

DOI: 10.15690/vramn591

Н.А. Зенинская<sup>1</sup>, А.В. Колесников<sup>1,2</sup>, А.К. Рябко<sup>1</sup>, И.Г. Шемякин<sup>1</sup>, И.А. Дятлов<sup>1</sup>, А.В. Козырь<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Российская Федерация

<sup>2</sup> Институт инженерной иммунологии, Любучаны, Российская Федерация

## Аптамеры для терапии бактериальных инфекций: проблемы и перспективы

*Аптамеры — короткие одноцепочечные фрагменты нуклеиновых кислот, которые в процессе направленной химической «эволюции в пробирке» на основе технологии SELEX отбирают на специфичность к избранной молекулярной мишени. Возможность получать при помощи SELEX олигонуклеотиды, связывающие широчайший спектр высоко- и низкомолекулярных лигандов, а также простота автоматизированного синтеза привели к созданию широкого спектра приложений аптамеров — от биосенсоров до противоопухолевых препаратов. С точки зрения медицинской химии, аптамеры являются новым классом молекул, на основе которых могут быть разработаны лекарственные препараты. Поэтому, а также ввиду стабильности, относительной простоты синтеза и создания все более эффективных стратегий селекции мишеньспецифических молекул аптамеры привлекают внимание разработчиков лекарственных средств, в том числе и антибактериальных. Интерес к антибактериальным аптамерам усиливается и в связи с проблемами, возникшими при разработке принципиально новых антибактериальных средств на основе классических химических соединений — как малых органических молекул, так и синтетических модификаций известных антибиотиков. В настоящем обзоре рассматриваются работы, направленные на создание противоинфекционных аптамеров, и обсуждаются как потенциал, так и существующие на данном этапе ограничения, свойственные этому классу терапевтических молекул.*

**Ключевые слова:** аптамеры, SELEX-терапия бактериальных инфекций.

*(Для цитирования:* Зенинская Н.А., Колесников А.В., Рябко А.К., Шемякин И.Г., Дятлов И.А., Козырь А.В. Аптамеры для терапии бактериальных инфекций: проблемы и перспективы. *Вестник РАМН.* 2016;71(5):350–358. doi: 10.15690/vramn591)

350

### Введение

Термин «аптамер» происходит от латинского «*ap-tus*», что значит «соответствие», и греческого «*meros*» — «область» [1, 2]. В основе парадигмы аптамеров как возможных лигандов, связывающих биомолекулы, лежат представления о взаимодействии нуклеиновых кислот с белками [3], низкомолекулярными лигандами (рибосвитчи, или рибопереключатели) [4], а также о каталитической активности рибо- и дезоксирибонуклеиновых кислот (РНК и ДНК) [5, 6].

Впервые работы, посвященные технологии селекции мишеньспецифических аптамеров, впоследствии получившей название SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением), были опубликованы в 1990 г. [7, 8.] Первый лекарственный препарат на основе аптамера Макуген (Macugen) был разрешен к применению в 2004 г. [9]. К настоящему моменту более десяти аптамерных терапевтических молекул находятся на различных стадиях клинических испытаний [10]. Аптамеры получают путем селекции *in vitro* комбинатор-

N.A. Zeninskaya<sup>1</sup>, A.V. Kolesnikov<sup>1,2</sup>, A.K. Ryabko<sup>1</sup>, I.G. Shemyakin<sup>1</sup>, I.A. Dyatlov<sup>1</sup>, A.V. Kozyr<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

<sup>2</sup> Immunological Engineering Institution, Lyubuchany, Russian Federation

## Aptamers in the Treatment of Bacterial Infections: Problems and Prospects

*Aptamers are short single-stranded oligonucleotides which are selected via targeted chemical evolution in vitro to bind a molecular target of interest. The aptamer selection technology is designated as SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment). SELEX enables isolation of oligonucleotide aptamers binding a wide range of targets of interest with little respect for their nature and molecular weight. A number of applications of aptamer selection were developed ranging from biosensor technologies to antitumor drug discovery. First aptamer-based pharmaceutical (Macugen) was approved by FDA for clinical use in 2004, and since then more than ten aptamer-based drugs undergo various phases of clinical trials. From the medicinal chemist's point of view, aptamers represent a new class of molecules suitable for the development of new therapeutics. Due to the stability, relative synthesis simplicity, and development of advanced strategies of target specific molecular selection, aptamers attract increased attention of drug discovery community. Difficulties of the development of next-generation antibiotics basing on the conventional basis of combinatorial chemistry and high-throughput screening have also amplified the interest to aptamer-based therapeutic candidates. The present article reviews the investigations focused on the development of antibacterial aptamers and discusses the potential and current limitations of the use of this type of therapeutic molecules.*

