20hh' связывает доксорубицин и доставляет его в клетки ПКГБП 107 и Sus/fP2. Механизм проникновения комплекса GR20hh' с ДОКСО в клетку отличается от такового для свободного ДОКСО. По-видимому, действие АККО GR20hh'+ДОКСО определяется аптамерной частью конструкции: выживаемость клеток обратно пропорциональна СЗИФ проточной цитофлуориметрии аптамера GR20 с клетками.

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-Руg-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 Gol1 (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-Pyr-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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе на примере трансмембранных белков: рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) – часть I, и поверхностного антигена CD133 – часть II исследовано взаимодействие анти-EGFR аптамеров с белком-мишенью в растворе и анти-EGFR и анти-CD133 аптамеров с белками-мишениями в составе клеток.

Методом интерферометрии биослоев определены кажущиеся константы диссоциации комплексов аптамер-EGFR с рекомбинантным белком – внеклеточным доменом рецептора эпидермального фактора роста человека для короткого анти-EGFR аптамера GR20 – 26 ± 5 нМ с для сконструированного компьютерным дизайном анти-EGFR аптамера G011 – 17 ± 3 нМ. Показано, что, аптамеры проявляют аффинность как к рекомбинантному белку внеклеточному домену рецептора эпидермального фактора роста, так и к его нативной форме, узнают EGFR на клетках. Показано эффективное связывание анти-EGFR аптамерами клеток культур глиобластом, полученных из постоперационных образцов пациентов. Более того, поскольку до настоящего времени для исследуемых аптамеров не показаны сайты узнавания рецептора, то сравнение эффективности узнавания остается до некоторой степени условным. Однако необходимо отметить, что узнавание рецептора на клетке с использованием набора различных аптамеров позволяет получить информацию о статусе рецептора, комплексном факторе включающем как количественное наличие рецептора на поверхности клетки, так и качественные параметры, такие как например, наличие мутаций, делеций, пост-трансляционных модификаций, конформацию рецептора, наличие связанного лиганда, димеризацию и т. д. Так, получаемая аптамеров информация может стать ключевой для определения клональности опухоли, выявления тех или иных паттернов распределения различных клонов клеток с различным статусом рецептора EGFR.

Использование наборов анти-EGFR и анти-CD133 аптамеров к различным мишениям для детекции маркеров на клетках культур из опухолей глиобластом пациентов позволило сделать важное заключение о возможности взаимодействия нуклеиновых кислот с клетками перевиваемых культур независимо от наличия в клетках маркера-мишени, что определяется свойствами самих клеток.

Поскольку глиобластома человека является поликлональной опухолью, то для нее необходимо уметь идентифицировать отдельные клоны опухолевых клеток. Аптамеры эффективно связываются с клетками перевиваемых культур глиобластомы, полученных из постоперационных образцов опухолей пациентов. Использование

проточной цитофлуорометрии с набором аптамеров и клеток перевиваемых опухолевых культур ГБ пациентов позволяет оценивать статус рецептора для данного клона. Например, для клеток культуры 107 показан гетерогенный по CD133 характер клеток культуры, который может быть детектирован с помощью ДНК-аптамеров. В связи с этим при последующей разработке таргет-специфичных антиплиферативных реагентов и оценке эффективности их цитостатического или цитотоксического действия следует рассматривать их действие на отдельную популяцию клеток, данный клон, а не на опухоль в целом.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность за неоценимый вклад и всестороннюю поддержку в ходе выполнения настоящей работы своему научному руководителю, доктору химических наук, профессору химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова Копылову Алексею Михайловичу, а также соавторам опубликованных по теме диссертации работ, Ивко В.Л., Иванову Б.М., Фаб Л.В., Дзариевой Ф.М., Дрозду С.Ф., Павловой С.А., Ревишину А.В., Шамадыковой Дж.В., Савченко Е.А., Самойленковой Н.С., Пронину И.Н., Усачеву Д.Ю., Головину А.В. и особенно - руководителю грантовых работ, Павловой Г.В.

Благодарю коллектизы кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ и НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского за помощь и поддержку в ходе выполнения настоящей работы. Также благодарю сотрудников лаборатории нейрогенетики и генетики развития ИВНД РАН и ФГАУ «НИМЦ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России.

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

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

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» // SLAS Discovery. – 2024. – Т. 29. – №. 8. – С. 100195. IF = 2.7 (WoS, Scopus) doi: 10.1016/j.slasd.2024.100195
2. Копылов А.М., Фаб Л.В., Антипова О.М, Савченко Е.А., Ревишин 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. 1012-1024. IF = 2.8 (WoS, Scopus) doi: 10.1134/S0006297921080113
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 = 2.8 (WoS, Scopus) doi: 10.1134/S0320972518100020
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 = 0.6 (Scopus) doi: neiro20228606199
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 = 0.2 (РИНЦ, WoS, Scopus) doi: 10.31857/S0044467724010107
6. Zon G. Recent advances in aptamer applications for analytical biochemistry //Analytical biochemistry. – 2022. – Т. 644. – С. 113894. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113894>
7. Lin M. et al. Rationally designed multivalent aptamers targeting cell surface for biomedical applications //ACS Applied Materials & Interfaces. – 2020. – Т. 13. – №. 8. – С. 9369-9389. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c15644>
8. Mo T. et al. Aptamer-based biosensors and application in tumor theranostics //Cancer Science. – 2022. – Т. 113. – №. 1. – С. 7-16. <https://doi.org/10.1111/cas.15194>

9. Zhu G., Chen X. Aptamer-based targeted therapy //Advanced drug delivery reviews. – 2018. – Т. 134. – С. 65-78. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.08.005>
10. Robertson D. L., Joyce G. F. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA //Nature. – 1990. – Т. 344. – №. 6265. – С. 467-468. <https://doi.org/10.1038/344467a0>
11. Ellington A.D., Szostak J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands // Nature. - 1990. - Т.346. - №. 6287. - С.818-22. <https://doi.org/10.1038/346818a0>
12. Tuerk C., Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase // Science. – 1990. – Т. 249. – №. 4968. – С. 505-510. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>
13. Kohlberger M., Gadermaier G. SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection //Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2022. – Т. 69. – №. 5. – С. 1771-1792. <https://doi.org/10.1002/bab.2244>
14. Komarova N., Kuznetsov A. Inside the black box: what makes SELEX better? //Molecules. – 2019. – Т. 24. – №. 19. – С. 3598. <https://doi.org/10.3390/molecules24193598>
15. Li N. et al. Directed evolution of gold nanoparticle delivery to cells //Chemical communications. – 2010. – Т. 46. – №. 3. – С. 392-394. <https://doi.org/10.1039/b920865h>
16. Manoharan M. et al. Unique gene-silencing and structural properties of 2'-fluoro-modified siRNAs //Angewandte Chemie. – 2011. – Т. 123. – №. 10. – С. 2332-2336. <https://doi.org/10.1002/anie.201006519>
17. Li N. et al. Inhibition of cell proliferation by an anti-EGFR aptamer //PloS one. – 2011. – Т. 6. – №. 6. – С. e20299. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020299>
18. Lundin K. E. et al. Biological activity and biotechnological aspects of locked nucleic acids //Advances in genetics. – 2013. – Т. 82. – С. 47-107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407676-1.00002-0>
19. Ishida K., Kasahara Y., Hoshino H., Okuda T., Obika S. Systematic Analysis of 2'-O-Alkyl Modified Analogs for Enzymatic Synthesis and Their Oligonucleotide Properties // Molecules. - 2023. - Т.28. - №.23. - С.7911. <https://doi.org/10.3390/molecules28237911>

20. Ropii B. et al. The assessment of molecular dynamics results of three-dimensional RNA aptamer structure prediction //Plos one. – 2023. – T. 18. – №. 7. – C. e0288684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288684>
21. Reuter J. S., Mathews D. H. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis //BMC bioinformatics. – 2010. – T. 11. – №. 1. – C. 1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-129>
22. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // Nucleic Acids Res. - 2003. - T.31. - №.13. - C.3406-3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>
23. Mathews D. H., Turner D. H. Prediction of RNA secondary structure by free energy minimization //Current opinion in structural biology. – 2006. – T. 16. – №. 3. – C. 270-278. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.05.010>
24. Sarzynska J., Popenda M., Antczak M., Szachniuk M. RNA tertiary structure prediction using RNAComposer in CASP15 // PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics. - 2023. T.91. - №.12. - C.1790-1799. <https://doi.org/10.1002/prot.26578>
25. Popenda M., Szachniuk M., Antczak M., Purzycka K.J., Lukasiak P., Bartol N., Blazewicz J., Adamiak R.W. Automated 3D structure composition for large RNAs // Nucleic Acids Research. - 2012. - T.40. - №.14. - C.e112. <https://doi.org/10.1093/nar/gks339>
26. Kar R.K. High-throughput and computational techniques for aptamer design // Expert Opin Drug Discov. - 2024. - C.1-13. <https://doi.org/10.1080/17460441.2024.2412632>
27. Fallah A., Havaei S.A., Sedighian H., Kachuei R., Fooladi A.A.I. Prediction of aptamer affinity using an artificial intelligence approach // J Mater Chem B. - 2024. - T.12. - №.36. C.8825-8842. <https://doi.org/10.1039/d4tb00909f>
28. Mahdavi S. Z. B. et al. An overview on display systems (phage, bacterial, and yeast display) for production of anticancer antibodies; advantages and disadvantages //International Journal of Biological Macromolecules. – 2022. – T. 208. – C. 421-442. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.113>
29. Bouchard P. R., Hutabarat R. M., Thompson K. M. Discovery and development of therapeutic aptamers //Annual review of pharmacology and toxicology. – 2010. – T. 50. – C. 237-257. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105547>

30. Brown A., Brill J., Amini R., Nurmi C., Li Y. Development of Better Aptamers: Structured Library Approaches, Selection Methods, and Chemical Modifications // Angew Chem Int Ed Engl. - 2024. - T.63. - №.16. - C.e202318665. <https://doi.org/10.1002/anie.202318665>
31. McKenzie L. K. et al. Recent progress in non-native nucleic acid modifications //Chemical Society Reviews. - 2021. - T. 50. - №. 8. - C. 5126-5164. <https://doi.org/10.1039/d0cs01430c>
32. Amato J., Randazzo A., Pagano B. Chemistry and Biology of Noncanonical Nucleic Acid Structures: From Physicochemical Properties to Therapeutic Applications // Int J Mol Sci. - 2024. - T.25. - №.9. - C.4952. <https://doi.org/10.3390/ijms25094952>
33. Ruckman J. et al. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165): Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain //Journal of Biological Chemistry. - 1998. - T. 273. - №. 32. - C. 20556-20567. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.20556>
34. Ng E. W. M., Shima D. T., Calias P., Cunningham E. T., Guyer D. R., Adamis A. P. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease // Nat. Rev. Drug Discov. - 2006. - T. 5. - C. 123–132.
35. Liang A., Zhao W., Lv T., Zhu Z., Haotian R., Zhang J., Xie B., Yi Y., Hao Z., Sun L., Luo A. Advances in novel biosensors in biomedical applications // Talanta. - 2024 - T.280. - C.126709. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.126709>
36. Malecka-Baturo K., Grabowska I. Efficiency of electrochemical immuno- vs. apta(geno)sensors for multiple cancer biomarkers detection // Talanta. - 2024. - T.281. - C.126870. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.126870>
37. Lee M., Lee M., Song Y., Kim S., Park N. Recent Advances and Prospects of Nucleic Acid Therapeutics for Anti-Cancer Therapy // Molecules. - 2024. - T.29. - №.19. - C.4737. <https://doi.org/10.3390/molecules29194737>
38. Chatterjee D., Bhattacharya S., Kumari L., Datta A. Aptamers: ushering in new hopes in targeted glioblastoma therapy // J Drug Target. - 2024. - T.32. - №.9. - C.1005-1028. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2024.2373306>

39. Subramaniyam S., Mahato P., Das P. An overview on the development of different optical sensing platforms for adenosine triphosphate (ATP) recognition //Organic & Biomolecular Chemistry. – 2023. <https://doi.org/10.1039/d3ob00209h>
40. Zhang Y., Juhas M., Kwok C. K. Aptamers targeting SARS-COV-2: a promising tool to fight against COVID-19 //Trends in Biotechnology. – 2023. – T. 41. – №. 4. – C. 528-544. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.07.012>
41. Le Dortz, L.L., Rouxel, C., Leroy, Q. et al. Aptamer selection against cell extracts containing the zoonotic obligate intracellular bacterium, *Anaplasma phagocytophilum*. Sci Rep 14, 2465 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52808-8>
42. Weller M., Wen P.Y., Chang S.M. et al. Glioma // Nat Rev Dis Primers. 2024. - T.10. - №.33. <https://doi.org/10.1038/s41572-024-00516-y>
43. Ostrom Q.T., Price M., Neff C., et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in United States in 2015-2019 // Neurooncology. - 2022. T.24. - №.suppl 5. - C.v1-v95.
44. Miller K. D. Ostrom Q.T., Kruchko C., Patil N., Tihan T., Cioffi G., Fuchs H.E., Waite K.A., Jemal A. et al. Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021 //CA: a cancer journal for clinicians. – 2021. – T. 71. – №. 5. – C. 381-406. <https://doi.org/10.3322/caac.21693>
45. Chan P., Rich J.N., Kay S.A. Watching the clock in glioblastoma // Neuro Oncol. - 2023. - T.25. - №.11. - C.1932-1946. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noad107>
46. Horbinski C. et al. Clinical implications of the 2021 edition of the WHO classification of central nervous system tumours //Nature Reviews Neurology. – 2022. – T. 18. – №. 9. – C. 515-529. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00679-w>
47. Louis D. N. et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary //Neuro-oncology. – 2021. – T. 23. – №. 8. – C. 1231-1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
48. Wang L.M., Englander Z.K., Miller M.L., Bruce J.N. Malignant Glioma // Adv Exp Med Biol. - 2023. - T.1405. - C.1-30. https://doi.org/10.1007/978-3-031-23705-8_1

49. Lanman T.A., Gonzalez Castro L.N. Targeting of Mutant Isocitrate Dehydrogenase in Glioma: A Systematic Review / Cancers (Basel). - 2025. - T.17. - №.16. - C.2630. <https://doi.org/10.3390/cancers17162630>
50. Lai A., Kharbanda S., Pope W.B., Tran A., Solis O.E., Peale F., Forrest W.F., Pujara K., Carrillo J.A., Pandita A., Ellingson B.M., Bowers C.W., Soriano R.H., Schmidt N.O., Mohan S., Yong W.H., Seshagiri S., Modrusan Z., Jiang Z., Aldape K.D., Mischel P.S., Liau L.M., Escovedo C.J., Chen W., Nghiempuh P.L., James C.D., Prados M.D., Westphal M., Lamszus K., Cloughesy T., Phillips H.S. Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin // J Clin Oncol Official J Am Soc Clin Oncol. - 2011. - T.29. - №.34. - C.4482–4490. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.8715>
51. Park S.H., Won J., Kim S.I., Lee Y., Park C.K., Kim S.K., Choi S.H. Molecular Testing of Brain Tumor // J Pathol Transl Med. - 2017. - T.51. - №.3. - C.205-223. <https://doi.org/10.4132/jptm.2017.03.08>
52. Zhu F., Qiu J., Ye H., Su W., Wang R., Fu Y. The Prognostic Significance of Epidermal Growth Factor Receptor Amplification and Epidermal Growth Factor Receptor Variant III Mutation in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis with Implications for Targeted Therapy // Int J Mol Sci. - 2025. - T.26. - №.8. - C.3539. <https://doi.org/10.3390/ijms26083539>
53. Namiot E.D., Zembatov G.M., Tregub P.P. Insights into brain tumor diagnosis: exploring in situ hybridization techniques // Front Neurol. - 2024. - T.15. - C.1393572. <https://doi.org/10.3389/fneur.2024.1393572>
54. Murugan A.K., Kannan S., Alzahrani A.S. TERT promoter mutations in gliomas: Molecular roles in tumorigenesis, metastasis, diagnosis, prognosis, therapeutic targeting, and drug resistance // Biochim Biophys Acta Rev Cancer. - 2025. - T.1880. - №.1. - C.189243. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2024.189243>
55. Hasanau T., Pisarev E., Kisil O., Nonoguchi N., Le Calvez-Kelm F., Zvereva M. Detection of TERT Promoter Mutations as a Prognostic Biomarker in Gliomas: Methodology, Prospects, and Advances. // Biomedicines. - 2022. - T.10. - №.3. - C.728. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030728>

56. Costantini S., Di Gennaro E., Fanelli G., Bagnara P., Argenziano C., Maccanico C., Paggi M.G., Budillon A., Abbruzzese C. Glioblastoma metabolomics: uncovering biomarkers for diagnosis, prognosis and targeted therapy. // J Exp Clin Cancer Res. - 2025. - T.44. - №.1. - C.230. <https://doi.org/10.1186/s13046-025-03497-2>
57. Stupp R. Mason W.P., Van Den Bent M.J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M.J., Belanger K., Brandes A.A., Marosi C. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma // New England journal of medicine. – 2005. – T. 352. – №. 10. – C. 987-996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
58. Wen P.Y., Weller M., Lee E.Q., et al. Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. // Neuro Oncol. - 2020. - T.22. - №.8. - C.1073-1113. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa106>
59. Rousseau J., Lapointe S., Roberge D. Tumor-Treating Fields and Related Treatments in the Management of Pediatric Brain Tumors. // Curr Oncol. - 2025. T.32. - №.4. - C.185. <https://doi.org/10.3390/curroncol32040185>
60. Yang X., Wang S., Montana V., Tong X., Parpura V. Status and Prospects of Glioblastoma Multiforme Treatments. // J Neurochem. - 2025. - T.169. - №.7. - C.e70158. <https://doi.org/10.1111/jnc.70158>
61. Glas M., Rath B.H., Simon M., Reinartz R., Schramme A., Trageser D., Eisenreich R., Leinhaas A., Keller M., Schildhaus H.U., Garbe S., Steinfarz B., Pietsch T., Steindler D.A., Schramm J., Herrlinger U., Brüstle O., Scheffler B. Residual tumor cells are unique cellular targets in glioblastoma. // Ann Neurol. - 2010. - T.68. - №.2. - C.264-269. <https://doi.org/10.1002/ana.22036>
62. Oppenlander M.E., Wolf A.B., Snyder L.A., Bina R., Wilson J.R., Coons S.W., Ashby L.S., Brachman D., Nakaji P., Porter R.W., Smith K.A., Spetzler R.F., Sanai N. An extent of resection threshold for recurrent glioblastoma and its risk for neurological morbidity. // J Neurosurg. - 2014. - T.120. - №.4. - C.846-853. <https://doi.org/10.3171/2013.12.JNS13184>
63. Rodriguez B., Brown C.S., Colan J.A., Zhang J.Y., Huq S., Rivera D., Young T., Williams T., Subramaniam V., Hadjipanayis C. Fluorescence-Guided Surgery for Gliomas: Past, Present, and Future. // Cancers (Basel). - 2025. T.17. - №.11. - C.1837. <https://doi.org/10.3390/cancers17111837>