**Key words:** aptamers, nucleotide, SELEX aptamer technique bacterial infections.

*(For citation:* Zeninskaya NA, Kolesnikov AV, Ryabko AK, Shemyakin IG, Dyatlov IA, Kozyr AV. Aptamers in the Treatment of Bacterial Infections: Problems and Prospects. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2016;71(5):350–358. doi: 10.15690/vramn591)

ных библиотек ДНК- или РНК-олигонуклеотидов длиной 50–70 мономерных звеньев. Прямой химический синтез позволяет получать библиотеки олигонуклеотидов, состоящие из  $10^{17}$  и даже более уникальных молекул. Такой уровень сложности библиотеки на многие порядки превышает разнообразие фаг-дисплейных (Phage display) или экспрессионных библиотек, получаемых генно-инженерными методами (не более  $10^{12}$ – $10^{13}$  индивидуальных членов). Селекция аптамеров, как правило, осуществляется в несколько раундов, в течение которых проводится обогащение библиотеки мишеньеспецифическими последовательностями. Развитие технологий скрининга библиотек аптамеров привело к значительному повышению эффективности как селекции за счет методов, обеспечивающих сокращение числа раундов [11], так и дискриминации неспецифически связывающихся аптамерных молекул [12]. Доступность технологий высокопроизводительного секвенирования значительно облегчает поиск и анализ консенсусных районов аптамеров, обуславливающих связывание с мишенью [13]. За время, прошедшее с момента создания SELEX, технология претерпела глубокие изменения и получила целый ряд модификаций. Детальное обсуждение современного состояния SELEX выходит за рамки данной статьи и представлено, в частности, в процитированных выше и многих других обзорных публикациях.

Аптамеры иногда называют «химическими антителами», поскольку так же, как и антитела, аптамеры можно получить к мишеням, обладающим различной структурой и химическим составом. Однако между антителами и аптамерами имеется и ряд существенных отличий. Поскольку аптамеры являются полностью синтетическими молекулами, их производство намного дешевле, чем производство антител. Аптамеры значительно меньше антител по размеру (8–25 против ~155 кДа у антител класса G [14, 15]), что в ряде случаев облегчает проникновение в ткани [16–18]. В отличие от антител, которые производятся биосинтетически, препараты синтетических аптамеров обладают высокой воспроизводимостью характеристик в различных лотах. Синтез аптамеров может сопровождаться введением различных химических модификаций практически без ограничения по положению и химической структуре. В частности, такие модификации повышают устойчивость аптамеров к нуклеазам [19], улучшают фармакокинетические показатели [20], увеличивают аффинность и химическое разнообразие библиотек аптамеров [21]. Аптамеры термостабильны (способны выдерживать нагревание до 80–90°C без потери своих свойств) и могут длительное время храниться при комнатной температуре [22].

Одним из важнейших направлений в разработке аптамеров является создание терапевтических молекул. В связи с распространением лекарственно-устойчивых патогенных бактерий и сложностями, с которыми столкнулись разработчики новых антибиотиков на основе библиотек малых органических молекул [23], ведется постоянный поиск альтернативных платформ, на основе которых могли бы быть созданы эффективные антибактериальные препараты. Существующие прототипы антибактериальных средств на основе аптамеров целесообразно разделить на препараты, самостоятельно инактивирующие бактериальные клетки, и молекулы, блокирующие действие секретлируемых патогенами токсинов и других факторов вирулентности.

Основные направления, в которых ведутся разработки антибактериальных аптамеров, включают:

- 1) воздействие на метаболизм патогена;
- 2) стимуляцию иммунного ответа на клетки конкретного вида бактерий;

- 3) блокировку инвазивной активности микроорганизмов по отношению к клеткам хозяина;

- 4) ингибирование действия токсинов и других факторов вирулентности [24].

### Аптамеры, ингибирующие бактериальные ферменты

В 2011 г. были получены ДНК-аптамеры, связывающие полифосфаткиназу-2 *Mycobacterium tuberculosis*. Отбор осуществлялся методом SELEX при помощи магнитных гранул для выделения и очистки биологических макромолекул (Magnetic-bead) на протяжении 20 циклов. В итоге было отобрано 11 индивидуальных последовательностей, которые были разделены на 2 группы на основании гомологичных мотивов в первичной последовательности нуклеотидов и наличия сходных элементов вторичной структуры. С помощью программы квадруплексного формирования G-богатых последовательностей (Quadruplex forming G-Rich Sequences, QGRS mapper) удалось выяснить, что такого рода аптамеры образуют структуры в виде G-квадруплексов, которые, вероятно, являются полезными при взаимодействии со сложным октамерным комплексом полифосфаткиназы-2. Методом изотермической калориметрии был отобран аптамер, связывающий полинуклеотид с константой диссоциации (Kd)  $870 \pm 220$  нМ. Анализ взаимодействия этого аптамера с полифосфаткиназой-2 из *Laribacter hongkongensis* и *Vibrio cholerae* продемонстрировал наличие определенной (хотя и пониженной по сравнению с *M. tuberculosis*) аффинности и к ферментам этих микроорганизмов. Было показано, что концентрация полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) мишени для данного аптамера составляет  $39,3 \pm 10$  нМ, в то время как остальные отобранные индивидуальные последовательности подавляющего действия почти не проявляют. К тому же он оказывает не столь сильный ингибирующий эффект на полифосфаткиназу-2 *L. hongkongensis* и *V. cholerae*. Полифосфаткиназа-2 является критическим фактором и вирулентности, и стрессовой резистентности бактерий. Эффект при ингибировании полифосфаткиназы-2 может быть плейотропным и заключаться в нарушении подвижности бактерий, формировании дефектов биопленок, понижении устойчивости к физическим стрессам и ингибиторам роста [25]. Таким образом, ингибиторы полифосфаткиназы-2 могут замедлять развитие и распространение инфекции в организме.

Недавно были описаны аптамеры, специфичные к другому ферменту *M. tuberculosis* — синтетазе гликолевой кислоты (Alpha-Hydroxy Acids, AHAs) [26]. Последняя является валидированной мишенью для создания противотуберкулезных препаратов [27]. Две полученные молекулы вначале демонстрировали эффективное подавление активности AHAs ( $IC_{50}$  20–30 нМ), несколько отличаясь механизмом ингибирования фермента, а после оптимизации длины — подавление роста *M. tuberculosis* в культуре (минимальная ингибирующая концентрация 5,36 и 6,24 мкг/мл) при практическом отсутствии токсичности в отношении клеток млекопитающих. Вместе с тем авторы отмечают, что механизм проникновения полученных аптамеров в клетки *M. tuberculosis* остается неизученным [26].

Ингибирование β-лактамаз является одним из важнейших способов повышения эффективности антибиотиков — ингибиторов синтеза клеточной стенки. В частности, были получены ДНК-аптамеры, способные

ингибировать действие металло- $\beta$ -лактамазы патогенной палочки *Bacillus cereus*. В качестве мишени для отбора аптамеров методом SELEX была использована металло- $\beta$ -лактамаза подкласса VcII. В итоге нескольких циклов селекции удалось выделить только 1 аптамер длиной 30 оснований. После программной идентификации его вторичной структуры была синтезирована укороченная версия аптамера длиной 10 оснований. При этом  $IC_{50}$  для исходного и модифицированного аптамеров составила 1,2 нМ, что является весьма высоким показателем. Для анализа специфичности связывания использовались карбоксипептидаза А свиньи и серин- $\beta$ -лактамаза. Оба фермента не ингибировались аптамером, что показывает его высокую специфичность к целевому энзиму. Тесты на *B. cereus* аптамера с  $\beta$ -лактаманым антибиотиком (цефалексин) показали супрессию роста культуры в течение 20 ч при 30°C [28].

Аптамеры могут быть получены не только с использованием отдельных молекул-мишеней, но и на основе связывания с более сложными структурами, включающими живые клетки, в том числе бактериальные (cell-SELEX). Следует отметить, что технологически cell-SELEX является весьма эффективной процедурой, поскольку в роли твердой фазы выступает сама мишень, снижая, таким образом, вероятность селекции неспецифически связывающихся аптамерных молекул [29, 30].