64. Roubil J.G., Harris T.J. Radiotherapeutic approaches in the treatment of adult gliomas. // *Adv Cancer Res.* - 2025. - T.166. C.153-182. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2025.05.007>
65. Wang Z. et al. An Aptamer-Functionalized DNA Circuit to Establish an Artificial Interaction between T Cells and Cancer Cells // *Angewandte Chemie.* – 2023. – C. e202307656. <https://doi.org/10.1002/anie.202307656>
66. Singh S. K. Hawkins C., Clarke I.D., Squire J.A., Bayani J., Hide T., Henkelman R.M., Cusimano M.D., Dirks P.B. Identification of human brain tumour initiating cells // *Nature.* – 2004. – T. 432. – №. 7015. – C. 396-401. <https://doi.org/10.1038/nature03128>
67. Brock A., Huang S. Precision oncology: between vaguely right and precisely wrong // *Cancer research.* – 2017. – T. 77. – №. 23. – C. 6473-6479. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0448>
68. Castillo S. P. et al. The tumour ecology of quiescence: niches across scales of complexity // *Seminars in cancer biology.* – Academic Press, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.semcaner.2023.04.004>
69. Martínez A. H. et al. Unravelling glioblastoma heterogeneity by means of single-cell RNA sequencing // *Cancer letters.* – 2022. – T. 527. – C. 66-79. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.12.008>
70. Patel A. P. et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma // *Science.* – 2014. – T. 344. – №. 6190. – C. 1396-1401. <https://doi.org/10.1126/science.1254257>
71. Smiley S.B., Zarrinmayeh H., Das S.K., Pollok K.E., Vannier M.V., Veronesi M.C. Novel Therapeutics and Drug-Delivery Approaches in the Modulation of Glioblastoma Stem Cell Resistance. // *Ther. Deliv.* - 2022. - T.13. - №.4. - C.249–273. <https://doi.org/10.4155/tde-2021-0086>.
72. Wang A.F., Hsueh B., Choi B.D., Gerstner E.R., Dunn G.P. Immunotherapy for Brain Tumors: Where We Have Been, and Where Do We Go From Here? // *Curr Treat Options Oncol.* - 2024. - T.25. - №.5. - C.628-643. <https://doi.org/10.1007/s11864-024-01200-9>
73. Weber E.W., Maus M.V., Mackall C.L. The Emerging Landscape of Immune Cell Therapies. // *Cell.* - 2020. - T.181. - №.1. - C.46-62. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.001>

74. Merchant M., Ranjan A., Pang Y., Yu G., Kim O., Khan J., Wu J. Tumor mutational burden and immunotherapy in gliomas. // Trends Cancer. - 2021. - Т.7. - №.12. - С.1054-1058. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2021.08.005>
75. O'Rourke D.M., Nasrallah M.P., Desai A. et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. // Sci Transl Med. - 2017. Т.9. - №.399. - С.eaaa0984. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa0984>
76. Vitanza N., Gust J., Wilson A., Huang W., Perez F., Wright J., Leary S., Cole B., Albert C., Pinto N., Orentas R., Jensen M., Park J. IMMU-03. Updates on BrainChild-01, -02, and-03: phase 1 locoregional CAR T cell trials targeting HER2, EGFR, and B7-H3 for children with recurrent CNS tumors and DIPG. // Neuro-Oncology. - 2020. - Т. 22. - № 3. - С. iii360. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa222.360>
77. Ronsley R., Choe M., Seidel K. et al. Pioneering quad-targeting CAR T cell therapy in pediatric CNS tumors— analysis from the initial patients treated on the first-in-human phase 1 trial BrainChild-04. // Neuro Oncol. - 2024. - Т.26. - №.Suppl 4. - С.0. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noae064.372>
78. Rajakaruna P., Rios S., Elnahas H., Villanueva A., Uribe D., Leslie S., Abbas W.A., Barroso L., Oyervides S., Persans M., Innis-Whitehouse W., Keniry M. Molecular Biomarkers of Glioma. // Biomedicines. - 2025. - Т.13. - №.6. - С.1298. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13061298>
79. Pinto-Fraga J., García-Chico C., Lista S., Lacal P.M., Carpenzano G., Salvati M., Santos-Lozano A., Graziani G., Ceci C. Protein kinase inhibitors as targeted therapy for glioblastoma: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. // Pharmacol Res. - 2025. - Т.212. - С.107528. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2024.107528>
80. Rivera F., Vega-Villegas M.E., López-Brea M.F. Cetuximab, its clinical use and future perspectives. // Anticancer Drugs. - 2008. - Т.19. - №.2. - С.99-113. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e3282f23287>
81. Копылов А.М., Завьялова Е.Г., Павлова Г.В., Пронин И.Н. Перспективы терапии глиобластомы с помощью моноклональных антител к рецептору эпидермального фактора роста EGFR. // Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. – 2020. – Т. 84. – №. 3. – С. 113-118. <https://doi.org/10.17116/neiro202084031113>

82. Lassman A.B. et al. Depatuxizumab mafodotin in EGFR-amplified newly diagnosed glioblastoma: a phase III randomized clinical trial //Neuro-oncology. – 2023. – T. 25. – №. 2. – C. 339-350. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac173>
83. Pandey K. et al. A combined immunopeptidomics, proteomics, and cell surface proteomics approach to identify immunotherapy targets for diffuse intrinsic pontine glioma //Frontiers in Oncology. – 2023. – T. 13. – C. 1192448. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1192448>
84. Narsinh K.H., Perez E., Haddad A.F., Young J.S., Savastano L., Villanueva-Meyer J.E., Winkler E., de Groot J. Strategies to Improve Drug Delivery Across the Blood-Brain Barrier for Glioblastoma. // Curr. Neurol. Neurosci. Rep. -2024. - T.24. - №.5. - C.123-139. <https://doi.org/10.1007/s11910-024-01338-x>
85. Zajc C.U., Salzer B., Taft J.M., Reddy S.T., Lehner M., Traxlmayr M.W. Driving CARs with alternative navigation tools - the potential of engineered binding scaffolds. // FEBS Journal. - 2021. - T.288. - №.7. - C.2103-2118. <https://doi.org/10.1111/febs.15523>
86. Kolesnikova V., Revishchin A., Fab L. et al. GQIcombi application to subdue glioma via differentiation therapy. // Front Oncol. - 2024. - T.14. - C.1322795. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1322795>
87. Bauer M., Strom M., Hammond D.S., Shigdar S. Anything You Can Do, I Can Do Better: Can Aptamers Replace Antibodies in Clinical Diagnostic Applications? // Molecules. - 2019. - T.24. - №.23. - C. 4377. <https://doi.org/10.3390/molecules24234377>
88. Doherty C., Wilbanks B., Khatua S., Maher L.J.3rd. Aptamers in neuro-oncology: An emerging therapeutic modality. // Neuro Oncol. -2024. - T.26. - №.1. - C.38-54. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noad156>
89. Shraim A.S. et al. Therapeutic Potential of Aptamer–Protein Interactions // ACS Pharmacology & Translational Science. – 2022. – T. 5. – №. 12. – C. 1211-1227. <https://doi.org/10.1021/acspctsci.2c00156>
90. Kaye B. et al. The Role of EGFR Amplification in Deep Venous Thrombosis Occurrence in IDH Wild-Type Glioblastoma // Current Oncology. – 2023. – T. 30. – №. 5. – C. 4946-4956. <https://doi.org/10.3390/curroncol30050373>

91. Huang Y. et al. A molecular mechanism for the generation of ligand-dependent differential outputs by the epidermal growth factor receptor // *Elife*. – 2021. – T. 10. – C. e73218. <https://doi.org/10.7554/eLife.73218>
92. Alvarado D., Klein D. E., Lemmon M. A. Structural basis for negative cooperativity in growth factor binding to an EGF receptor // *Cell*. – 2010. – T. 142. – №. 4. – C. 568-579. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.015>
93. Jura N. et al. Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment // *Cell*. – 2009. – T. 137. – №. 7. – C. 1293-1307. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.025>
94. Mineev K.S., Bocharov E.V., Pustovalova Y.E., Bocharova O.V., Chupin V.V., Arseniev A.S. Spatial structure of the transmembrane domain heterodimer of ErbB1 and ErbB2 receptor tyrosine kinases. // *J Mol Biol*. - 2010. - T.400. - №.2. - C.231-243. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.05.016>
95. Kim J. et al. The phosphoinositide kinase PIKfyve mediates epidermal growth factor receptor trafficking to the nucleus // *Cancer research*. – 2007. – T. 67. – №. 19. – C. 9229-9237. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1333>
96. An Z. et al. Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies // *Oncogene*. – 2018. – T. 37. – №. 12. – C. 1561-1575. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0045-7>
97. Carpenter G. The biochemistry and physiology of the receptor-kinase for epidermal growth factor // *Molecular and cellular endocrinology*. – 1983. – T. 31. – №. 1. – C. 1-19. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(83\)90027-8](https://doi.org/10.1016/0303-7207(83)90027-8)
98. Sareen H. et al. Molecular biomarkers in glioblastoma: A systematic review and meta-analysis // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – T. 23. – №. 16. – C. 8835. <https://doi.org/10.3390/ijms23168835>
99. Verhaak R.G.W. et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1 // *Cancer cell*. – 2010. – T. 17. – №. 1. – C. 98-110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
100. Tsai Y.T. et al. ANGPTL4 induces TMZ resistance of glioblastoma by promoting cancer stemness enrichment via the EGFR/AKT/4E-BP1 cascade // *International Journal of*

Molecular Sciences. – 2019. – T. 20. – №. 22. – C. 5625.
<https://doi.org/10.3390/ijms20225625>

101. Sordella R. et al. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways //Science. – 2004. – T. 305. – №. 5687. – C. 1163-1167.
<https://doi.org/10.1126/science.1101637>
102. Kesavabhotla K., Schlaff C.D., Shin B., Mubita L., Kaplan R., Tsioris A.J., Pannullo S.C., Christos P., Lavi E., Scheff R., Boockvar J.A. Phase I/II study of oral erlotinib for treatment of relapsed/refractory glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. // J Exp Ther Oncol. - 2012. - T.10. - №.1. - C.71-81.
103. Eller J.L. et al. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab augments radiation effects in glioblastoma multiforme in vitro and in vivo // Neurosurgery. – 2005. – T. 56. – №. 1. – C. 155-162. <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000145865.25689.55>
104. Nozawa T. et al. EGFRvIII is expressed in cellular areas of tumor in a subset of glioblastoma // Neurologia medico-chirurgica. – 2019. – T. 59. – №. 3. – C. 89-97.
<https://doi.org/10.2176/nmc.oa.2018-00789>
105. Gan H. K., Cvrljevic A. N., Johns T. G. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFR v III): where wild things are altered //The FEBS journal. – 2013. – T. 280. – №. 21. – C. 5350-5370. <https://doi.org/10.1111/febs.12393>
106. Guo G. et al. A TNF–JNK–Axl–ERK signaling axis mediates primary resistance to EGFR inhibition in glioblastoma // Nature neuroscience. – 2017. – T. 20. – №. 8. – C. 1074-1084. <https://doi.org/10.1038/nn.4584>
107. Chistiakov D. A., Chekhonin I. V., Chekhonin V. P. The EGFR variant III mutant as a target for immunotherapy of glioblastoma multiforme //European journal of pharmacology. – 2017. – T. 810. – C. 70-82. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.064>
108. Cheng S. et al. PET imaging of EGFR expression using an 18 F-labeled RNA aptamer //European journal of nuclear medicine and molecular imaging. – 2019. – T. 46. – C. 948-956. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-4105-1>
109. Liu Y. et al. Aptamers selected against the unglycosylated EGFRvIII ectodomain and delivered intracellularly reduce membrane-bound EGFRvIII and induce apoptosis

//Biological chemistry. – 2009. – T. 390. – №. 2. – C. 137-144.
<https://doi.org/10.1515/BC.2009.022>

110. Esposito C. L. et al. A neutralizing RNA aptamer against EGFR causes selective apoptotic cell death //PloS one. – 2011. – T. 6. – №. 9. – C. e24071.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024071>

111. Tan Y. et al. DNA aptamers that target human glioblastoma multiforme cells overexpressing epidermal growth factor receptor variant III in vitro //Acta Pharmacologica Sinica. – 2013. – T. 34. – №. 12. – C. 1491-1498. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.137>

112. Wang D. L. et al. Selection of DNA aptamers against epidermal growth factor receptor with high affinity and specificity //Biochemical and biophysical research communications. – 2014. – T. 453. – №. 4. – C. 681-685. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.09.023>

113. Wu X. et al. Cell-SELEX aptamer for highly specific radionuclide molecular imaging of glioblastoma in vivo //PloS one. – 2014. – T. 9. – №. 3. – C. e90752.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090752>

114. Pallan P.S., Greene E.M., Jicman P.A., Pandey R.K., Manoharan M., Rozners E., Egli M. Unexpected origins of the enhanced pairing affinity of 2'-fluoro-modified RNA. // Nucleic Acids Res. - 2011. - T.39. - №.8. - C.3482-3495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1270>

115. Patra A., Paolillo M., Charisse K., Manoharan M., Rozners E., Egli M. 2'-Fluoro RNA shows increased Watson-Crick H-bonding strength and stacking relative to RNA: evidence from NMR and thermodynamic data. // Angew Chem Int Ed Engl. - 2012. - T.51. - №.47. - C.11863-11866. <https://doi.org/10.1002/anie.201204946>

116. Wan Y. et al. Proliferation and migration of tumor cells in tapered channels //Biomedical microdevices. – 2013. – T. 15. – C. 635-643. <https://doi.org/10.1007/s10544-012-9721-0>

117. Wan Y. et al. Nanotextured substrates with immobilized aptamers for cancer cell isolation and cytology //Cancer. – 2012. – T. 118. – №. 4. – C. 1145-1154.
<https://doi.org/10.1002/cncr.26349>

118. 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 therapeutics. - 2020. - T. 30. - №. 3. - C. 175-187. <https://doi.org/10.1089/nat.2019.0830>

119. Il'in V.A., Pyzhik E.V., Balakhonov A.B., Kiryushin M.A., Shcherbatova E.V., Kuznetsov A.A., Kostin P.A., Golovin A.V., Korshun V.A., Brylev V.A., Sapozhnikova K.A., Kopylov A.M., Pavlova G.V., Pronin I.N. Radiochemical Synthesis of 4-[¹⁸F]FluorobenzylAzide and Its Conjugation with EGFR-Specific Aptamers. // Molecules. - 2022. - T.28. - №.1. - C.294. <https://doi.org/10.3390/molecules28010294>

120. Golovin A., Dzarieva F., Rubetskaya K., Shamadykova D., Usachev D., Pavlova G., Kopylov A. In Silico Born Designed Anti-EGFR Aptamer Gol1 Has Anti-Proliferative Potential for Patient Glioblastoma Cells. // Int J Mol Sci. - 2025. - T.26. - №.3. - C.1072. <https://doi.org/10.3390/ijms26031072>

121. Weigmann A., Corbeil D., Hellwig A., Huttner W.B. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1997. – T. 94. – №. 23. – C. 12425-12430. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12425>

122. Yin A.H. Miraglia S., Zanjani E.D., Almeida-Porada G., Ogawa M., Leary A.G., Olweus J., Kearney J., Buck D.W. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 1997. – T. 90. – №. 12. – C. 5002-5012. <https://doi.org/10.1182/blood.V90.12.5002>

123. Pietrus M., Pitynski K., Waligora M., Milian-Ciesielska K., Bialon M., Ludwin A., Skrzypek K. CD133 Expression in the Nucleus Is Associated with Endometrial Carcinoma Staging and Tumor Angioinvasion. // J. Clin. Med. - 2021. - T. 10. - C. 2144.

124. Mak A.B., Pehar M., Nixon A.M.L., Williams R.A., Utrecht A.C., Puglielli L., Moffat J. Post-Translational Regulation of CD133 by ATase1/ATase2-Mediated Lysine Acetylation. // J. Mol. Biol. - 2014. - T. 426. - C. 2175–2182.

125. Karbanová J., Lorico A., Bornhäuser M., Corbeil D., Fargeas C.A. Prominin-1/CD133: Lipid Raft Association, Detergent Resistance, and Immunodetection. // Stem Cells Transl. Med. - 2017. - T. 7. - C. 155–160.

126. Izumi H., Kaneko Y., Nakagawara A. Molecular Regulation of Autophagy and Asymmetric Cell Division by Cancer Stem Cell Marker CD133. // Cells. - 2023. - T. 12. - №. 5. - C. 819. <https://doi.org/10.3390/cells12050819>
127. Fargeas C. A., Joester A., Missol-Kolka E., Hellwig A., Huttner W.B., Corbeil D. Identification of novel Prominin-1/CD133 splice variants with alternative C-termini and their expression in epididymis and testis //Journal of cell science. – 2004. – T. 117. – №. 18. – C. 4301-4311. <https://doi.org/10.1242/jcs.01315>
128. Eidinger O., Leibu R., Newman H., Rizel L., Perlman I., Ben-Yosef T. An intronic deletion in the PROM1 gene leads to autosomal recessive cone-rod dystrophy //Molecular Vision. – 2015. – T. 21. – C. 1295.
129. Shmelkov S. V., St.Clair R., Lyden D., Rafii S. AC133/CD133/Prominin-1 //The international journal of biochemistry & cell biology. – 2005. – T. 37. – №. 4. – C. 715-719. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.08.010>.
130. Glumac P. M., LeBeau A. M. The role of CD133 in cancer: a concise review //Clinical and translational medicine. – 2018. – T. 7. – C. 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40169-018-0198-1>
- 131 Abramson, J., Adler, J., Dunger, J. et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. // Nature. - 2024. - T. 630. - C. 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
132. Prager B.C., Bhargava S., Mahadev V., Hubert C.G., Rich J.N. Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos. // Trends Cancer. - 2020. - T. 6. - №. 3. - C. 223–235. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.01.009>.
133. Knudsen A.M., Halle B., Cédile O., Burton M., Baun C., Thisgaard H., Anand A., et al. Surgical Resection of Glioblastomas Induces Pleiotrophin-Mediated Self-Renewal of Glioblastoma Stem Cells in Recurrent Tumors. Neuro Oncol. 24 (7) (2022) 1074–87. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab302>
134. Grabovenko F.I., Kisil O.V., Pavlova G.V., Zvereva M.E. Protein CD133 as a tumor stem cell marker. // Zh Vopr Neirokhir Im N N Burdenko. - 2022. - T. 86. - №.6. - C.113-120. <https://doi.org/10.17116/neiro202286061113>