В 2012 г. были получены высокоспецифичные ДНК-аптамеры к *Salmonella enteritidis* и *Salmonella typhimurium* методом селекции библиотек аптамеров с использованием в качестве мишеней живых интактных клеток (cell-SELEX). Константы диссоциации отобранных аптамерных пулов составляли 7 и 25 нМ. Аптамеры показывали высокую специфичность, а именно: они не связывались с термоинактивированными культурами *Salmonella* и неповрежденными культурами *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Citrobacter freundii*. В итоге, в соответствии с показателями наиболее высокой аффинности были выбраны 10 аптамеров для *S. enteritidis* и 9 — для *S. typhimurium*. Антибактериальные эффекты воздействия аптамеров были определены путем сравнения и подсчета количества колоний на чашках Петри в культуре, обработанной аптамерами, и в контроле, что отобразилось в виде существенного ингибирования роста. Механизм подавления роста бактерий не был до конца изучен, однако выяснилось, что бактериостатическое действие вызвано влиянием аптамеров на клеточную стенку бактерий. В экспериментах по окрашиванию Родамином-123 обработанных аптамерами сальмонелл выяснилось, что присутствие аптамеров вызывало сильную деполаризацию клеточной стенки после 30-минутной инкубации. Эффект наблюдался на протяжении 18 ч и сопровождался реверсией [31]. Эффекты взаимодействия аптамеров с поверхностью бактериальных клеток практически не изучены и, возможно, что модуляция физико-химических процессов в бактериальных оболочках является новым перспективным направлением применения аптамеров как для научных целей, так и для создания новых антибактериальных средств.

#### Аптамеры, стимулирующие иммунный ответ к бактериям

Внешняя стенка многих бактерий в процессе эволюции приобрела функцию защиты от воздействия иммунной системы атакуемого организма. Модификация клеточной стенки может изменять ее свойства и об-

легчать распознавание патогена защитными системами организма-хозяина. В 2007 г. впервые были получены ДНК-аптамеры, специфичные к интактным клеткам вирулентного штамма *M. tuberculosis* [32]. После 10 раундов отбора эффективность связывания 20 из отобранных последовательностей была проанализирована методом изотермической калориметрии, а специфичность к *M. tuberculosis* — методом проточной цитометрии. На основании полученных данных был идентифицирован оптимальный вариант аптамера и установлено, что, блокируя некоторые мембранные белки на поверхности бактерии, аптамер может активировать продукцию CD4+ Т клетками организма-хозяина интерферона  $\gamma$  — важнейшего компонента иммунного ответа против возбудителя туберкулеза. При испытаниях аптамера на мышинной модели инфекции было показано, что средняя продолжительность жизни животных при введении им патогена в среднем увеличивалась на 3 дня по сравнению с контрольной группой. Кроме того, было отмечено уменьшение отека легких у животных, которым в процессе инфекции вводили аптамер [33].

В качестве продолжения предыдущего исследования были получены ДНК-аптамеры к маннозокапсулированному липоарабиноманнану *M. tuberculosis* (ManLAM). За 12 раундов селекции было отобрано 13 различных молекул аптамеров. Иммуноферментным методом, аналогичным ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), но использующим одноцепочечные олигонуклеотиды вместо антител (Enzyme-linked oligonucleotide assay, ELONA), был идентифицирован аптамер с наибольшей константой диссоциации ( $436,3 \pm 37,84$  нМ) и проанализирована кросс-реактивность отобранных к *M. tuberculosis* аптамеров к различным бактериям. Исследуемый аптамер оказался не только высокоспецифичным к избранной мишени, но и показал значительный ингибирующий эффект в отношении ManLAM-индуцированной иммуносупрессии CD11c+ дендритных клеток, а также активацию CD4+ Th1 лимфоцитов. Экспериментальная терапия полученным аптамером зараженных *M. tuberculosis* мышей оказалась весьма эффективной: в тканях легких и селезенки спустя 30 дней после введения аптамера присутствовало незначительное количество клеток патогена, причем существенных патологических изменений обнаружено не было. Аналогичный 16-недельный эксперимент с макаками-резусами показал меньшую эффективность терапии: были диагностированы хроническое воспаление легких и интерстициальная пневмония, однако формирования гранулем не было обнаружено. В итоге, только 2 из 3 макаков, составляющих экспериментальную группу, были излечены [34]. Тем не менее результаты показывают, что данный аптамер обладает значительным потенциалом и может рассматриваться как основа для новых противотуберкулезных вакцин.

Интересная модель непрямого стимулирования иммунного ответа на основе модифицированного аптамера была разработана для повышения эффективности элиминации стрептококков за счет предсуществующего иммунного ответа. В организме человека в высоком титре присутствуют антитела к галактозо- $\alpha$ -1,3-галактозил- $\beta$ -1,4-N-ацетилглюкозамину ( $\alpha$ -Gal) [35]. Этот олигосахарид был конъюгирован с аптамером, отобранным на связывание с М-белком на поверхности стрептококков. Таким образом, конъюгат с аптамером являлся молекулярной «приманкой» для повышения эффективности опсонизации патогена и его последующей элиминации различными компонентами иммунной системы. В экспериментах *in vitro* были продемонстрированы эффективный фагоцитоз

опсонизированных бактерий и бактерицидная активность нейтрофилов [36]. Учитывая интерес к технологиям повышения эффективности презентации антигенов [37], описанная стратегия может получить распространение при создании профилактических и терапевтических антибактериальных вакцин.

Перспективным направлением является использование аптамеров для создания искусственных опсонингов — молекул или молекулярных комплексов, способных усиливать продуктивный фагоцитоз клеток-патогенов антигенпрезентирующими клетками или провоцировать фиксацию комплемента с последующим лизисом бактериальных частиц. Впервые успешная опсонизация с использованием конъюгатов аптамер-константной части молекулы иммуноглобулина (Fc) была проведена в модельных экспериментах с магнитными частицами, покрытыми поли- $\gamma$ -D-глутаминовой кислотой — основным компонентом клеточной стенки *Bacillus anthracis*, предотвращающим продуктивный фагоцитоз патогена. Было показано, что опсонизированные Fc-аптамерным конъюгатом частицы поглощаются значительно более эффективно по сравнению с неопсонизированными.

В дальнейшем удалось получить ДНК-аптамер к липополисахариду *E. coli* O111:B4. Для анализа связывания аптамеров также использовался метод, аналогичный ELISA, с применением стрептавидин-пероксидазных конъюгатов, который показал, что отобранные аптамеры имеют высокое сродство к мишени. Полученные липополисахаридсвязывающие аптамеры были затем конъюгированы с белковым комплексом C1qrs, который включал 3 связанных белка системы комплемента — C1q, C1g и C1s соответственно. Конъюгат комплемент-аптамер связывался с клетками *E. coli* и реализовывал антителозависимую активацию комплемента, которая и обуславливала лизис клеток-мишеней [38].

### Аптамеры, блокирующие инвазивную активность патогенов

Хотя некоторые бактерии, такие как *B. anthracis*, используют относительно пассивные механизмы проникновения в макрофаги [39] (сопровождающиеся тем не менее последующей блокировкой иммунного ответа под действием комплекса токсинов [40]), целый ряд патогенов использует активные стратегии проникновения внутрь клеток хозяина, которые осуществляются при участии специализированных белковых комплексов — адгезинов, инвазинов, а также систем, индуцируемых на последующих стадиях инвазии и угнетающих защитные системы клеток — объекты инвазии [41, 42]. Системы инвазии бактериальных патогенов были выбраны в качестве мишеней для аптамеров несколькими группами исследователей.

В 2005 г. были получены РНК-аптамеры, связывающиеся с IVB-пилями *S. typhimurium*. В качестве мишени для селекции использовали предшественник белка PilS (pre-PilS). Константа связывания с пилями для наиболее эффективного из полученных аптамеров составляла 8,56 нМ. Способность аптамера ингибировать инвазию сальмонелл в макрофагоподобные клетки линии ТНР-1 (клетки миелолейкоза человека) была проанализирована с использованием амплификации в реальном времени ДНК сальмонелл, выделенной из культуры ТНР-1 после инкубации в присутствии аптамера и удаления внеклеточных бактерий. Была показана дозозависимость ин-

гибирования инвазии от концентрации конкурентного аптамера, при этом удавалось достичь практически полной блокировки заражения. Полученный продукт имеет не только значительный потенциал в борьбе против сальмонеллезной инвазии, но и может быть использован как аналитический инструмент в исследовании взаимодействия бактериальных пили типа IVB с клетками хозяина [43].