135. MacLean M.R., Walker O.L., Arun R.P., Fernando W., Marcato P. Informed by Cancer Stem Cells of Solid Tumors: Advances in Treatments Targeting Tumor-Promoting Factors and Pathways. // Int J Mol Sci. - 2024. - T. 25. - №.7. - C.4102. <https://doi.org/10.3390/ijms25074102>
136. Dorna D., Paluszczak J. Targeting cancer stem cells as a strategy for reducing chemotherapy resistance in head and neck cancers // Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. – 2023. – C. 1-19. <https://doi.org/10.1007/s00432-023-05136-9>
137. Schmalz P. G. R., Shen M. J., Park J. K. Treatment resistance mechanisms of malignant glioma tumor stem cells //Cancers. – 2011. – T. 3. – №. 1. – C. 621-635. <https://doi.org/10.3390/cancers3010621>
138. Ford M. J. et al. CD133/Prom1 marks proximal mouse oviduct epithelial progenitors and adult epithelial cells with a low generative capacity //Biology Open. – 2023. <https://doi.org/10.1242/bio.059963>
139. Abazari N. et al. Cordycepin (3' dA) Induces Cell Death of AC133+ Leukemia Cells via Re-Expression of WIF1 and Down-Modulation of MYC //Cancers. – 2023. – T. 15. – №. 15. – C. 3931. <https://doi.org/10.3390/cancers15153931>
140. Ye X. et al. RBP-J deficiency promoted the proliferation and differentiation of CD133-positive cells in both in vitro and in vivo studies //European Journal of Neuroscience. – 2022. – T. 56. – №. 2. – C. 3839-3860. <https://doi.org/10.1111/ejn.15727>
141. Barzegar Behrooz A., Syahir A., Ahmad S. CD133: beyond a cancer stem cell biomarker //Journal of drug targeting. – 2019. – T. 27. – №. 3. – C. 257-269. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1479756>
142. Bidlingmaier S., Zhu X., Liu B. The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells //Journal of molecular medicine. – 2008. – T. 86. – C. 1025-1032.
143. Itai S. et al. Establishment of CMab-43, a sensitive and specific anti-CD133 monoclonal antibody, for immunohistochemistry //Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy. – 2017. – T. 36. – №. 5. – C. 231-235. <https://doi.org/10.1089/mab.2017.0031>

144. Barrantes-Freer A. et al. CD133 expression is not synonymous to immunoreactivity for AC133 and fluctuates throughout the cell cycle in glioma stem-like cells //PloS one. – 2015. – T. 10. – №. 6. – C. e0130519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130519>
145. Shigdar S., Agnello L., Fedele M., Camorani S., Cerchia L. Profiling cancer cells by cell-SELEX: use of aptamers for discovery of actionable biomarkers and therapeutic applications thereof //Pharmaceutics. – 2021. – T. 14. – №. 1. – C. 28. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010028>
146. Joyce T., Tasci E., Jagasia S., Shephard J., Chappidi S., Zhuge Y., Zhang L., Cooley Zgela T., Sproull M., Mackey M., Camphausen K., Krauze A.V. Serum CD133-Associated Proteins Identified by Machine Learning Are Connected to Neural Development, Cancer Pathways, and 12-Month Survival in Glioblastoma. // Cancers (Basel). - 2024. - T. 16. - №.15. - C.2740. <https://doi.org/10.3390/cancers16152740>
147. McKeague M., Calzada V., Cerchia L., DeRosa M., Heemstra J.M., Janjic N., Johnson P.E., Kraus L., et al. The minimum aptamer publication standards (MAPS guidelines) for de novo aptamer selection // Aptamers. – 2022. - T. 6. - C. 10-18.
148. Song X., Yu H., Sullenger C., Gray B.P., Yan A., Kelly L., Sullenger B.. An Aptamer That Rapidly Internalizes into Cancer Cells Utilizes the Transferrin Receptor Pathway. //Cancers. – 2023. – T. 15. – №. 8. – C. 2301. <https://doi.org/10.3390/cancers15082301>
149. Shigdar S., Qiao L., Zhou S.-F., Xiang D., Wang T., Li Y., Lim L.Y., Kong L., Li L., Duan W. RNA aptamers targeting cancer stem cell marker CD133 //Cancer letters. – 2013. – T. 330. – №. 1. – C. 84-95. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.032>
150. Duan, 2014 CD133 aptamers for detection of cancer stem cells : nat. WO 2014/019024 A CIIIA. – 2017.
151. Li W. Z., Wang T., Gao S., Sun M., Xu R. Pei. Selection of CD133-targeted DNA aptamers for the efficient and specific therapy of colorectal cancer //Journal of Materials Chemistry B. – 2022. – T. 10. – №. 12. – C. 2057-2066. <https://doi.org/10.1039/d1tb02729h>
152. Ge M. H. Zhu X.H., Shao Y.M., Wang C., Huang P., Wang Y., Jiang Y., et al. Synthesis and characterization of CD133 targeted aptamer-drug conjugates for precision therapy of anaplastic thyroid cancer //Biomaterials Science. – 2021. – T. 9. – №. 4. – C. 1313-1324. <https://doi.org/10.1039/d0bm01832e>

153. Maimaitiyiming Y. et al. Selection and characterization of novel DNA aptamer against colorectal carcinoma Caco-2 cells //Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2019. – T. 66. – №. 3. – C. 412-418. <https://doi.org/10.1002/bab.1737>
154. O'Shannessy D.J., Brigham-Burke M., Soneson K.K., Hensley P., Brooks I. Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods. // Analytical Biochemistry. 1993. V. 212. № 2. P. 457–468.
155. Kopylov A.M., Novoseltseva A., Antipova O., Savchenko E., Revishchin A., Zavyalova E., Pavlova G. «Prospects of aptamerotherapy for glioma» // Neuro-Oncology. - 2018. - Т. 20. - № S3. - С. 295-295. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy139.300>
156. Моисеенко В.Л., Антипова О.М., Рыбина А.А., Мухаметова Л.И., Ерёмин С.А., Павлова Г.В., Копылов А.М. Постселекционное конструирование аптамеров: сравнительное исследование аффинности ДНК-аптамеров к рекомбинантному внеклеточному домену рецептора эпидермального фактора роста человека. // Биохимия. - ФГБУ "Издательство "Наука" (Москва). - 2024. - Т. 89. - №.12. - С. 2058-2069
157. Gray B.P., Requena M.D., Nichols M.D., Sullenger B.A. Aptamers as Reversible Sorting Ligands for Preparation of Cells in Their Native State. // Cell Chem Biol. - 2020. - Т. 27. - №.2. С. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.12.004>
158. Lou X., Egli M., Yang X. Determining Functional Aptamer-Protein Interaction by Biolayer Interferometry. // Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry. - 2016. - Т. 67. - №. 7.25. - С. 1–15.
159. Goldstein N.I., Prewett M., Zuklys K., Rockwell P., Mendelsohn J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. // Clin Cancer Res. – 1995. – Т. 1. – С. 1311–1318.
160. Di Fiore P. P., Pierce J. H., Fleming T. P., Hazan R., Ullrich A., King C. R., Schlessinger J., Aaronson S. A. Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. // Cell. – 1987. – Т.51. – С. 1063–1070. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90592-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90592-7)

161. Buccitelli C., Selbach M. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. // Nat Rev Genet. – 2020. – T.21. – №.10. – C.630-644. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0258-4>
162. The Human Protein Atlas <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000146648-EGFR/cell+line>, data обращения 17.06.2025 г
163. Piao X., Wang H., Binzel D.W., Guo P. Assessment and comparison of thermal stability of phosphorothioate-DNA, DNA, RNA, 2'-F RNA, and LNA in the context of Phi29 pRNA 3WJ. // RNA. - 2018. - T. 24. - №. 1. - C.67-76. <https://doi.org/10.1261/rna.063057.117>
164. Li N. et al. Technical and biological issues relevant to cell typing with aptamers //Journal of proteome research. – 2009. – T. 8. – №. 5. – C. 2438-2448. <https://doi.org/10.1021/pr801048z>.
165. Cruz Da Silva E., Foppolo S., Lhermitte B., Ingremoine M., Justiniano H., Klein L., Chenard M.P., Vauchelles R., Abdallah B., Lehmann M., Etienne-Selloum N., Dontenwill M., Choulier L. Bioimaging Nucleic-Acid Aptamers with Different Specificities in Human Glioblastoma Tissues Highlights Tumoral Heterogeneity. // Pharmaceutics. – 2022. – T. 14. - №.10. – C.1980. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14101980>
166. Haigler H. et al. Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431 //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1978. – T. 75. – №. 7. – C. 3317-3321. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.7.3317>.
167. Obaid G. et al. Is tumor cell specificity distinct from tumor selectivity in vivo? A quantitative NIR molecular imaging analysis of nanoliposome targeting //Nano research. – 2021. – T. 14. – C. 1344-1354. <https://doi.org/10.1007/s12274-020-3178-x>
168. Davidson N. E. et al. Epidermal growth factor receptor gene expression in estrogen receptor-positive and negative human breast cancer cell lines //Molecular Endocrinology. – 1987. – T. 1. – №. 3. – C. 216-223. <https://doi.org/10.1210/mend-1-3-216>
169. Pavlova G. et al. A Combined Effect of G-Quadruplex and Neuro-Inducers as an Alternative Approach to Human Glioblastoma Therapy //Frontiers in Oncology. – 2022. – T. 12. – C. 880740. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.880740>

170. Belyashova A. S. et al. Cell cultures in assessing radioresistance of glioblastomas //Zhurnal Voprosy Neirokhirurgii Imeni NN Burdenko. – 2022. – T. 86. – №. 5. – C. 126-132. <https://doi.org/10.17116/neiro202286051126>
171. Legatova V. et al. Covalent bi-modular parallel and antiparallel G-Quadruplex DNA nanocostructs reduce viability of patient glioma primary cell cultures //International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – T. 22. – №. 7. – C. 3372. <https://doi.org/10.3390/ijms22073372>
172. ViennaRNA <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>, дата обращения 23 декабря 2024 г
173. The Human Protein Atlas <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007062-PROM1/>, дата обращения 24 ноября 2024 г
174. Siena S. et al. Trastuzumab deruxtecan (DS-8201) in patients with HER2-expressing metastatic colorectal cancer (DESTINY-CRC01): a multicentre, open-label, phase 2 trial //The Lancet Oncology. – 2021. – T. 22. – №. 6. – C. 779-789.
175. Jing H., Weidensteiner C., Reichardt W., Gaedicke S., Zhu X., Grosu A.L., Kobayashi H., Niedermann G. Imaging and Selective Elimination of Glioblastoma Stem Cells with Theranostic Near-Infrared-Labeled CD133-Specific Antibodies. // Theranostics. - 2016. - T. 6. - №.6. - C. 862-74. <https://doi.org/10.7150/thno.12890>
176. dePadua M., Kulothungan P., Lath R., Prasad R., Madamchetty K., Atmakuri S., Ragamouni S., Gandhari M., Khandrika L., Jain J. Establishment and Characterization of Brain Cancer Primary Cell Cultures From Patients to Enable Phenotypic Screening for New Drugs. // Front Pharmacol. – 2022. – T. 3. – C. 778193. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.778193>
177. Kemper K., Sprick MR, de Bree M, Scopelliti A, Vermeulen L, Hoek M, Zeilstra J, Pals ST, Mehmet H, Stassi G, Medema JP. The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation //Cancer research. – 2010. – T. 70. – №. 2. – C. 719-729.
178. Moreno-Londoño A. P., Robles-Flores M. Functional roles of CD133: more than stemness associated factor regulated by the microenvironment //Stem Cell Reviews and Reports. – 2024. – T. 20. – №. 1. – C. 25-51.

179. Powell Gray B. et al. An aptamer for broad cancer targeting and therapy //Cancers. – 2020. – T. 12. – №. 11. – C. 3217.
180. Shubham S., Hoinka J., Banerjee S., Swanson E., Dillard J.A., Lennemann N.J., Przytycka T.M., et al Shubham S. et al. A 2' FY-RNA motif defines an aptamer for Ebolavirus secreted protein //Scientific reports. – 2018. – T. 8. – №. 1. – C. 12373. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30590-8>
181. Egli M., Manoharan M. Re-Engineering RNA Molecules into Therapeutic Agents. // Acc Chem Res. - 2019. - T. 52. - №.4. - C.1036-1047. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00650>
182. Alves A.C., Ribeiro D., Nunes C., Reis S. Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies. // Biochim Biophys Acta. - 2016. -T. 1858. - №.9. - C. 2231-2244. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.06.025>
183. Zavyalova E. G. et al. Putative mechanisms underlying high inhibitory activities of bimodular DNA aptamers to thrombin //Biomolecules. – 2019. – T. 9. – №. 2. – C. 41. <https://doi.org/10.3390/biom9020041>

ПРИЛОЖЕНИЕ

A1 Короткий вариант РНК-аптамера J18h¹⁶

Первым отобранным к EGFR аптамером был РНК-аптамер J18 длиной 104 нуклеотида. Наличие 2'-гидроксильной группы в РНК позволяет образовывать большое количество дополнительных водородных связей, стабилизирующих укладку аптамера. Длинные нуклеотидные цепи оправданы при проведении селекции аптамеров, поскольку позволяют увеличить количество вариантов фолдинга аптамера. Однако использовать длинные аптамеры сложно, поскольку эффективность синтеза драматически падает для олигонуклеотидов длиннее 50 звеньев. Следовательно, для РНК-аптамера J18 оправдан пост-селекционный дизайн аптамера. Были проанализированы возможности образования вторичной структуры аптамера J18.

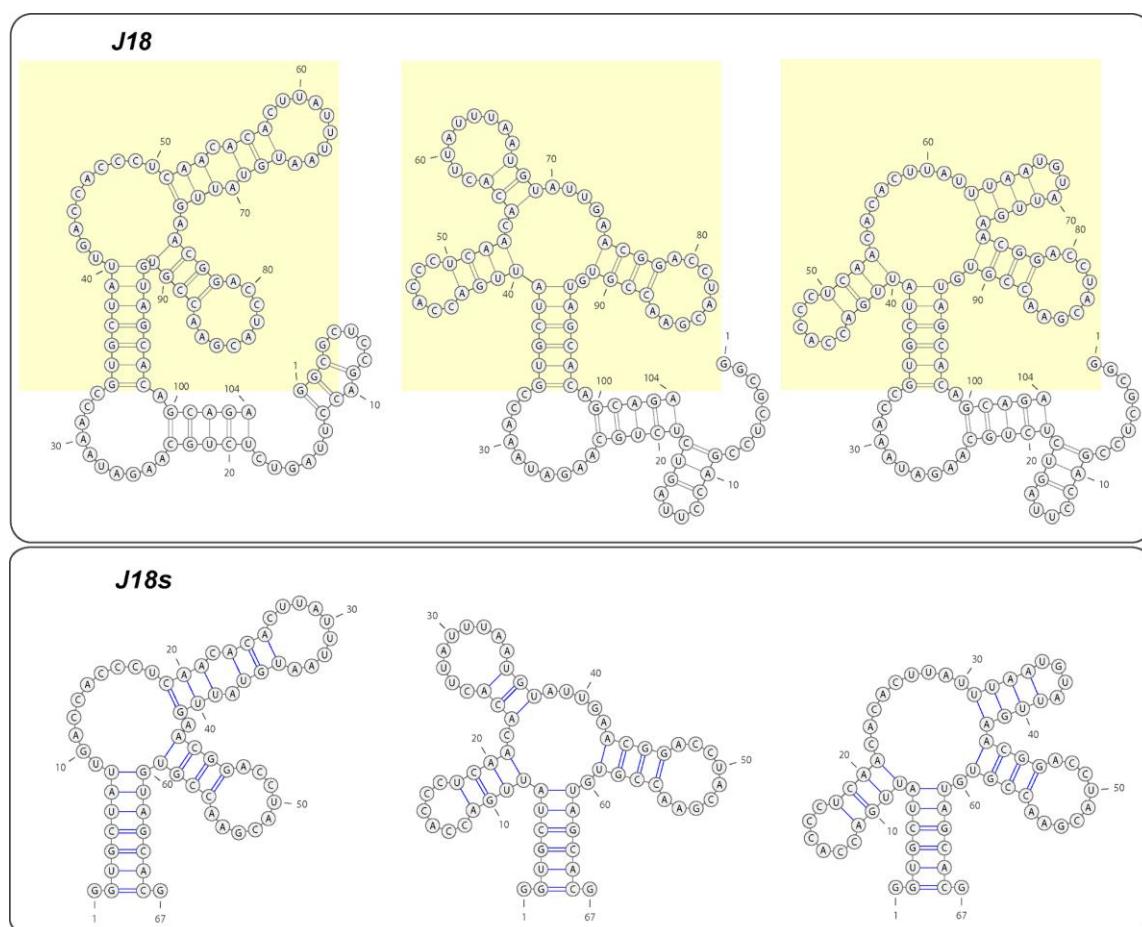


Рисунок A1 - Предполагаемые вторичные структуры аптамера J18 и его короткого варианта J18s

¹⁶ При подготовке данного раздела диссертации использована публикация [2], выполненные в соавторстве и указанные во введении к диссертации вместе со вкладом автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования.

РНК-аптамер J18 демонстрировал большое разнообразие предполагаемых структур, однако образование различных возможных вторичных структур определялось небольшим количеством пар нуклеотидов (до пяти) в 5'- и 3'-концевых областях 1-30 и 99-104 нуклеотидов. В области 34-99 нуклеотидов аптамер J18 способен образовывать три возможных структуры, эта часть была принята за основу короткого 67-нт варианта аптамера J18s, исследуемого в настоящей работе (рисунок A1). Необходимо отметить, что короткий аптамер J18s, подобно родительскому аптамеру J18, сохраняет три предполагаемые структуры.

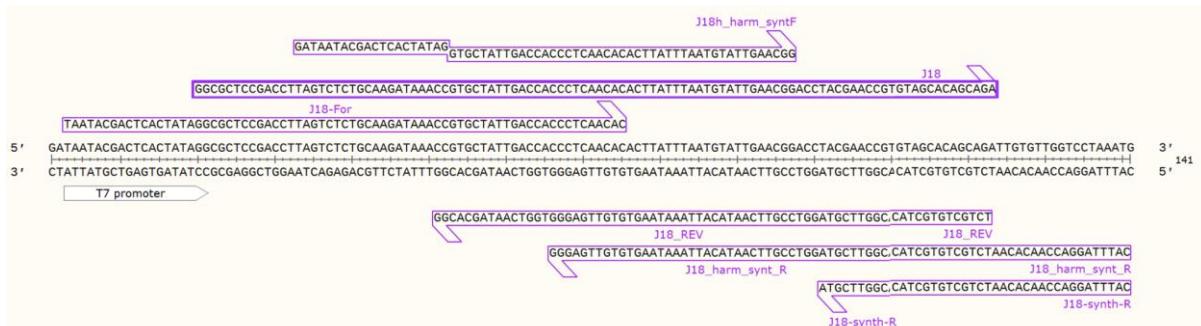


Рисунок А2 - ДНК-последовательности, использованные для ферментативного синтеза РНК-аптамера J18 и короткого варианта РНК-аптамера J18s

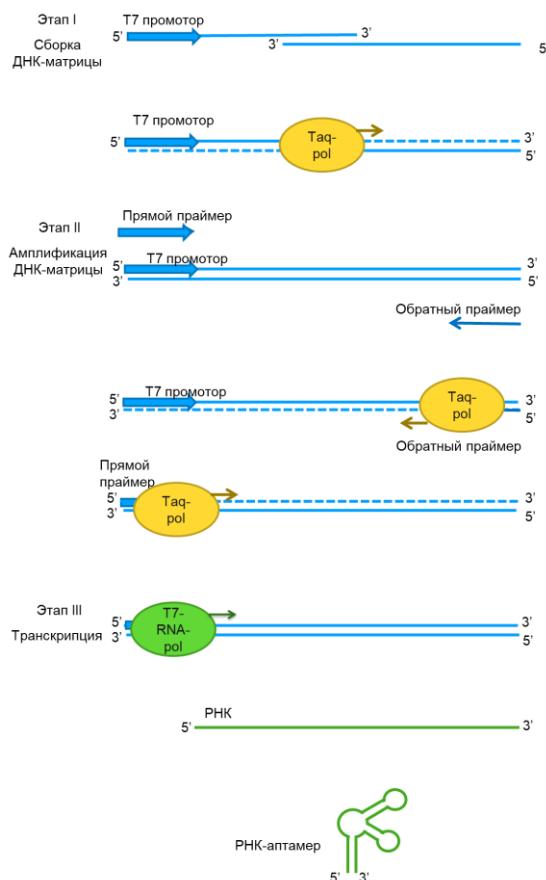


Рисунок А3 - Схема ферментативного получения РНК-аптамеров J18 и его короткого варианта J18s

Короткий РНК-аптамер J18s получали ферментативной транскрипцией на матрице ДНК предварительно синтезированной с помощью ПЦР. Исходную матрицу для транскрипции получали с помощью достраивания частично комплементарных одноцепочечных олигонуклеотидов с помощью Таq-полимеразы (SynTaq, Кат. № R-412, Синтол, Россия), для этого исходные синтетические ДНК-олигонуклеотиды смешивали в концентрации 3 нМ, в присутствии компонентов для амплификации, включая буфер, dNTP, смесь нагревали до 95°C в течение 5 мин, далее выдерживали при 72°C в течение 1 мин. Нуклеотидные последовательности ДНК-олигонуклеотидов приведены на рис. А2. Полученную достроенную двухцепочечную ДНК-матрицу без выделения использовали для амплификации с помощью ПЦР, что позволило получить исходную ДНК-матрицу для ферментативной транскрипции РНК-аптамеров. Общая схема ферментативного синтеза представлена на рис. А3.