Интересным примером аптамеров, связывающихся с функциональными поверхностными структурами сальмонелл, являются молекулы, ингибирующие образование биопленок. Биопленки значительно повышают устойчивость бактерий к неблагоприятным условиям среды, в том числе и антибиотикорезистентность [44]. Прикрепление сальмонелл и других бактерий к поверхностям, обуславливающее формирование биопленки, требует синтеза флагелл (жгутиков), поэтому блокировка их взаимодействия с внешними субстратами может предотвращать формирование биопленок. В описываемом исследовании был получен аптамер к флагелину *S. choleraesuis* с константой связывания  $41 \pm 2$  нМ, при этом изначально селекция на предмет ингибирования формирования биопленок велась с использованием целых клеток (cell-SELEX), а впоследствии мишень была идентифицирована методами масс-спектрометрии. Полученный «аптамер 3» ингибировал формирование биопленки и усиливал действие антибиотиков [45].

Селекция аптамеров с использованием в качестве мишеней целых бактерий является одним из наиболее распространенных методов создания средств блокировки инвазии патогенов в клетки хозяина. В 2012 г. этим методом было получено семейство ДНК-аптамеров к клеткам *M. tuberculosis* с целью исследования блокировки клеточной инвазии возбудителя туберкулеза [33]. Отобранный из популяции 30 молекул на основании данных проточной цитометрии аптамер обладал аффинностью к *M. tuberculosis* в наномолярном диапазоне, предотвращал проникновение патогена в макрофаги и был способен стимулировать в присутствии возбудителя синтез цитокинов (интерферона  $\gamma$ , интерлейкинов 15 и 17), усиливая таким образом иммунный ответ к патогену [46].

Одним из важных преимуществ аптамеров по сравнению с антителами является возможность их отбора к широкому спектру низкомолекулярных мишеней. Спектр подобных мишеней для антител весьма ограничен: помимо необходимой иммуногенности малой молекулы-мишени для индукции значимого иммунного ответа данную мишень необходимо гаптенезировать (шадящее разрушение), иначе говоря, — представить иммунной системе в виде ковалентного конъюгата с большой (как правило, белковой) молекулой. Более того, даже в случае гаптенезации не гарантировано распознавание малой органической молекулы иммунокомпетентными клетками, ведущее к индукции антительного ответа. Таким образом, спектр низкомолекулярных мишеней, к которым можно получить антитела, весьма ограничен. Напротив, нет никаких ограничений на создание аптамеров, связывающих всевозможные малые молекулы, вплоть до аденозинтрифосфата [47, 48].

N-ацилгомосеринлактон (N-acylhomoserine lactone, HSL) является ключевым компонентом регуляции чувствительности бактерий к их концентрации в окружающей среде (Quorum sensing). Нарушение этой чувствительности приводит к некорректным реакциям патогенов на неблагоприятные условия среды (например, к нарушениям в синтезе биопленок), и может использоваться

для сенсibilизации бактерий к антибиотикам, а также в других терапевтических стратегиях [49]. Поскольку HSL секретируется в окружающую среду, он является удобной мишенью для аптамеров. В 2013 г. были получены ДНК-аптамеры к структурному аналогу HSL — аминолактамному суррогату (ALS), пригодному для ориентированной иммобилизации на магнитных микросферах. Полученные аптамеры проявляли высокую аффинность к ALS (10–20 нМ), а в отношении природных лактонов (гомосерин- и бутирилзамещенных) — разбились на три группы. Одна из групп аптамеров, аффинных к ALS, не продемонстрировала существенного сродства к природным лактонам, вторая связывала только бутирилзамещенный лактон, а третья — только HSL. Не удалось идентифицировать аптамер, способный эффективно связывать обе модификации лактона, поэтому были отобраны молекулы, связывающие бутирильный и гомосериновый варианты лактона с максимальной аффинностью. Очевидного влияния на рост культуры *P. aeruginosa in vitro* данные аптамеры не оказывали, однако существенно снижали синтез пиоцианина, LasA- и LasB-протеаз, а также подавляли формирование биопленок [50].

### Аптамеры, ингибирующие действие бактериальных токсинов

Впервые аптамеры, ингибирующие действие нейротоксина *Clostridium botulinum*, были выделены в 2007 г. Авторы предположили возможность селекции аптамеров ко всем трем функциональным доменам ботулинического нейротоксина типа А (BoNT/A) для получения как профилактических, так и терапевтических препаратов [51].

Впоследствии были получены аптамеры, связывающие полноразмерный токсин BoNT/A (токсин, инактивированный альдегидом) и короткий фрагмент тяжелой цепи BoNT/A (НС-пептид, содержащий 19 аминокислот (аминокислоты 1177–1195). Аптамеры к НС-пептиду BoNT/A должны были тормозить связывание токсина с поверхностью клеток-мишеней. Константы диссоциации отобранных аптамеров измеряли методом флуоресцентной анизотропии. У аптамеров, специфичных к токсину, константа равновесия варьировала в пределах от 3 до 51 нМ, а у молекул, связывающих НС-пептид, — от 1 до 4 мкМ. Дальнейшие исследования показали, что НС-пептидные ДНК-аптамеры полностью ингибировали связывание нейтрализующего моноклонального антитела с полноразмерным токсином. Был сделан вывод о возможности разработки на основе НС-пептидного аптамера препарата, способного воспрепятствовать связыванию BoNT/A с рецептором-мишенью на поверхности синаптических везикул [52].

Аптамеры, специфичные к легкой цепи (LC) BoNT/A и ингибирующие протеолитическую активность, были получены методом автоматизированного SELEX. Константа диссоциации для трех наиболее эффективно связывавшихся с мишенью РНК аптамеров составляла 87 нМ. При дальнейшем исследовании было показано, что два из полученных аптамеров являются неконкурентными, а один — конкурентным ингибитором LC BoNT/A. Для обеспечения устойчивости к нуклеазам аптамеры были стабилизированы 2'-Ф-пирамидоном [53]. Полученные РНК-аптамеры представляют собой перспективные прототипы для разработки как терапевтических, так и диагностических препаратов против ботулизма. Интересно, что неконкурентные ингибиторы

металлопротеаз могут являться наиболее ценными с точки зрения возможного терапевтического применения, поскольку они с меньшей вероятностью могут ингибировать активность различных металлоферментов организмов-хозяина [54].

Исследований, посвященных детекции бактериальных токсинов на основе аптамеров, пока значительно больше, чем работ по селекции потенциальных терапевтических молекул [55, 56]. Ряд методик, разработанных для целей диагностики, оказывается весьма перспективным для последующего отбора терапевтических молекул. Например, для диагностики ботулотоксинов различных серотипов с применением аптамеров была разработана методика на основе флуоресцентного резонансного переноса энергии (Fluorescence resonance energy transfer, FRET). Анализ специфичности связывания аптамеров с ботулотоксинами различных серотипов проводили, используя возможность синтеза аптамеров с заранее встроенными красителями и гасителями флуоресценции. Изменение конформации аптамера при связывании может сопровождаться изменением расстояния между флуорофором и гасителем, что ведет к изменению интенсивности флуоресценции [57]. Удобство данной методики заключается в том, что она позволяет изучать связывание аптамера с мишенью в растворе, исключая искажающие результаты измерений твердофазными методами и значительно упрощая процедуру анализа. Создание таких методик возможно благодаря значительной гибкости «химического пространства» синтеза олигонуклеотидов.

Одними из первых аптамеров к стафилококковому энтеротоксину были ДНК-шпигельмеры (от нем. Spiegel — зеркало, греч. Megos — часть, доля; энтантимеры исходных аптамеров) против энтеротоксина В *S. aureus* (*Staphylococcus enterotoxins* В, SEB), отобранные зеркальным методом SELEX (Mirror-image) [58]. Характеристики связывания с SEB были проанализированы с использованием поверхностного плазмонного резонанса (Plasmon resonance). Константа равновесия шпигельмера с оптимальными характеристиками составляет ~420 нМ. При этом он проявляет высокую специфичность при связывании с SEB даже при избытке концентрации других белков (обнаружено на примере казеина). Идентифицированный шпигельмер может быть положен как в основу диагностических систем, так и для разработки терапевтических препаратов [59].

В 2014 г. методом классической SELEX были получены ДНК-аптамеры против стафилококкового  $\alpha$ -токсина. В результате 10 раундов селекции удалось выделить 49 уникальных последовательностей. Все они были проверены на возможность нейтрализации цитотоксичности  $\alpha$ -токсина: для эксперимента была взята доза токсина, вызывающая 50% клеточную смерть в течение 6 ч (LD<sub>50</sub>). Четыре из 49 аптамеров повышали жизнеспособность клеток до ~85–90%, что характеризует их как продукт со значительным терапевтическим потенциалом при заболеваниях, вызванных *S. aureus* [60].