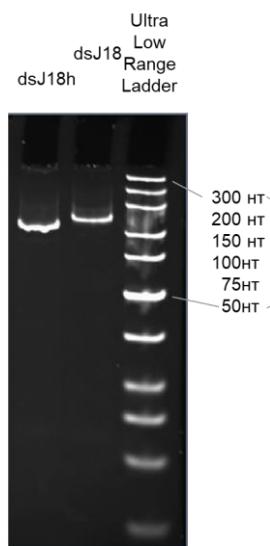


Рисунок А4- Полиакриламидный 10% гель-электрофорез ПЦР-продукта достроенной двухцепочечной ДНК, использованы для синтеза аптамера J18 и короткого варианта J18s

Двухцепочечной ДНК-продукт амплификации переосаждали из спирта, анализировали (рис. 4А) и использовали в качестве матрицы для синтеза РНК с помощью ДНК-зависимой T7 РНК-полимеразы (MEGAscript™ T7 Transcription Kit Invitrogen™, США).

В случае РНК-аптамера введение флуоресцентной метки прямой химической конъюгацией было осложнено. В таких случаях более удобным подходом для получения флуоресцентного РНК-аптамера был следующий: удлиненный РНК-аптамер J18sh синтезировали с дополнительной нуклеотидной последовательностью, так, чтобы получалось, что аптамер содержит дополнительно два уридуина и дополнительные 18 нт, способные гибридизироваться с комплементарным 18-нт ДНК-

олигонуклеотидом h', содержащим на 5'-конце флуоресцентную метку FAM. Такой подход был применен для анализа взаимодействия укороченного варианта РНК-аптамера J18shh' с EGFR+ клетками. Схема получения комплекса аптамера J18shh' приведена на рисунке А5.

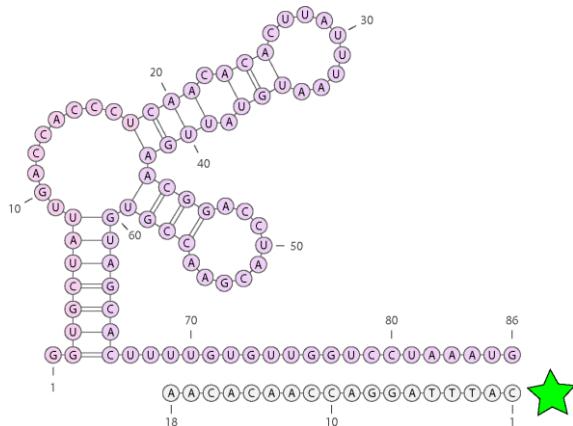


Рисунок А5 - Схема гибридизации удлиненного РНК-аптамера J18sh с 18 нт ДНК-олигонуклеотидом h' с флуоресцентной меткой FAM на 5' -конце; звездочкой обозначена флуоресцентная метка карбоксифлуоресцеин, FAM

На поверхности клеток эпидермальной аденокарциномы человека А431 рецептор EGFR представлен в большом количестве. Клетки А431 тестировали с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием коммерчески доступных моноклональных мышиных антител H11 к EGFR. Эти антитела детектировались с помощью вторичных антител к мышенному иммуноглобулину, конъюгированных с флуоресценным красителем Cy2, флуоресценция которого детектировалась в канале FAM проточного цитофлуориметра. Клетки А431 давали сильный флуоресцентный с антителами H11 (Рисунок А6), который характеризовался смещением пика гистограммы по оси абсцисс относительно пика автофлуоресценции клеток (Рисунок А6, серая линия). Амплитуда сдвига пика клеток, инкубированных с флуоресцентными МУзЭлями, в проточной цитометрии показывает изменение средней интенсивности флуоресценции клеток.

Молекулы РНК могут иметь более сложную пространственную структуру по сравнению с ДНК из-за наличия 2'-гидроксильной группы. Анти-EGFR РНК-аптамер J18 содержал 104 нт . Предложенный оригинальный укороченный вариант J18s длиной 67 нт сохранил аффинность к EGFR-положительным клеткам А431 (рисунки А6 А и Б). Комплекс РНК-аптамера J18sh, гибридизованного с комплементарным ДНК-олигонуклеотидом h' (далее называемый конструкция J18shh), с флуоресцентной меткой FAM, с клетками А431 давал сдвиг сигнала проточной цитометрии относительно автофлуоресценции клеток (Рисунок А6Б). Инкубация самого

олигонуклеотида h' с флуоресцентной меткой FAM с клетками A431 практически не приводила к сдвигу сигнала относительно автофлуоресценции клеток, следовательно, именно короткий вариант РНК-аптамера J18s в случае гибридного комплекса отвечал за связывание с клетками A431.

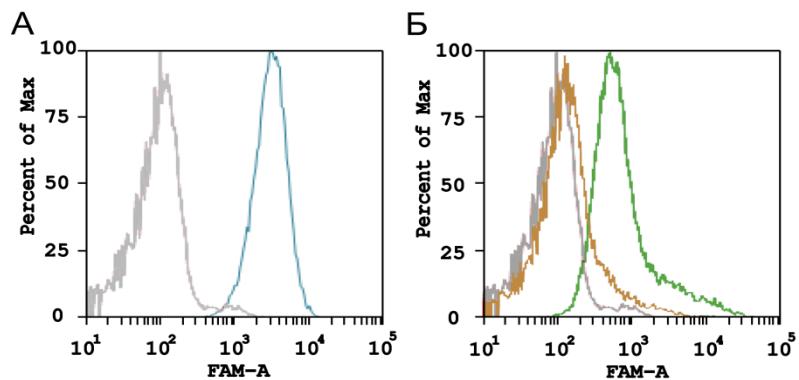


Рисунок А6 - Проточная цитофлуориметрия клеток стандартной клеточной линии A431, инкубированных с (A) антителами к EGFR, клон H11; (Б) инкубированных с анти-EGFR аптамерной конструкцией J18shh

Таким образом, при сокращении 104 нт анти-EGFR РНК-аптамера J18 до 67 нт варианта РНК-аптамера J18s удалось сохранить способность короткого варианта аптамера J18s взаимодействовать с EGFR+ клетками A431.

A2 Анти-EGFR ДНК-аптамер Tutu20 и его короткие варианты Tutu20s3 и Tutu20s4

Длина анти-EGFR ДНК-аптамера составляет 76 нуклеотидов. Аптамер Tutu20 способен образовывать несколько различных вторичных структур (рисунок А8). Было предложено удалить нуклеотиды 1-19 с 5'-конца и нуклеотиды 72–76 на 3'-конце, а также провести замену 23-го тимина исходного аптамера TuTu20 на аденин (T23A) и провести замену 50-го тимина исходного аптамера TuTu20 на аденин (T50A), в результате был получен вариант аптамера TuTu20s3 длиной 52 нуклеотида (рисунок А8). Короткий вариант Tutu20s3 способен образовывать две предполагаемые структуры, подобно родительскому аптамеру Tutu20.

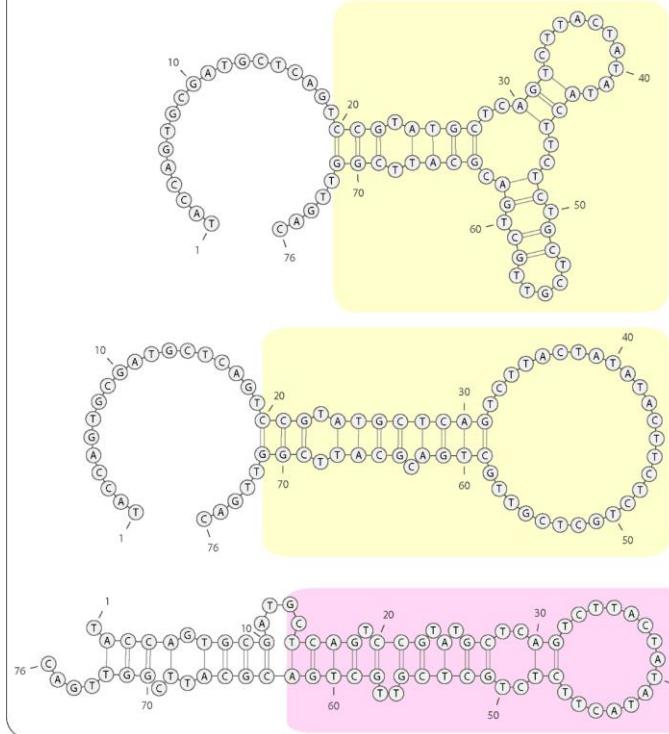
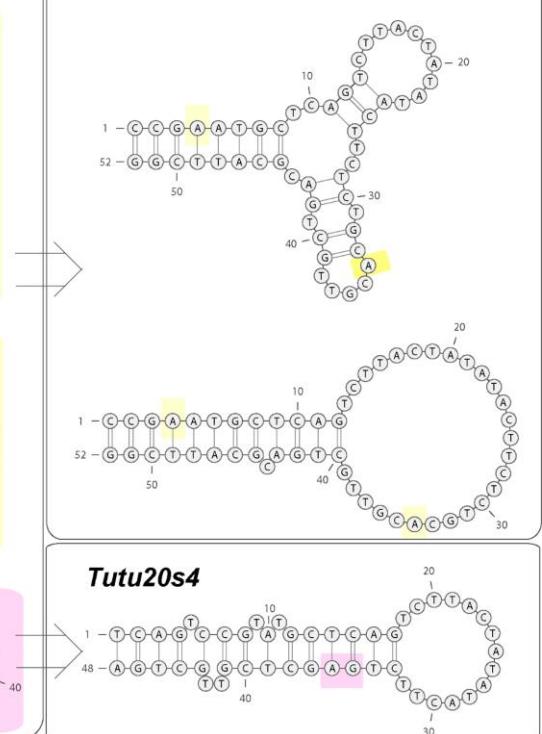
Tutu20**Tutu20s3**

Рисунок А7 - Сравнение предполагаемых вторичных структур ДНК-аптамера TuTu20 и его производных коротких ДНК-аптамеров TuTu20s3 и TuTu20s4

Таблица А1 - Характеристики коротких ДНК-аптамеров серии Tutu20

Шифр	Последовательность	Длина, нт
TuTu20s3	CCG AAT GCT CAG TCT TAC TAT ATA CTT CTC TGC TCG TTG CTG ACG CAT TCG G	52
TuTu20s4	TCA GTC CGT ATG CTC AGT CTT ACT ATA TAC TTC TGA GCT CGT TGC TGA	48

Удаление нуклеотидов 1–14 с 5'-конца и нуклеотидов 63–76 с 3'-конца, а также две точечные нуклеотидные замены: замена 49-го цитозина на гуанин и 50-го тимина на аденин (C49G и T50A), дали в результате вариант аптомера TuTu20s4 длиной 48 нуклеотидов (рисунок А8).

Взаимодействие анти-EGFR ДНК-аптамеров с рекомбинантным внеклеточным доменом EGFR человека (EGFR') исследовали методом интерферометрии биослоев (ИБС). Сравнение кинетики связывания ДНК-аптамеров серии TuTu20 с EGFR' проводили с использованием белка EGFR' Cloud-Clone (Китай). На стрептавидиновый биосенсор иммобилизовали аптомер, содержащий биотиновую метку на 5'-конце. Биосенсор с иммобилизованным аптомером погружался в растворы белка EGFR' с последовательным ступенчатым двукратным увеличением концентрации от 0,8 до 102,4 нМ.

Все три ДНК-аптамера, полноразмерный аптомер TuTu20 и два его оригинальных укороченных производных TuTu20s3 и TuTu20s4, связывались с белком EGFR', что видно по увеличению сигнала на стадии ассоциации при увеличении концентрации белка в исследуемой пробе (рисунок А8).

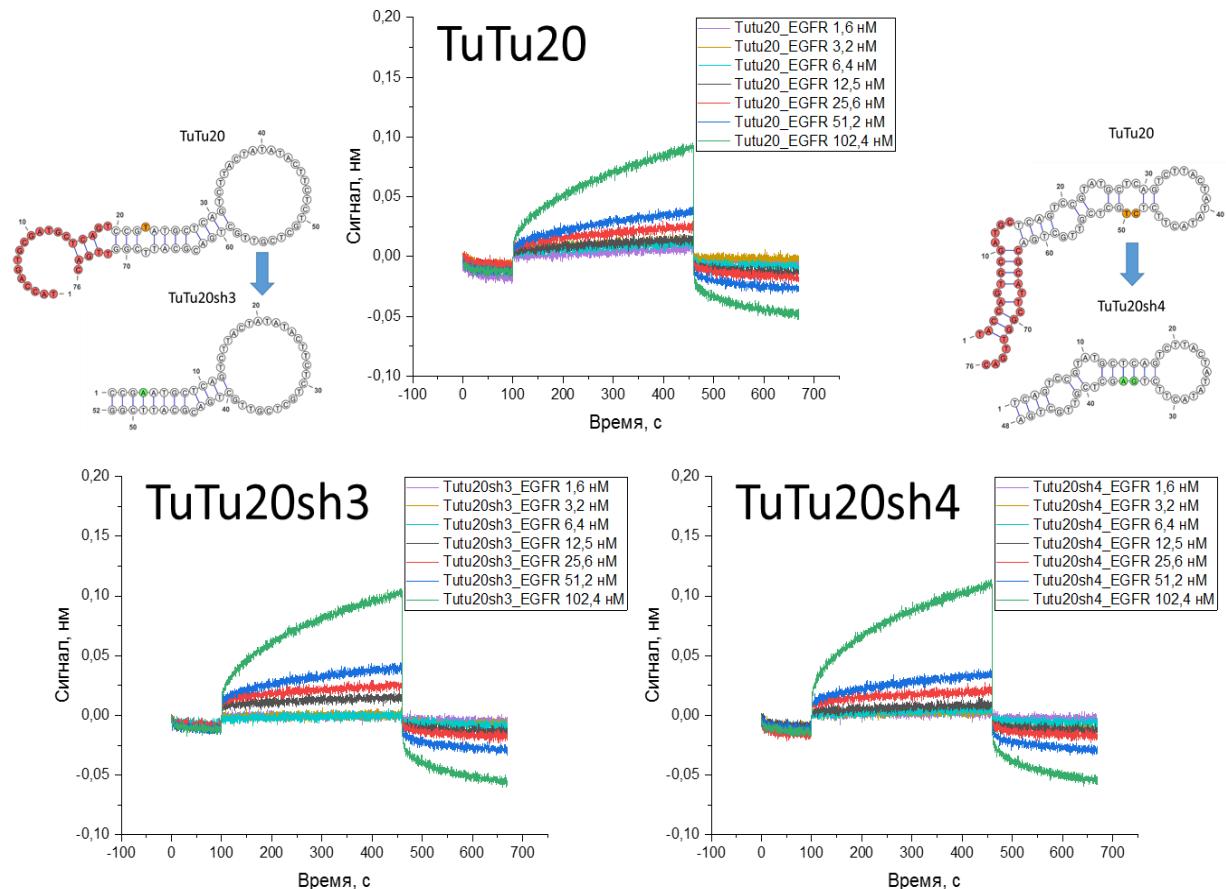


Рисунок А8 - Интерферометрия биослоев ДНК-аптамера TuTu20 и его вариантов TuTu20s3 и TuTu20s4 с рекомбинантным EGFR .

Оригинальный ДНК-аптамер TuTu20 обладает более низкой аффинностью по сравнению с исходным TuTu20, что видно по уменьшению скорости ассоциации комплекса и, соответственно, трехкратному увеличению K_D (таблица А2).

Таблица А2 - Константы скорости и равновесные константы диссоциации комплексов аптомеров с EGFR'

<i>Аптомер</i>	<i>Длина, нм</i>	<i>Кинетическая константа скорости диссоциации</i> $k_{off} (*10^4)$ c^{-1}	<i>Кинетическая константа скорости ассоциации</i> $k_{on}, (*10^5)$ $(M \cdot c)^{-1}$	<i>Равновесная кажущаяся константа диссоциации</i> $K_D = k_{off}/k_{on}$ nM
TuTu20	76	23 ± 3	3.5 ± 0.2	7 ± 1
TuTu20s3	52	25 ± 1	4.3 ± 0.2	6 ± 1
TuTu20s4	48	28 ± 3	1.5 ± 0.1	18 ± 2

Эффективность взаимодействия аптомера TuTu20s4 с белком EGFR' снижена. Напротив, в случае оригинального аптомера TuTu20s3 рассчитанная константа скорости ассоциации k_{on} оказалась выше, чем для исходного аптомера TuTu20. Аффинность оригинального аптомера TuTu20s3 к EGFR' определяется эффективной ассоциацией. Следовательно, при дизайне аптомера TuTu20s3 удалось сохранить элементы предполагаемой вторичной структуры, которая отвечает за эффективное узнавание EGFR аптомером.

Расчетная равновесная кажущаяся константа диссоциации K_D комплекса ДНК-аптомера TuTu20s3 с EGFR', полученная методом ИБС в 5-7 раз ниже, чем для 2'FY-PHK-аптомеров ME07 и CL4 (таблица 8).

A3 Анти-EGFR PHK- и 2'F-Pyr-PHK-аптомеры не токсичны для клеток линий DF1 и U251 и клеток ПКГБП G01

Токсичность оригинального короткого PHK-аптомера J18s и известных 2'F-Pyr-PHK аптомеров ME07 и CL4, короткого варианта 2'F-Pyr-PHK аптомера CL4s оценивали для неопухолевых клеток дермальных фибробластов DF1, клеток линии глиобластомы U251 и клеток перевиваемой культуры из ГБ пациента (ПКГБП) G01.

Короткий PHK-аптомер J18s и 2'F-Pyr-PHK аптомеры ME07, CL4 и CL4s получали ферментативной транскрипцией с помощью T7 PHK-полимеразы или модифицированной T7 PHK-полимеразы на матрице ДНК, предварительно амплифицированной с помощью ПЦР. Двуцепочечную ДНК переосаждали из спирта и использовали в качестве матрицы для синтеза PHK с помощью ДНК-зависимой T7 PHK-полимеразы (MEGAscript T7 Transcription Kit Invitrogen™, США) или синтеза 2'F-Pyr-PHK с помощью модифицированной T7 PHK-полимеразы и

модифицированных нуклеозидтрифосфатов: 2'-F-дезоксиуридинтрифосфата и 2'-F-дезоксицитидинтрифосфата (Durascripte T7 Transcription Kit Lucigen, США).

Тестирование клеток на токсическое действие аптамеров проводили совместно с сотрудником НИМЦ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко Самойленковой Н.С. с помощью MTS-теста. Клетки высевали в 96-луночные планшеты в количестве 2000 клеток на лунку в 200 мкл ростовой среды DMEM/F12 и культивировали 48 часов при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Культуральную среду удаляли и вносили раствор аптамера в свежей среде в необходимой концентрации из расчета 200 мкл на лунку. Для каждой концентрации аптамера выполняли 5 повторов. При добавлении олигонуклеотидов их предварительно преформировали, нагревая пробирки со стоковым раствором в концентрации 100 μM в PBS в течение 5 минут при 95°C, и далее образцы разводили в ростовой среде. Клетки с растворами олигонуклеотидов инкубировали 72 часа при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Вносили 20 мкл MTS-реагента (Promega). Инкубировали в течение 2 часов при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Положительным контролем служили лунки с клетками без добавления олигонуклеотидов. Оптическую плотность измеряли на планшетном анализаторе Tecan Infinite M200/Pro при λ=490 nm с использованием программы i-control 1.10.

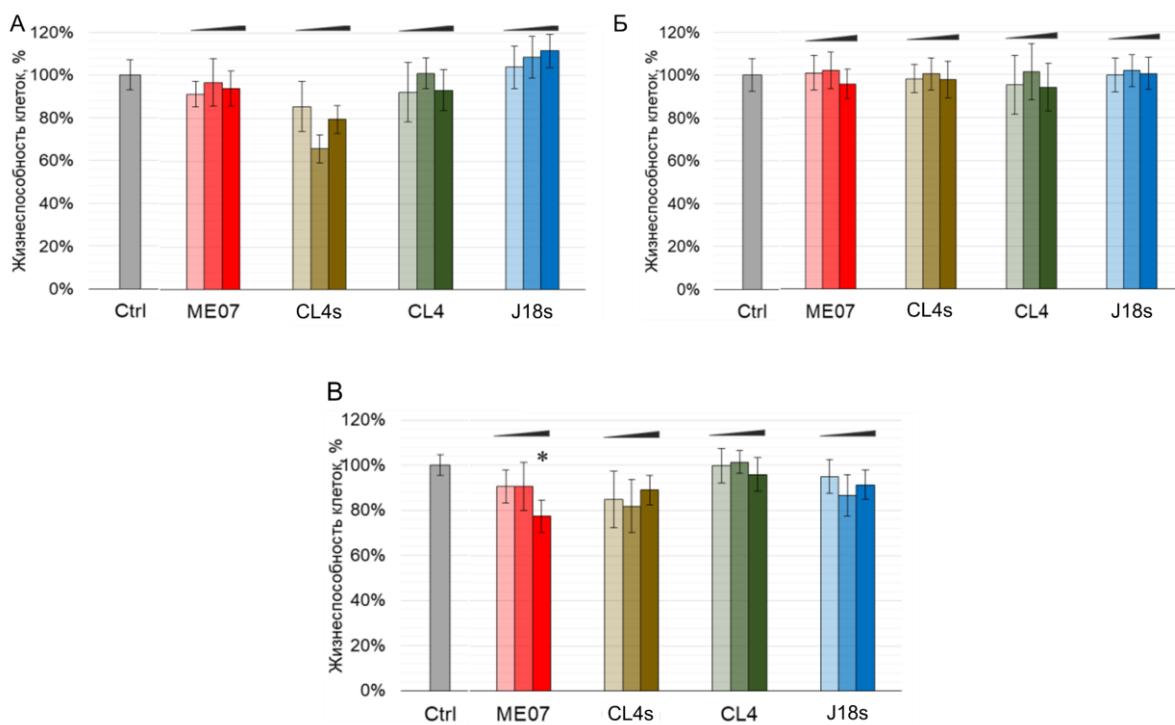


Рисунок А9 - Результаты MTT-теста действия анти-EGFR 2'F-Pyr-PHK-аптамеров ME07 (красные столбики), варианта CL4s (коричневые) и аптамера CL4 (зеленые); и PHK-аптамера J18s (голубые) на жизнеспособность клеток человеческих дермальных фибробластов DF1 (А), клеток линии ГБ U251 (Б) клеток ПКГБП G01 (В) после 72 часов инкубации; усиление яркости столбца соответствует увеличению концентрации олигонуклеотида 0,1, 1,0, 10,0 μM; * - p<0.05

На линейных клетках дермальных фибробластов DF1, клетках линии ГБ U251 и клетках перевиваемой культуры ГБ G01 исследовали влияние аптамеров на жизнеспособность клеток. Анти-EGFR 2'F-Pyr-RНК-аптамеры ME07, CL4 и вариант CL4s равно как и РНК-аптамер J18s в исследуемых концентрациях 0,1-10 μ M не оказывали влияния на жизнеспособность клеток стандартных линий фибробластов DF1, ГБ U251 (рисунок А9 А, Б).

На образцах клеток ПКГБП G01 анти-EGFR 2'F-Pyr-RНК-аптамер CL4 и его вариант CL4s равно как и РНК-аптамер J18s на всем диапазоне исследуемых концентраций 0,1-10 μ M не оказывали влияния на жизнеспособность клеток ПКГБП G01. Анти-EGFR 2'F-Pyr-RНК-аптамер ME07 демонстрировал значимое снижение жизнеспособности до уровня 77% только для клеток ПКГБП G01 и только в максимальной концентрации 10 μ M.

Таким образом, как 2'F-Pyr-RНК-аптамеры ME07 и CL4, так и РНК-аптамер J18s не оказывают влияния на жизнеспособность как линейных клеток дермальных фибробластов DF1, так и клеток линии ГБ U251. Клетки ПКГБП G01 оказались чувствительными только к единственному 2'F-Pyr-RНК-аптамеру ME07, и только в максимальной исследуемой концентрации, 10 μ M, десятикратно превышающей концентрации аптамеров, используемые в экспериментах.

A4 Флуоресцентная микроскопия клеток линии A431 с FAM-меченными анти-EGFR 2'F-Pyr-RНК- и ДНК-аптамерами

Визуализация клеток методом флуоресцентной микроскопии проводилась с помощью инвертированного микроскопа Nexcore серии NIB600 (Novel Optics, Китай) совместно со студенткой химического факультета, Рыбиной А.Е.

Флуоресцентная метка, FAM (карбоксифлуоресцеин, λ возбуждения = 493 нм, λ эмиссии = 517 нм), была введена на стадии синтеза олигонуклеотида, ковалентно конъюгирована с 5'-концевым нуклеотидом аптамера. Непосредственно перед окрашиванием клеток растворы 2'FY-RНК-аптамера CL4 и ДНК-аптамеров GR20, Gol1 и Tutu20s3 с FAM-меткой в концентрации 2 μ M в фосфатном буфере были разбавлены в 2 раза полной ростовой средой DMEM/F12 для культивации клеток, финальная концентрация аптамеров в эксперименте составляла 1 μ M.

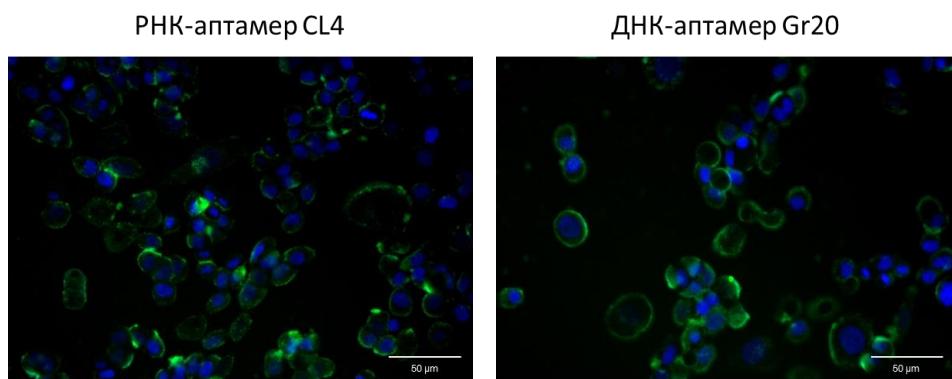
Клетки линии эпидермальнойadenокарциномы A431 высевали в четырёхлуночный планшет за сутки до эксперимента. Из лунок с клетками удаляли среду, вносили в лунки по 200 μ л раствора аптамера в ростовой среде с концентрацией 1 μ M и инкубировали в темноте либо в течение 30 минут при +4 °C, либо в течение

180 минут при +37 °C. Растворы аптамеров удаляли, промывали клетки фосфатным буфером и фиксировали 3,7 % раствором параформальдегида в течение 30 минут при +4 °C. Зафиксированные клетки трижды промывали фосфатным буфером и проводили окраску ядер клеток с помощью раствора красителя DAPI в концентрации 2 мг/мл в течение 15 минут при комнатной температуре, после чего клетки промывали трижды. Готовый препарат клеток хранили в буфере PBS при +4 °C.

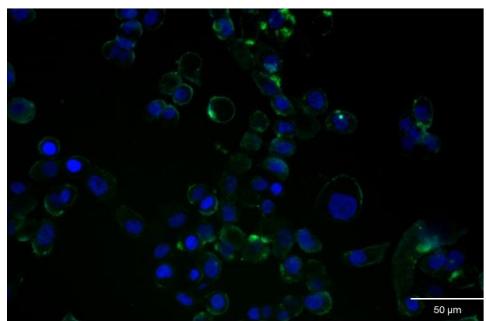
Визуализацию проводили с 20-ти кратным увеличением. Для детекции флуоресценции зелёного свечения FAM-метки на аптамере использовали фильтр с длиной волны 485 нм, флуоресцентное свечение DAPI детектировали с помощью фильтра 365 нм. Полученные результаты фиксировали камерой прибора в режиме черно-белых микрофотографий. Обработку и объединение флуоресцентных сигналов разных каналов проводили с помощью программного обеспечения для обработки изображений ImageJ (NIH, США).

Рецептор EGFR в клеточной мембране может отличаться от рекомбинантного белка. Флуоресцентная микроскопия позволяет детектировать взаимодействие клеток с флуоресцентно-меченными анти-EGFR антителами и аптамерами.

Представленность EGFR на клетках A431 высокая. Окрашивание клеток аптамерами проводили в течение 30 минут при +4 °C. Флуоресцентно-меченные 2'F-Pyr-RHK-аптамер CL4 и короткие ДНК-аптамеры GR20, Goll по данным флуоресцентной микроскопии связываются с клетками A431 (рисунок А41). Флуоресцентный сигнал от аптамеров с FAM-меткой концентрируется, в основном, на поверхности клеток, собираясь в небольшие кластеры (яркие точки на микрофотографиях) (рисунок А41). EGFR локализуется на мембране клеток и за счет латеральной диффузии легко образует димеры, особенно после связывания своего лиганда - EGF.



ДНК-аптамер Gol1



ДНК-аптамер TuTu20sh3

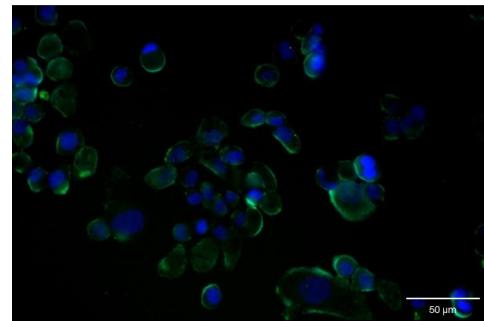
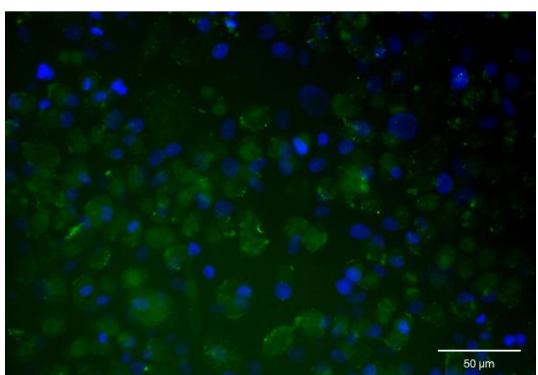


Рисунок A10 - Клетки A431 после инкубации с FAM-меченными аптамерами в течение 30 минут при +4 °C: (A) CL4, (B) GR20, (C) Gol1, (Г) Tutu20s3. Зеленое окрашивание – FAM, синее – DAPI

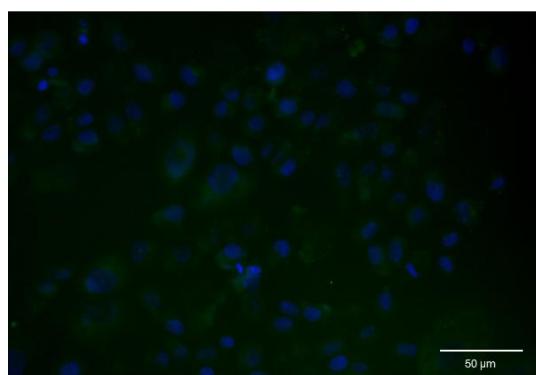
Связанный рецептор способен собираться в макроскопические кластеры для усиления дальнейшего сигнала. С течением времени комплексы с EGFR интернализуются в клетку. Взаимодействие с аптамерами может происходить подобно связыванию EGFR с лигандом, что хорошо объясняет наблюдаемые при +4 °C на микрофотографиях окрашенные флуоресцентными аптамерами края клеток A431.

В случае окрашивания в течение 3 часов при +37 °C клеток A431 флуоресцентными аптамерами наблюдалось равномерное свечение цитозоля клеток A431, доля кластеров на поверхности клеток становится значительно меньше. По-видимому, это происходит из-за интернализации комплекса флуоресцентного аптамера с рецептором - процесса, который требует отдельного, самостоятельного изучения.

РНК-аптамер CL4



ДНК-аптамер Gr20



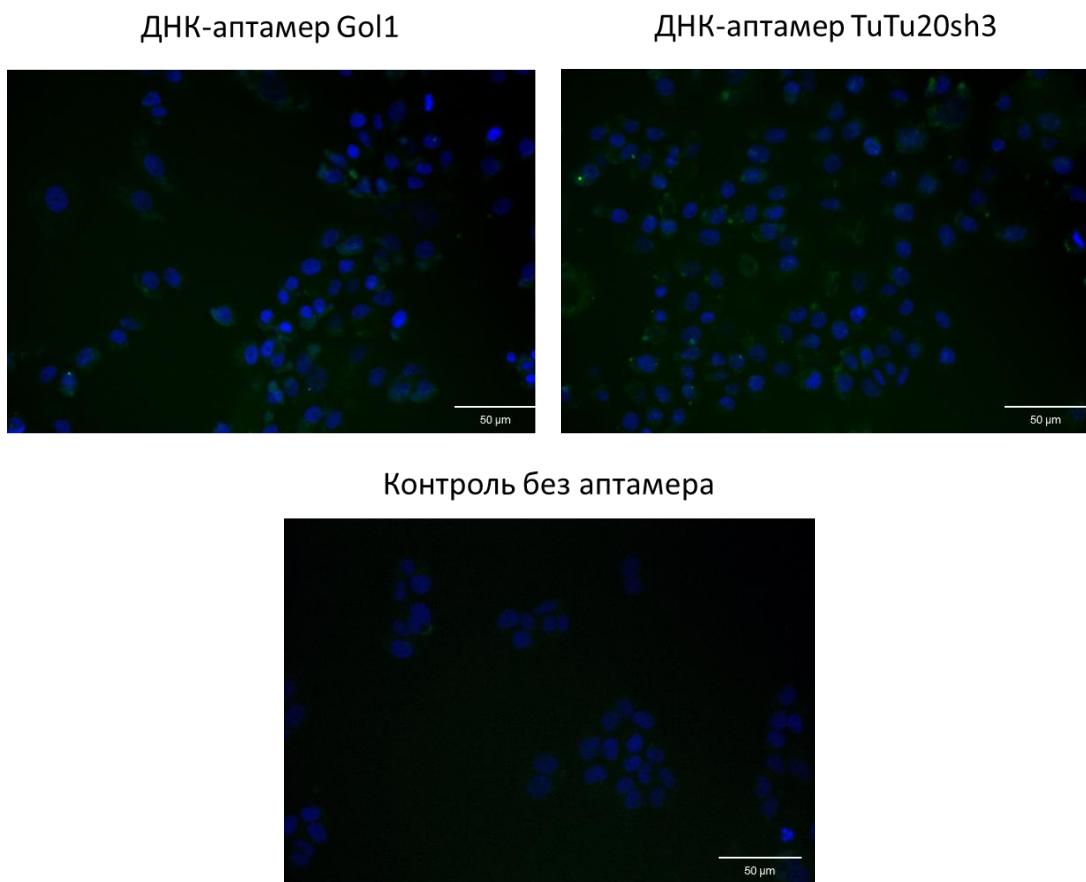


Рисунок A11- Клетки линии A431 после инкубации с FAM-меченными аптамерами в течение 180 минут при +37 °C: (A)CL4, (B) GR20, (B) Gol1, (Г) Tutu20s3. Зеленый - FAM, синий – DAPI

Таким образом, показана возможность детекции EGFR+ клеток A431 с помощью флуоресцентной микроскопии, метод аптацитохимии реализован с помощью флуоресцентно-меченых 2'F-Pyr-RНK-аптамера CL4 и ДНК-аптамеров GR20, Gol1, Tutu20s3. Интенсивность флуоресцентного сигнала для аптамеров различной химической природы, инкубированных с клетками A431, оказалась сходной, что говорит о сопоставимых возможностях различных аптамеров для детекции EGFR-положительных клеток A431, а также согласуется с аффинностью исследуемых аптамеров к рекомбинантному EGFR¹.

A5 Флуоресцентная микроскопия клеток ПКГБП с FAM-меченными анти-EGFR 2'F-Pyr-RНK- и ДНК-аптамерами

Исследование проводили совместно с сотрудниками ИВНД и НФ РАН, Фаб Л.В. и Дзариевой Ф.М. Культуру клеток ПКГБП 107 (10 000 клеток на лунку) высевали в 4-х луночные планшеты с вложенными покровными стеклами и инкубировали двое суток при 37°C в атмосфере 5% CO₂. К клеткам добавляли раствор FAM-меченного

аптамера в концентрации 1,0 μ M в ростовой среде и инкубировали 3 часа при 37 °C. Клетки отмывали трижды, фиксировали 3,7 % параформальдегидом в течение 30 мин при +4°C. Клетки отмывали трижды тремя объемами PBS.

Окрашивание клеток анти-EGFR антителами клон H11 (разведение 1:50, MA5-13070, моноклональное, мышью, Merck Millipore, США) проводили после фиксации и инкубации клеток с блокирующим раствором 3% БСА в течение 1 часа при +4 °C, клетки отмывали, и инкубировали с Cy2-мечеными вторичными антителами (Cy2-меченные антитела козы к IgG мыши, Jackson Immunoresearch, Великобритания) в течение 1 часа при +4 °C. Клетки отмывали трижды.

Ядра клеток окрашивали раствором бисбензимида (Hoechst 33342, «Sigma», разведение 1:500 в PBS). Клетки фиксировали в монтирующей среде на основе поливинилового спирта Mowiol 4-88 (кат. номер 9002-89-5, «Sigma-Aldrich», Germany) с антиоксидантом 1% DABCO, в течение 8 ч при +4 °C, затем сутки выдерживали при комнатной температуре.

Образцы исследовали на комплексе лазерного сканирующего конфокального микроскопа Carl Zeiss серии LSM-710 с короткоимпульсным фемтосекундным инфракрасным лазером с перестраиваемым диапазоном (800 - 1500 нм) для мультифотонного возбуждения флуоресценции.

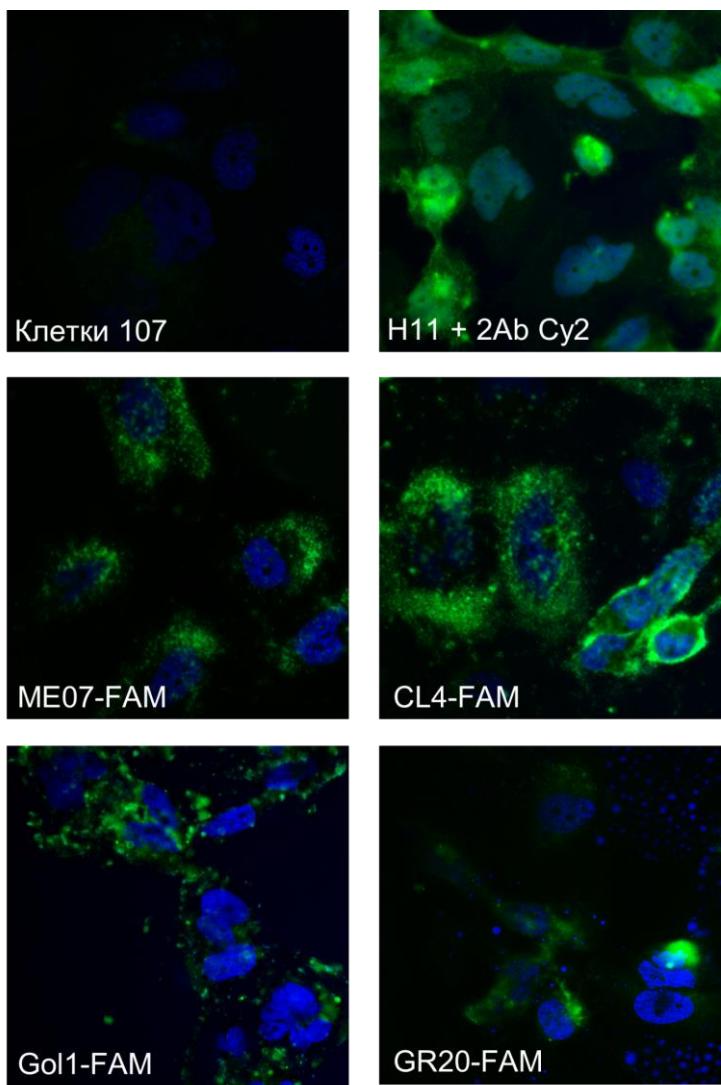


Рисунок А12 - Флуоресцентная микроскопия клеток ПКГБП 107: (А) - клетки без воздействия; (Б) - инкубированные с антителами H11 в составе сэндвич-структуры со вторичными Cy2-меченными антителами; (В,Г) инкубированные с анти-EGFR 2'FY-PHK аптомерами ME07 (В) и (Г) CL4; (Д, Е) с ДНК-аптамерами Gol1 (Д) и GR20 (Е); концентрация добавленного к клеткам олигонуклеотида 1,0 μM , окрашивание при 37°C в течение 180 мин; зеленое свечение - Cy2-метка вторичных антител или FAM-метка олигонуклеотидов, синее - DAPI

Анти-EGFR антитела H11 окрашивали клетки ПКГБП 107, что соответствует довольно высокому относительному количеству мРНК EGFR в клетках 107 (рисунок А5). Клетки ПКГБП 107 с 2'F-Pyr-PHK-аптамерами ME07 и CL4 и с ДНК-аптамерами Gol1 и GR20 демонстрировали свечение метки аптомеров. Клетки ПКГБП 107 с аптомерами разной химической природы давали сигналы разной интенсивности, для 2'F-Pyr-PHK-аптамеров ME07 и CL4 яркость флуоресценции аптомеров была выше.

Таким образом, взаимодействие анти-EGFR аптомеров с клетками ПКГБП 107 возможно детектировать с помощью флуоресцентной микроскопии. Химическая природа аптомеров влияет на эффективность взаимодействия аптомеров с клеткой:

2'F-Pyr-PHK-аптамеры ME07 и CL4 дают более яркое и равномерное окрашивание клеток ПКГБП 107 по сравнению с ДНК-аптамерами G011 и GR20.

A6 Анти-EGFR ДНК-аптамер GR20 и комплекс АККО GR20hh' с ДОКСО взаимодействуют с клетками ГБ крысы¹⁷

Сравнение EGFR человека, мыши и крысы

Важный этап биомедицинского исследования - тестирование на животных моделях. В случае таргетных агентов, таких как аптамеры, возникает вопрос о сопоставлении мишени на человеческих клетках и на клетках животных.

В результате селекции к рекомбинантному внеклеточному домену EGFR (EGFR') человека были отобраны 2'FY-PHK-аптамеры E03, E04, E07¹⁸. Методом сорбции на нитроцеллюлозных фильтрах анализировали Р³²-аптамеры E03, E04, E07 в концентрации 0,1 нМ с EGFR' человека или мыши. Каждая K_D аптамеров E03, E04, E07 к человеческому белку составляла 3.0±0.3, 2.6±0.3, 2.4±0.2 нМ соответственно, была на порядок ниже, чем к мышенному EGFR, K_D составляли 29±1, 48±3, 36±4 нМ, соответственно. Сравнение аминокислотных последовательностей EGFR человека и мыши показало, что белки человека и мыши совпадают на 90,3% (рисунок A61).

Модельным организмом для исследования служат крысы. Проведено сравнение первичных аминокислотных последовательностей EGFR человека и крысы, показано, что белки человека и крысы совпадают по первичным последовательностям на 90,2% (рисунок A62). Полученные результаты сопоставления человеческого и крысиного EGFR позволяют предположить возможность узнавания анти-EGFR аптамерами мишени на клетках крысы.

¹⁷ 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 therapeutics. - 2020. - Т. 30. - №. 3. - С. 175-187. <https://doi.org/10.1089/nat.2019.0830>.

¹⁸ Li N., Nguyen H.H., Byrom M., Ellington A.D. Inhibition of cell proliferation by an anti-EGFR aptamer // PLoS One. - 2011. Т. 6. - №. 6. - С. e20299. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020299>

NP_005219.2 NP_997538.1	MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKVCGTSNKLTQLGTLEDHFLSLQRMFNCEV MRPSGTTTLLVLLTALCAAGGAEEKVCGTSNRQLTGTFEDHFLSLQRMYNCEV ***** :***.***;***.*. *****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	VLGNEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLNLQIIRGNMYYENSYALA VLGNEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLNLQIIRGNALYENTYALA *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	VLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPACNVEISQWRDIVSSDFLSNMSDF ILSNYGTNRTGLRELPMRNLQEILIGAVRFSNNPILCNMTIQWRDIVQNVMFSNMSDL *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	QNHLCSCQKCDPSCPNCWGCAGAEENQCQLTKIICAQQCSCRGRKSPSDCHNQCAAGC QSHPSCPKCDPSCPNCWGGGEENQCQLTKIICAQQCSCRGRSPSDCHNQCAAGC *.** ***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	TGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYV TGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYV *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	VTDHGSCVRACGADSYMEEDGVRKCKCEGPCRKVCGNGIGIGEFKDSL SINATNIKFK VTDHGSCVRACGPDYYVEEDGIRKCKCDGPCRKVCGNGIGIGEFKDSL SINATNIKFK *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	NCTSISGDHLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQEILDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAF YCTAISGDHLHILPWAFKGDSFTTRTPPLDPREILELKTVKEITGFLLIQAWPDNWTLHAF ***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	ENLEIIRGRTKQHQGQFLS LAV VSLNITS LGLRSLKEISDGDIISGNKNL CYANTINWKKL ENLEIIRGRTKQHQGQFLS LAV VGLNITS LGLRSLKEISDGDIISGNRNLCYANTINWKKL *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	FGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCN FGTPNQTKIMNNRAEKDCAVNHVCNPLCSSEGCGPEPRDCVSCQNVSRGRECVKCN ***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	LLEGEPREFVENSECICQCHPECLPQAMNITCTGRGPNDNCIQCAYIDGPHCVKTCPAGVM IIEGEPREFVENSECICQCHPECLPQAMNITCTGRGPNDNCIQCAYIDGPHCVKTCPAGIM *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCPTGPGLEGCPTN--GPKIPSIATGMVGALLLL GENNTLVWKYADANNVCHLCHANCTYGCAGPGLQGCEVwPSGPKIPSIATGIVGGLLFIV *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	VVALGIGLFMRRRHIVRKRTLRLRLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRLKETEFKKIKVL VVALGIGLFMRRRHIVRKRTLRLRLQERELVEPLTPSGEAPNQAHRLKETEFKKIKVL *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	GSGAGFTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKE LREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLL GSGAGFTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKE LREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLL *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	GICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMYNLEDRLVHSDL GICLTSTVQLITQLMPVGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMYNLEDRLVHSDL *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	AARNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGAAEKEYHAEGGKVPKWMalesilhriyTHQSDVW AARNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGAAEKEYHAEGGKVPKWMalesilhriyTHQSDVW *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	SYGVTWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPIC TIDVYMMVKCWMIDADSR SYGVTWELMTFGSKPYDGIPASDISSILEKGERLPQPPIC TIDVYMMVKCWMIDADSR *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	PKFRELIEIFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSP TDNSFYRALMDEEDMDDVDADEYLI PKFRELIEIFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSP TDNSFYRALMDEEDMDDVDADEYLI *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	PQQGFSSPSTSRTPLLSSLSATSNNNSTVACIDRNGLQSCPPIKEDSF LQRYSSDPTGALT PQQGFSSPSTSRTPLLSSLSATSNNNSTVACINRN--GSCRVKEDAFLQRYSSDPTGAVT *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	EDSIDDTFLPVEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPS RDPHYQDPHSTAVGNPEY EDNIDDAFLPVEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLHPAPGRDLHYQPHNSNAVGNPEY **.***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	LNTVQPTCVNSTFDSPA WHAQKGSHQISLDNPDYQODFFPK EAKPNGIFKGSTAENA EYL LNTAQPTCLSSGFNSPALWIQKGSHQMSLDNPDYQODFFPKETKPNGIFKGPTAENA EYL ***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2 NP_997538.1	RVAPQSSFIGA RVAPPSSFIGA *****:*****

Рисунок A13 - Выравнивание аминокислотных последовательностей EGFR человека (NCBI NP_005219.2 EGFR isoform a [Homo sapiens]) и мыши (NP_997538.1 EGFR isoform 1 [Mus musculus]) с помощью онлайн-сервиса CLUSTAL 2.1¹⁹

¹⁹ Sievers F., Wilm A., Dineen D.G., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega // Molecular Systems Biology. - 2011. - Т. 7. - С. 539 <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>

NP_005219.2	MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKVKCQGTSNKLTLGLTFEDHFLSLQRMFNNCEV
NP_113695.2	MRPSGTARTKLLLLAALCAAGGALEKKVCQGTSNRLTQLGLTFEDHFLSLQRMFNNCEV ***** : * *****. * *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	VLGNLIEITYVQRNYDLSFLKTIQEAVAGYVVLIALNTVERIPLLENLQIIRGNMYYENSYALA
NP_113695.2	VLGNLIEITYVQRNYDLSFLKTIQEAVAGYVVLIALNTVERIPLLENLQIIRGNALYENTYALA *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	VLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPACCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDF
NP_113695.2	VLSNYGTNKTGLRELPMRNLQEILIGAVRFSNNPILCNETIQWRDIQDVFLSNMSMDF *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	QNHLGSCQKCDPSCPNCWCGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGC
NP_113695.2	QRHLTGCPKCDPSCPNCWCGREGEENCQKLTKIICAQQCSRRCRGRSPSDCCHNQCAAGC * . * *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	TGPRESDCLVCRKFDRDEATCKDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEKGYSFGATCVKKCPRNV
NP_113695.2	TGPRESDCLVCHRFRDEATCKDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEKGYSFGATCVKKCPRNV *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	VTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLISINATNIKHF
NP_113695.2	VTDHGSCVRACGDPYYVEEDGVSKCKDGPCRKVCNGIGIGEFKDSLISINATNIKHF *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	NCTSIQGDHLIIPVAFRGDSFTTHPPLDQFQELDLKTVKEITGFLLIQAWPENRTDHLAF
NP_113695.2	YCTAISGDHLIIPVAFKGDSFTTRPPLDPRELEILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDHLAF *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	ENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLSKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKL
NP_113695.2	ENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVGLNITSLGLRSLSKEISDGDVIISGNRNLCYANTINWKKL *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	FGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCN
NP_113695.2	FGTPNQTKIIMNRAEKDKATNHVCNPLCSEGCWGPETDCCSVQNSRGRECVDKCN *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	LLEGEPEFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRPDNCIQCAYHIDGPHCVKTCpagVM
NP_113695.2	LLEGEPEFVENSECIQCHPECLPQTMNITCTGRPDNCIQCAYHIDGPHCVKTCPSGIM *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	GENNTLVWKYADAGHVLCHLPNCTYVGCTGPLEGCPTN-GPKIPSIAATGMVGALLLLV
NP_113695.2	GENNTLVWKFDANNVCHLCHANCTYGCAGPGLKGCCQPEGPKIPSIAATGIVGGLLFIIV *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	VALGIGLFMRRRHIVRKRTLRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVGL
NP_113695.2	VALGIGLFMRRRHIVRKRTLRLLQERELVEPLTPSGEAPNQAHRLKETEFKKIKVGL *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	SGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLG
NP_113695.2	SGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLG *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	ICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVOIAGMNYLEDRLVHRDLA
NP_113695.2	ICLTSTVQLITQLMPVGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVOIAGMNYLEDRLVHRDLA *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	ARNVLVKTPOQHVKITDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKPIKWMalesilhrlythqsdvws
NP_113695.2	ARNVLVKTPOQHVKITDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKPIKWMalesilhrlythqsdvws *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	YGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKERLPQPPPICTIDVYMMVKCWMIDADSRP
NP_113695.2	YGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKERLPQPPPICTIDVYMMVKCWMIDADSRP *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	KFRELIELFSKMARPDQRYLVIQGDERMHLPSPDTDNSFYRALMDEEDMDVVADEYLIP
NP_113695.2	KFRELIELFSKMARPDQRYLVIQGDERMHLPSPDTDNSFYRALMDEEDMDVVADEYLIP *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	QQFFSSPSTSRTPLLSSLSATSNNSTVACIDRNGLQSCPPIKEDSFLQRYSSDPTGALTE
NP_113695.2	QQGFNSPSTSRTPLLSSLSANSNNSAACINRN--GCSRVKDAFLQRYSSDPTSVLTE *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	DSIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNLPSPRDPHSTAVGPEYL
NP_113695.2	DNIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLHPAPGRDLHYQNPHSNAVSNPEYL *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	NTVQPTCVNSTFSPAHNAQKGSHQISLDNPDYQDFFPKEAEPNGIFFKGSTAEAEYLR
NP_113695.2	NTAQPTCLSSGFDSALWIKQKGSHQMSLDNPDYQDFFPKEAEPNGIFFKGPTAENAEYLR *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
NP_005219.2	VAPQSSEFIGA
NP_113695.2	VAPPSSSEFIGA *** *****

Рисунок A14 - Выравнивание белковых последовательностей EGFR человека (идентификатор NCBI NP_005219.2 EGFR isoform a [Homo sapiens]) и крысы (NP_113695.2 EGFR isoform 1 precursor [Rattus norvegicus]) с помощью онлайн-сервиса CLUSTAL 2.1²⁰

²⁰ Sievers F., Wilm A., Dineen D.G., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega // Molecular Systems Biology. - 2011. - Т. 7. - С. 539 <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>

Аптамер GR20 и его вариант GR200

Аптамер GR200 представляет собой производное ДНК-аптамера GR20, содержащее однонуклеотидную замену T44C (рисунок А15). Аффинность ДНК-аптамера GR200 к рекомбинантному внеклеточному домену EGFR человека в сравнении с аффинностью GR20 не снижалась²¹. Более того, в той же статье показана возможность введения дополнительного пиренового заместителя в нуклеотид T22 ДНК-аптамера GR200, что не препятствовало взаимодействию с рекомбинантным внеклеточным доменом EGFR человека.

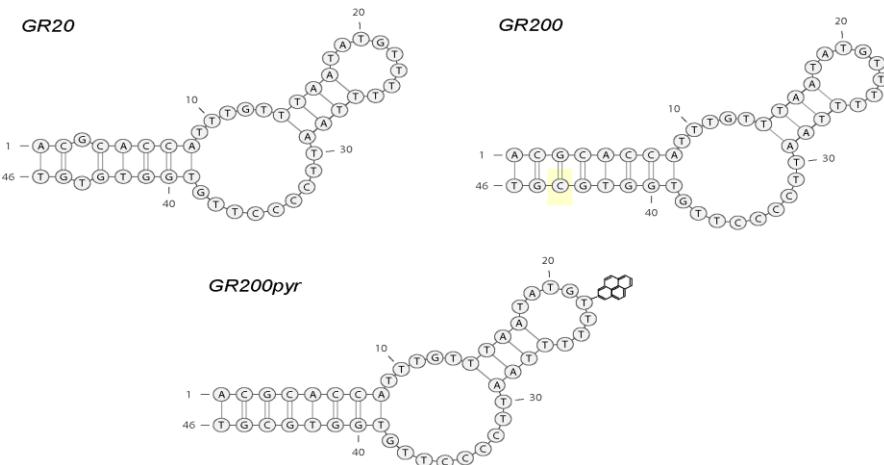
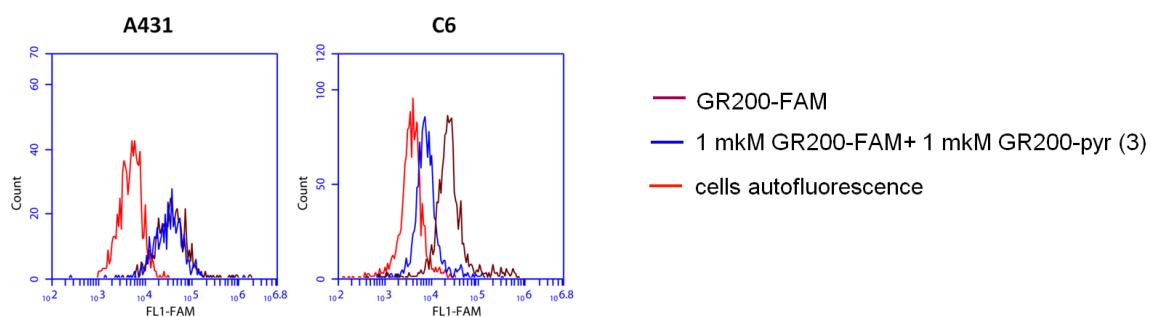


Рисунок А15 - Сравнение первичных и предполагаемых вторичных структур ДНК-аптамеров GR20 и GR200, пиреновый заместитель в GR200pyr

При инкубации 1 μ M FAM-меченого ДНК-аптамера GR200 с клетками A431 наблюдали сдвиг сигнала проточной цитометрии. В случае инкубации клеток A431 со смесью 1:1 флуоресцентно-меченого ДНК-аптамера FAM-GR200 с не флуоресцентным производным GR200-pyr с пиреновым заместителем не наблюдали изменения СЗИФ гистограммы распределения флуоресценции, что может свидетельствовать о том, что используемая концентрация 1 μ M дает эффект насыщения клеток A431 в обоих случаях, единичного аптамера и смеси (рисунок А16).



²¹ 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 therapeutics. - 2020. - Т. 30. - №. 3. - С. 175-187. <https://doi.org/10.1089/nat.2019.0830>.

Рисунок A16 - ПЦФ взаимодействия 1 μM FAM-меченного ДНК-аптамера FAM-GR200 (черные линии), смеси 1:1 флуоресцентно-меченного ДНК-аптамера FAM-GR200 с GR200-pyr с пиреновым заместителем (синие линии) с клетками человека A431 и глиобластомы крысы C6, автофлуоресценция клеток показана красным. Исследование выполнено на приборе Accuri C6 (BD Bioscience, Австрия)

Клетки линии ГБ крысы С6 были любезно предоставлены НИИ морфологии человека имени А.В. Авцына «Петровского национального исследовательского центра хирургии» (Москва, Российская Федерация). Исследование, описанное в данном разделе выполнено в коллaborации с сотрудниками Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской Академии Наук Ревищина А.В. и НИИ морфологии человека имени А.В. Авцына «Петровского национального исследовательского центра хирургии» Алексеевой А.Н. Клетки выращивали с использованием среды DMEM/F12 с пируватом натрия (ООО «ПанЭко», Россия), дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS, Invitrogen, США), 1% HEPES, 1% GlutaMAX и 1% стрептомицина (Invitrogen, США); при 37°C в атмосфере 5% CO₂, при пассаже клеток использовался 0,05% трипсин-ЭДТА (ООО «ПанЭко», Россия).

При инкубации 1 μM флуоресцентного ДНК-аптамера GR200 с клетками линии ГБ крысы С6 наблюдался сдвиг сигнала проточной цитометрии, что говорит о наличии взаимодействия ДНК-аптамера с клетками глиобластомы крысы С6. В случае инкубации клеток С6 со смесью в соотношении 1:1 FAM-меченого ДНК-аптамера FAM-GR200 с производным GR200-pyr с пиреновым заместителем наблюдалось снижение СЗИФ, следовательно, для клеток С6 взаимодействие с GR200-pyr в случае смеси оказывается предпочтительным (рисунок А64). Поведение EGFR-положительных клеток A431 и клеток глиобластомы крысы С6 по отношению к аптамеру GR200 с флуоресцентной меткой и пиреновым заместителем оказалось различным (рисунок А16).

2'F-Pyr-РНК-аптамеры ME07 и ДНК-аптамеры GR20 и Goll взаимодействуют с клетками крысы

При инкубации 1 μM FAM-меченых 2'F-Pyr-РНК-аптамера ME07 и ДНК-аптамеров GR20 и Goll с клетками линии ГБ крысы С6 во всех случаях наблюдался сдвиг сигнала проточной цитометрии, что говорит о наличии взаимодействия аптамеров с клетками глиобластомы крысы С6 (рисунок А17). При этом наиболее сильный сдвиг сигнала наблюдался для ДНК-аптамера GR20.

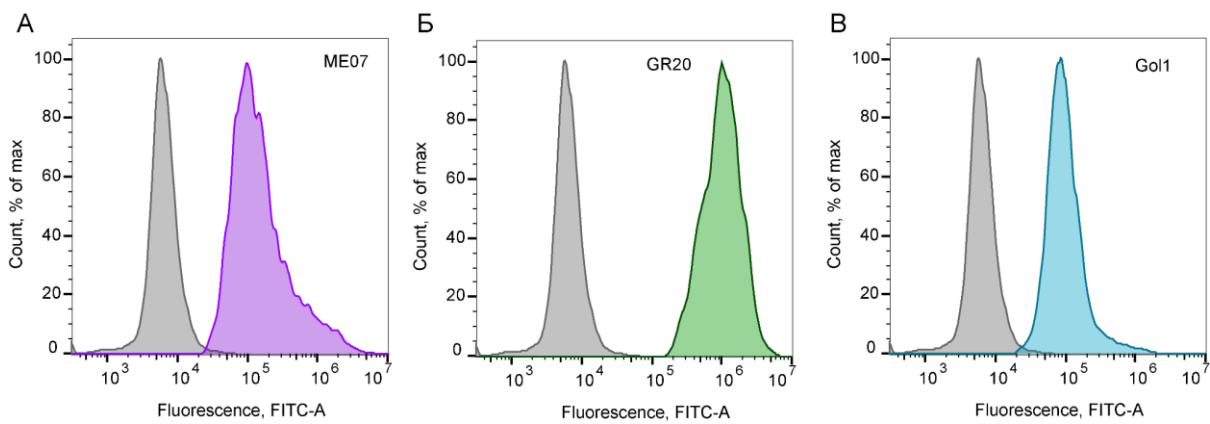


Рисунок А17 - ПЦФ взаимодействия 1 μM FAM-меченные 2'F-Pyr-PHK-аптамера FAM-ME07 (фиолетовый), ДНК-аптамеров FAM-GR20 (зеленый) и FAM-Gol1 (голубой) с клетками линии ГБ крысы С6, автофлуоресценция клеток показана красным. Исследование выполнено на приборе CytoFlex (Beckman Coulter, Канада)

Глиобластома крысы 101-8 представляет собой тканевую опухоль, приближенную к гетерогенной опухоли человека с точки зрения морфологии и гистологии опухоли²². Диссоциированные клетки опухоли глиобластомы крысы 101-8 были любезно предоставлены НИИ морфологии человека имени А.В. Авцына «Петровского национального исследовательского центра хирургии» (Москва, Российская Федерация). Клетки инкубировали в среде DMEM/F12 (ООО «ПанЭко», Россия), дополненной 10% FCS (Invitrogen, США). Взаимодействие аптамеров с клетками тканевой опухоли глиобластомы крысы 101-8 исследовали методом проточной цитофлуориметрии.

²² Пронин И.Н., Постнов А.А., Липенгольц А.А., Павлова Г.В., Ревищн А.В., Скибицкий В.А., Финогенова И.А., Смирнова А.В., Шпакова К.Е., Григорьева Е.И., Козлова Ю.А., Алексеева А.И. Новая тканевая модель глиобластомы 101.8 в экспериментах на крысах: сравнительное ПЭТ-КТ-исследование с клеточной линией глиобластомы С6 [A Novel Rat Glioblastoma 101/8 Model: A Comparative PET-CT Study with C6 Rat model] // Журнал вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. - 2024. - Т. 88. - №. 6. - С. 54-62. Russian. <https://doi.org/10.17116/neiro20248806154>

Alekseeva A.I., Gerasimov A.D., Kudelkina V.V., Osipova N.S., Drozd S.F., Pavlova G.V., Kosyreva A.M., Fatkhudinov T.K. Changes in Oncogene Expression in Experimental Glioblastoma 101.8 Rats during Therapy with PLGA Nanoparticles Loaded with Doxorubicin // Bull Exp Biol Med. - 2023. - Т. 174. - №. 4. - С. 518-522. <https://doi.org/10.1007/s10517-023-05740-2>

Sentyabreva A., Miroshnichenko E., Artemova D., Alekseeva A., Kosyreva A. Morphological and Molecular Biological Characteristics of Experimental Rat Glioblastoma Tissue Strains Induced by Different Carcinogenic Chemicals // Biomedicines. - 2024. - Т. - 12. - №. 4. - С. 713. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12040713>

Kucheryavenko A.S., Chernomyrdin N.V., Gavdush A.A., Alekseeva A.I., Nikitin P.V., Dolganova I.N., Karalkin P.A., Khalansky A.S., Spektor I.E., Skorobogatiy M., Tuchin V.V., Zaytsev K.I. Terahertz dielectric spectroscopy and solid immersion microscopy of *ex vivo* glioma model 101.8: brain tissue heterogeneity // Biomed Opt Express. - 2021. Т. 12. - №. 8. - С. 5272-5289. <https://doi.org/10.1364/BOE.432758>

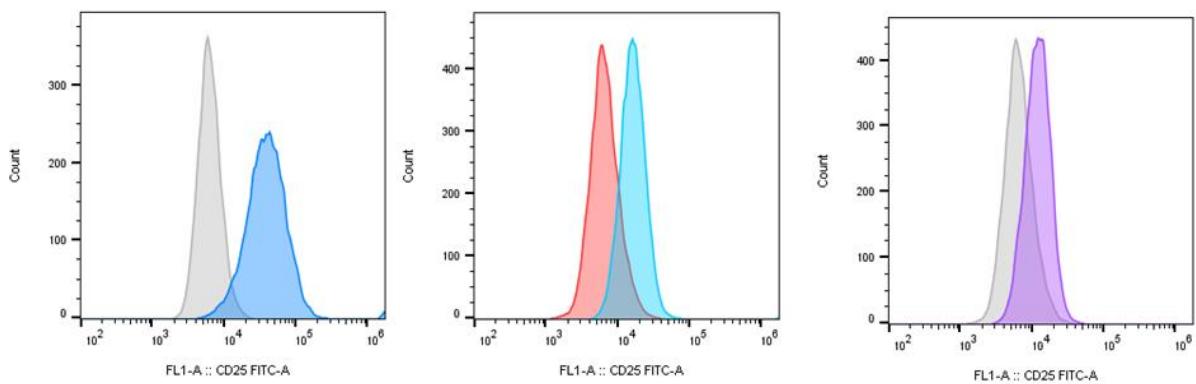


Рисунок А18 - ПЦФ взаимодействия 1 μ M FAM-меченых 2'F-Pyr-PHK-аптамера ME07 (синий), ДНК-аптамеров GR20 (голубой) и Gol1 (фиолетовый) с диссоциированными клетками тканевой глиобластомы крысы 101-8, автофлуоресценция клеток показана серым или красным. Исследование выполнено на приборе CytoFlex (Beckman Coulter, Канада)

После инкубации 1 μ M флуоресцентно-меченых 2'F-Руг-РНК-аптамера ME07 и ДНК-аптамеров GR20 и Gol1 с клетками диссоциированной тканевой глиобластомы крысы 101-8 наблюдался сдвиг сигнала проточной цитометрии, что говорит о наличии взаимодействия аптамеров с клетками глиобластомы крысы 101-8 (рисунок А18). Наиболее выражен сдвиг диссоциированных клеток 101-8 с 2'F-Руг-РНК-аптамером ME07.

Комплекс AKKO GR20hh' с ДОКСО стабилен в крысе

Доксорубицин, интеркалированный в аптамерную конструкцию GR20hh' удлиненного аптамера GR20h, гибридизованного с комплементарным олигонуклеотидом h', можно использовать для доставки токсического агента в опухоль. Исследование, описанное в данном разделе выполнено в коллaborации с сотрудниками ИВНД и НФ РАН Ревищина А.В. и НИИ морфологии человека имени А.В. Авцына «Петровского национального исследовательского центра хирургии» Алексеевой А.Н. Проведение экспериментов на животных было одобрено локальным этическим комитетом ИВНД и НФ РАН. Действие комплекса GR20hh'+ДОКСО оценивали при при интракраниальном введении в опухоль ГБ крысы, сформированную клетками линии ГБ крысы С6 или клетками тканевой ГБ крысы 101/8 (рисунок А19).

A

C6

Б

101/8

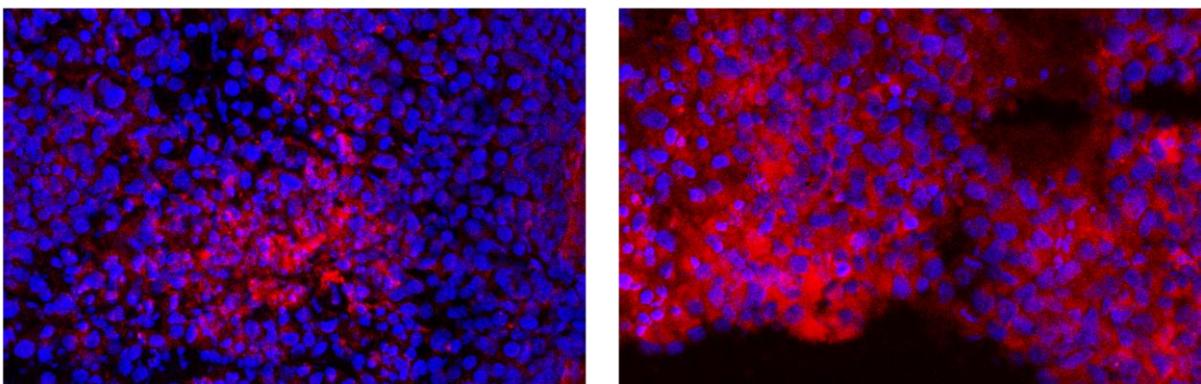


Рисунок А19 - Микрофотографии срезов опухоли ГБ мозга крысы, сформированной клетками ГБ крысы С6 (А), тканевой ГБ крысы 101-8 (Б) через 1 час после введения GR20hh' +ДОКСО в концентрации 1 μ M, красное свечение - ДОКСО, синее - DAPI

Комплекс GR20hh'+ДОКСО в концентрации 1 мкМ вводили интракраниально в опухоль крысы. На микрофотографии среза опухоли наблюдали собственное флуоресцентное свечение ДОКСО, распределенное по объему опухоли. Следовательно, доксорубицин в составе аптамерного комплекса GR20hh'+ДОКСО стабилен в опухоли как минимум в течение 1 часа, что открывает возможности для использования аптамерной конструкции с комплементарным олигонуклеотидом GR20hh'+ДОКСО для терапевтического применения.

A7 Анти-CD133 2'F-РнК-аптамер A15 взаимодействует с клетками ПКГБП 107 и Sus/fP2 в присутствии блокирующих нуклеиновых кислот

Отбор и исследования аффинности аптамеров на клетках часто проводятся с использованием блокирующих нуклеиновых кислот. Для терапевтического применения аптамеров подход, включающий использование дополнительных, повышающих специфичность компонентов, не приемлем. Будет ли различаться поведение клеток ПКГБП по отношению к анти-CD133 аптамеру A15 при использовании блокирующих нуклеиновых кислот? Для цели проверки гипотезы о взаимодействии клеток с нуклеиновыми кислотами была использована стандартная смесь блокирующих нуклеиновых кислот, включающая 0,1 мг/мл транспортной РНК дрожжей и 0,1 мг/мл ДНК лосося (далее именуемая блокирующие нуклеиновые кислоты). Перед добавлением и инкубацией клеток с аптамером A15 клетки культур глиобластом пациентов 107 и Sus/fP2 были подвергнуты дополнительно инкубации в растворе блокирующих нуклеиновых кислот в течение часа. Указанный прием позволяет заблокировать на поверхности клеток сайты возможного связывания

нуклеиновых кислот, что может приводить к повышению специфичности взаимодействия клеток с аптамером *in vitro*.

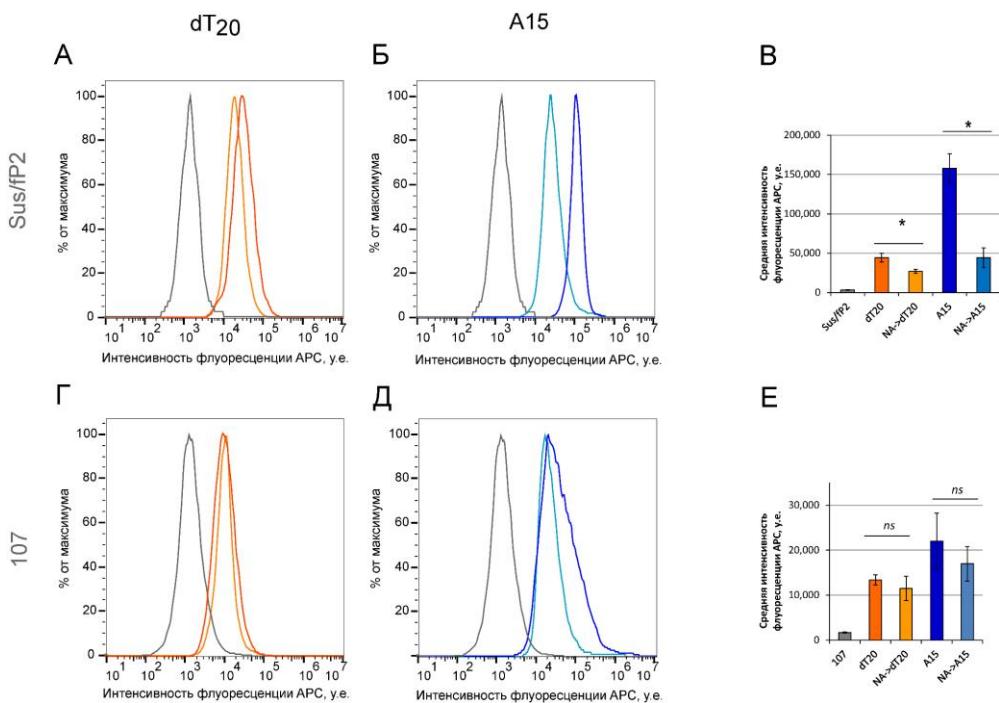


Рисунок A20 - ПЦФ клеток ПКГБП *Sus/fP2* (А, Б) и 107 (Г, Д) после инкубации с 1 μ M Су5-меченых неаптамерным ДНК-олигонуклеотидом *dT*₂₀ (А, Г, красный) и 2'F-РуР-РНК-аптамером *A15* (Б, Д, синий) напрямую и после 1 часа предварительной инкубации с коктейлем блокирующих нуклеиновых кислот, 0,1 мг/мл дрожжевой *mРНК* и 0,1 мг/мл двухцепочечной ДНК молок лосося (оражевый и голубой);
В, Е - статистический анализ данных, ns - не значимое, * - $p < 0.05$

В клетках ПКГБП *Sus/fP2* относительное количество мРНК CD133 ниже предела детекции и проточная цитофлуориметрия клеток *Sus/fP2* с анти-CD133 антителами дает отрицательный результат. Инкубация клеток *Sus/fP2* напрямую с аптамером *A15* давала сильный сдвиг сигнала проточной цитометрии (рисунок А13). Предварительная инкубация клеток *Sus/fP2* с коктейлем блокирующих нуклеиновых кислот приводила к значимому уменьшению амплитуды сигнала аптамера *A15* до уровня сигнала неаптамерного олигонуклеотида (рисунок А13). Такое поведение клеток *Sus/fP2* хорошо согласуется с результатом взаимодействия с этими клетками неаптамерного 2'F-РуР-РНК-олигонуклеотида NARO (рисунок 45). Неполное блокирование взаимодействия 2'F-РуР-РНК-аптамера *A15* с клетками *Sus/fP2* может происходить вследствие нескольких возможных причин. Во-первых, необходимо учитывать различную химическую природу аптамера *A15* и нуклеиновых кислот, используемых для блокирования: возможно, сайты взаимодействия коротких 2'F-РуР-РНК на поверхности клеток *Sus/fP2* не совпадают с сайтами взаимодействия структурированной немодифицированной РНК (тРНК) и сайтами взаимодействия двухцепочечной ДНК (ДНК молок лосося), и остаются свободными для

взаимодействия с аптамером A15. Во-вторых, необходимо учитывать наличие на аптамере флуоресцентной метки, цианин-5. Флуоресцентные красители могут активно взаимодействовать с мембраной клетки, что также может приводить к появлению сигнала флуоресцентно-меченого аптамера в отсутствие мишени. Это обстоятельство необходимо учитывать при использовании аптамеров. Тем не менее, наблюдаемые сдвиги сигналов проточной цитометрии оказываются настолько различными для разных типов клеток, что невозможно объяснить их только взаимодействием флуоресцентной метки с мембраной клетки.

Клетки культуры глиобластомы 107 с высокой экспрессией мРНК CD133, демонстрирующие сложный профиль сигнала проточной цитометрии после инкубации с антителами к CD133, после инкубации с аптамером A15 напрямую давали усиленный сигнал с сильным сдвигом. Инкубация с блокирующими нуклеиновыми кислотами перед анализом взаимодействия клеток 107 с аптамером A15 проточной цитометрией приводила к небольшому снижению амплитуды сдвига, кроме того, сигнал сужался, что говорит о большей гомогенности популяции взаимодействующих с аптамером A15 клеток 107 (рисунок А13).

A8 Взаимодействие нуклеиновых кислот и флуоресцентного декстрана с клетками линии Caco-2 и ПКГБП Sus/fP2

Если сравнивать поведение клеток культуры глиобластомы Sus/fP2 с линейными клетками Caco-2, можно заметить, что даже инкубация с неаптамерным олигонуклеотидом NADO с флуоресцентной меткой FAM дает для двух сравниваемых типов клеток различный результат: клетки Caco-2 не изменяют интенсивности флуоресценции после инкубации с FAM-NADO, в то время как клетки Sus/fP2 явно демонстрируют взаимодействие с неаптамерным олигонуклеотидом, что приводит к сдвигу сигнала флуоресценции (рисунок А21). Возникает закономерный вопрос, чем обусловлено изменение сигнала в случае клеток Sus/fP2? Чтобы прояснить, влияет ли химическая природа флуоресцентно-меченого агента на эффективность взаимодействия с клетками, на двух типах клеток Caco-2 и Sus/fP2 исследован зеленый флуоресцентный декстран с молекулярным весом 10 кДа (Invitrogen, США), что соответствует размеру исследуемых аптамеров (рисунок А81). Если для линейных клеток взаимодействие с декстраном наблюдалось при инкубации клеток Caco-2 с высокой концентрацией декстрана 10 мкМ и при физиологической температуре 37°С,

что согласуется с опубликованными данными²³, то клетки Sus/fP2 активно взаимодействуют с молекулами декстрана при более низкой температуре (рисунок А21). Активность эндоцитоза клеток опухоли глиобластомы пациента Sus/fP2, как и ожидалось, снижалась при пониженной и возрастала при повышенной температуре. Десятикратное изменение концентрации инкубированного с клетками Sus/fP2 зеленого флуоресцентного декстрана от 0,1 μM до 10 μM приводило к соответствующему увеличению сдвига сигнала проточной цитометрии (рисунок А21).

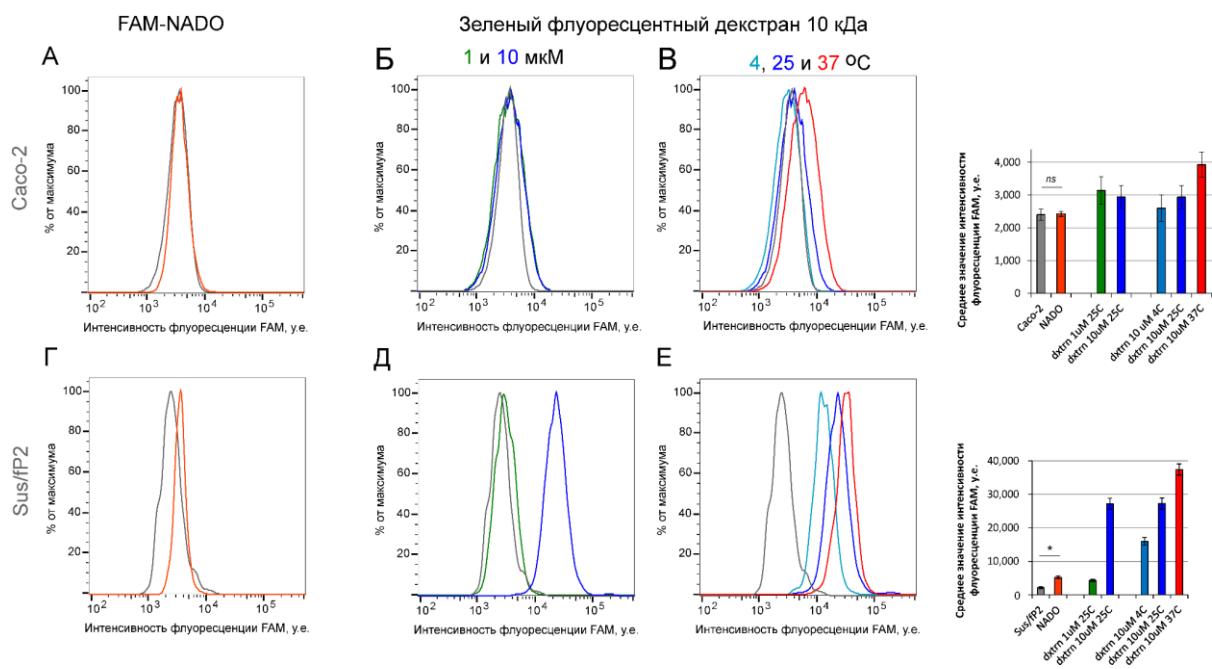


Рисунок А21 – ПЦФ клеток Caco-2 (A-B) и Sus/fP2 (Г-Е) с FAM-меченым неаптамерным олигонуклеотидом (A, Г) и зеленым флуоресцентным декстраном: Б, Д - концентрации декстрана 1 μM (зеленая линия) и 10 μM (синяя линия) при температуре 25°C; В, Е - стандартная концентрация декстрана 10 μM , инкубированная с клетками при температурах 4°C (голубая линия), 25°C (синяя линия) и 37°C (красная линия); количественное сравнение интенсивностей флуоресценции, ns - не значимое различие, * - $p < 0.05$

Таким образом, клетки могут демонстрировать различный характер взаимодействия с флуоресцентными МУзЭлями. В частности, клетки ПКГБП Sus/fP2 обладают способностью к активному эндоцитозу, это показано не только для флуоресцентно-меченых нуклеиновых кислот, но и на примере флуоресцентно-меченого декстрана. В этом случае становится понятным, почему применение коктейля блокирующих нуклеиновых кислот не снижает до нуля сигнал взаимодействия олигонуклеотида с клетками Sus/fP2 (Приложение А7). Поведение клеток опухоли,

²³ Bourseau-Guilmain E., Griveau A., Benoit J.P., Garcion E. The importance of the stem cell marker prominin-1/CD133 in the uptake of transferrin and in iron metabolism in human colon cancer Caco-2 cells / PLoS One. 2011. - Т. 6. - №9. - С.e25515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025515>

подобных Sus/fP2, бенефициарно в контексте терапии, поскольку в силу особенности поведения данные клетки будут взаимодействовать с любым агентом, без необходимости наличия мишени таргетного агента на их поверхности. Трансляция аптамеров для применения в качестве терапевтических агентов невозможна без учета обнаруженных нами особенностей клеток ПКОГБП.

A9 Взаимодействие анти-EGFR 2'F-Pyr-РНК- и ДНК-аптамеров с клетками ПКОГБП 107 с нокдауном EGFR

Взаимодействует ли короткий аптамер GR20 именно с мишенью EGFR в составе клеток? Для этой цели изучено взаимодействие аптамеров с клетками с нокдауном мишени EGFR. Уровень EGFR регулировали с помощью подхода с использованием анти-EGFR siRNA. Для эксперимента были выбраны клетки ПКОГБП 107, с высоким уровнем экспрессии мРНК EGFR (Рисунок А22).

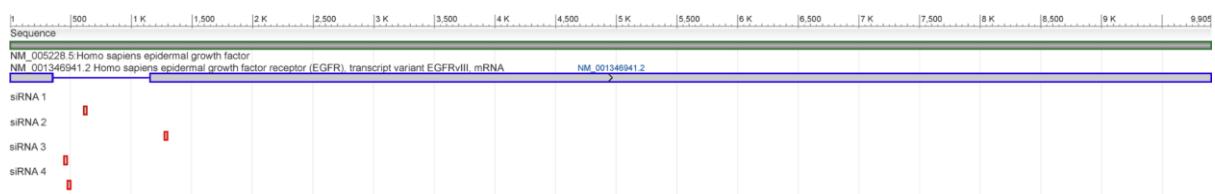


Рисунок А22 – Отжиг анти-EGFR siRNA на зрелых транскриптах мРНК EGFR (зеленая линия) и EGFRvIII (синяя линия)

Снижение экспрессии EGFR происходило при действии коктейля из четырех siRNA (siRNA1 - siRNA4), комплементарных четырем участкам мРНК EGFR (рисунок А22). В качестве контроля использовали siRNA с рандомизированной нуклеотидной последовательностью, для контроля работы метода использовали известную siRNA к GAPDH.

Таблица А3 - Нуклеотидные последовательности siRNA, используемые в работе

Шифр siRNA	Мишень siRNA	Нуклеотидная последовательность siRNA
scrambled siRNA	нет	s - GAAAUAUUGUUAAGAUCGAGAGUAUC as - GAUACUCUCGAUCUUAACAAUAUUCU
siRNA (GAPDH)	GAPDH	s - UGACCUAACUACAUGGUUUU as - AAAAACCAUGUAGUUGAGGUC
siRNA1	EGFR	s - UGUUGAGGGCAAUGAGGACAUAAACCUU as - GGUAUGUCCUCAUUGCCCUCACAUU
siRNA2	EGFR	s - AAUAUGAUCUUCCUUCUAAAGACCUU as - GGCUUUAGAAGGAUCAUAAUUUU
siRNA3	EGFR	s - UAUUGGAGCAUGACCACGGAGGAUAGUA

		as - UUACUAUCCUCGUGGUCAUGCUCAAU
siRNA4	EGFR	s - GAAAGUUAAAUCCCGUCGCUAUCAU as - UUGAUAGCGACGGAAUUUAACUUUCUU

Клетки ПКГБП 107 высаживали 2×10^5 клеток на лунку в шести луночном планшете в 2 мл ростовой среды DMEM/F12 с добавлением 10% FBS. Клетки инкубировали при 37°C в присутствии 5% CO₂ до 60-80% конфлюэнтности в течение суток. После этого клетки промывали раствором PBS. Растворы siRNA, нуклеотидные последовательности которых приведены в таблице А3, в концентрации 0,4 мкМ в 100 мкл ростовой среды DMEM/F12 без FBS смешивали с раствором 20 мкл реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Life Technologies, США) в 100 мкл ростовой среды DMEM/F12 без FBS, тщательно перемешивали и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре.

К клеткам добавляли 1000 мкл ростовой среды DMEM/F12 без FBS с коктейлем siRNA и липофектамином. Клетки инкубировали 5 часов при 37 °C в атмосфере 5% CO₂. Далее добавляли 1 мл ростовой среды DMEM/F12, содержащей 2-кратную концентрацию FBS (20%), восстанавливая процент сыворотки до рутинно используемого, после чего инкубировали клетки еще сутки.

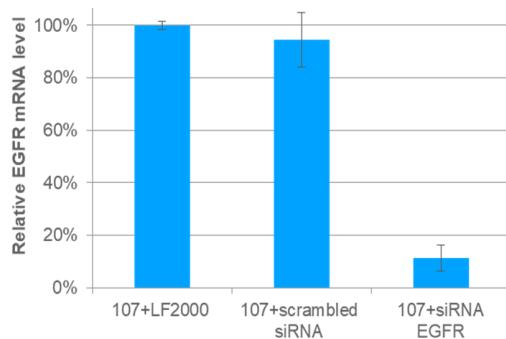


Рисунок А23 – Оценка относительного количества мРНК EGFR методом кПЦР в клетках ПКГБП 107 после добавления только липофектамина, scrambled siRNA и коктейлем анти-EGFR siRNA

Относительное количество мРНК EGFR значимо снижалась в клетках ПКГБП 107 после трансфекции анти-EGFR siRNA, в то время как при трансфекции scrambled siRNA значимого снижения относительного количества мРНК EGFR не наблюдалось.

Стандартный контроль проводился трансфекцией в клетки ПКГБОП 107 анти-GAPDH siRNA, при этом количество прикрепленных клеток ПКГБОП 107 после трансфекции анти-GAPDH siRNA значительно снижалось, что, вероятно, обусловлено критической важностью гена GAPDH для жизнеспособности клетки. Тем не менее, для оставшихся живых клеток 107 после 24 часов после трансфекции анти-GAPDH siRNA относительное количество мРНК GAPDH по отношению к мРНК другого гена

домашнего хозяйства, β -актина, показало значимое снижение по сравнению с клетками, обработанными только липофектамином, или трансфицированных scrambled siRNA, или трансфицированных коктейлем четырех анти-EGFR siRNA (рисунок A23).

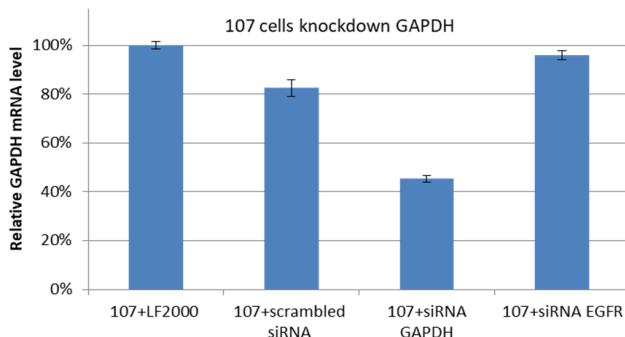


Рисунок A24 – Относительное количество мРНК GAPDH, определенное методом кПЦР в клетках ПКГБП 107 после добавления только липофектамина, scrambled siRNA, анти-GAPDH siRNA и коктейлем анти-EGFR siRNA

Таким образом, используемый протокол нокдауна EGFR в клетках ПКГБП 107 позволяет снизить относительное количество мРНК EGFR в клетках, причем важно, что трансфекция не затрагивает гены домашнего хозяйства клеток, на которые нормированы значения относительного количества мРНК EGFR.

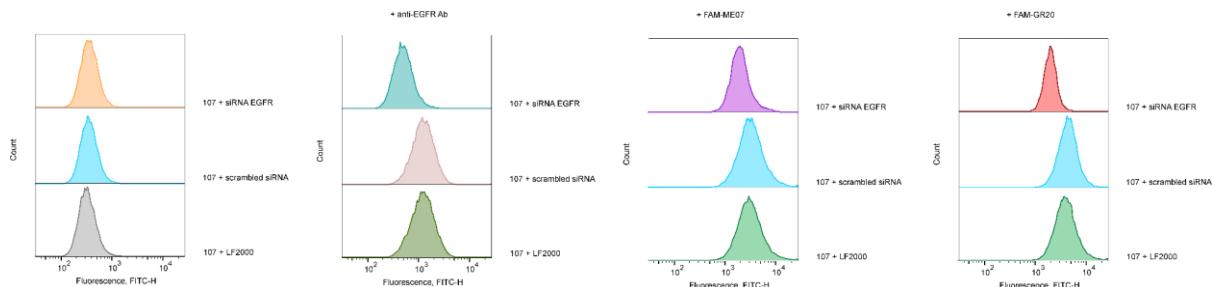


Рисунок A25 – ПЦФ клеток ПКГБП 107, подвергнутых действию только липофектамина (нижние), после добавления scrambled siRNA (средние) и трансфицированных коктейлем четырех анти-EGFR siRNA (верхние), с анти-EGFR антителами в сэндвич-варианте со вторичными антителами с Cy2-меткой (Б), с 1 μ M FAM-меченого 2'F-Пyr-PHK-аптамера ME07 (Б), с 1 μ M FAM-меченого ДНК-аптамера GR20

Клетки ПКГБП 107, обработанные только липофектамином, или трансфицированные scrambled siRNA, и клетки 107 с нокдауном EGFR коктейлем четырех анти-EGFR siRNA, были инкубированы с различными узнавающими EGFR элементами и проанализированы методом проточной цитофлуориметрии на приборе SinoCyteX (Китай) ЦКП "Технологии анализа и сортировки клеток" (рисунок A25).

Инкубация клеток 107 с анти-EGFR антителами C4 (Cloud Clone, Китай) приводила к

положительному сдвигу сигнала проточной цитометрии для клеток 107, подвергнутых воздействию липофектамина и scrambled siRNA. Клетки 107 с нокдауном EGFR с анти-EGFR антителами демонстрировали сниженный сдвиг сигнала, но не до уровня автофлуоресценции клеток, что согласуется со снижением относительного количества мРНК EGFR для клеток 107 с нокдауном EGFR. При инкубации клеток 107 с нокдауном EGFR с FAM-меченными анти-EGFR 2'FY-РНК аптамером ME07 и ДНК-аптамером GR20 подобно антителам сигнал снижался по сравнению с клетками 107, подвергнутыми воздействию липофектамина или scrambled siRNA. Сигнал проточной цитометрии клеток 107 с анти-EGFR 2'F-Pyr-РНК- и ДНК-аптамерами коррелировал с относительным количеством мРНК EGFR, следовательно, взаимодействие анти-EGFR аптамеров оказалось EGFR-зависимым. Более того, снижение сигнала в случае ДНК-аптамера GR20 для клеток 107 было более явным, чем для 2'F-Pyr-РНК-аптамера ME07 в той же концентрации и с той же флуоресцентной меткой, что поддерживает гипотезу о большем вкладе мишень-независимого взаимодействия для 2'F-Pyr-РНК с клетками²⁴.

²⁴ Pallan P.S., Greene E.M., Jicman P.A., Pandey R.K., Manoharan M., Rozners E., Egli M. Unexpected origins of the enhanced pairing affinity of 2'-fluoro-modified RNA / Nucleic Acids Res. - 2011. - T. 39. - №8. - C. 3482-95. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1270>