Работы по получению аптамеров к токсину SEB ведутся весьма активно. В частности, в одной из последних работ были проведены не только эксперименты *in vitro* с использованием моноцитарных клеточных линий, но и проанализировано действие ПЭГ-модифицированного аптамера *in vivo* на классической мышинной модели токсического шока, индуцированного SEB. В этих экспериментах было достигнуто значительное снижение смертности экспериментальных животных при введении полиэтилен-ликированного аптамера [61].

## Аптамеры и рибосвитчи

По сути, многие из рибосвитчей (Riboswitch) являются природными РНК-аптамерами, связывающимися с низкомолекулярными лигандами и осуществляющими сигнальную трансдукцию [62, 63]. Существование большого числа как видов рибосвитчей, так и связывающих их лигандов является своеобразным аргументом в пользу развития аптамерных платформ, существующих *in vivo*. Рибосвитчи являются нетранслируемыми последовательностями матричной РНК, с которыми низкомолекулярный метаболит или иная малая молекула способны связываться без посредничества белков, вызывая изменения во вторичной структуре РНК [64]. Изменения структуры РНК затем транслируются в изменение экспрессии генов. Рибосвитч обычно располагается на 5'-конце цепи матричной РНК и представляет собой структуру из двух доменов — аптамерного и регуляторного. Аптамерный домен отвечает за связывание с сигнальной молекулой, регуляторный — за модуляцию экспрессии гена. Механизмы влияния на экспрессию разнообразны: воздействие может осуществляться и на транскрипционном, и на посттранскрипционном уровне. Регуляторные домены рибосвитчей весьма вариабельны и отличаются даже у близкородственных видов, в то время как аптамерный домен зачастую весьма консервативен [65]. Учитывая аптамерподобную структуру рибосвитчей, логично было бы ожидать работ по созданию искусственных рибосвитчей и модификации уже существующих на основе технологий SELEX [66]. Однако на данный момент эти работы лишь опосредованно связаны с созданием антибактериальных агентов на основе селекции рибосвитчей, например через создание систем для тестирования антибиотиков [67] или в интересах синтетико-биологического подхода к созданию регулируемых моделей для инфекционных заболеваний [68].

### Проблемы селекции и применения аптамеров для создания антибактериальных и антитоксинных препаратов

Несмотря на интенсивные исследования в области антибактериальных аптамеров, подтверждаемые примерами из настоящего обзора, следует отметить, что в данной области имеются задачи, решить которые еще предстоит. В значительной степени эти проблемы вызваны теми же особенностями строения бактерий, которые привели в свое время к неудачам в создании новых антибиотиков методами медицинской химии и высокопроизводительного скрининга библиотек малых молекул [69]. Клеточная стенка бактерий непроницаема для немодифицированных молекул ДНК или РНК. В силу этого выбор мишеней для большинства антибактериальных аптамеров в значительной степени ограничивался секретуруемыми молекулами (в первую очередь, токсинами и другими факторами вирулентности) или мишенями, находящимися на внешней мембране микроорганизмов.

Разработка принципиально новых подходов к созданию антибиотиков позволяет говорить о начале преодоления кризиса в этом направлении исследований [35, 70]. Таким же образом новые технологии, разрабатываемые в области селекции и дизайна аптамеров, помогут созданию высокоэффективных антибактериальных препаратов на основе этих молекул.

Например, использование аптамеров в качестве промежуточного звена для опсонизации бактерий предсус-

ществующими в организме антителами [71] может рассматриваться в качестве одного из способов достижения терапевтического эффекта без необходимости преодоления барьера в форме клеточной стенки микроорганизма. В рамках той же парадигмы аптамеры были использованы в качестве средства направленной доставки наноконтейнеров, содержащих антибиотик [72]. Доставка с использованием наноконтейнеров, высвобождающих действующее вещество только при условии связывания аптамеров с мишенью, повышает специфичность действия антибиотика в отношении целевого патогена и уменьшает значение минимальной ингибирующей концентрации, снижая вероятность формирования антибиотикорезистентности как у целевого патогена, так и за счет уменьшения неспецифического эволюционного давления на непатогенную микрофлору. Физические методы, использующие аптамеры в качестве мишеньонаправленного носителя, в частности фотоинактивация [73], могут быть развиты на основе имеющихся подходов к фотодинамической терапии [74] и использованы в борьбы с патогенами, обладающими неспецифической резистентностью, например за счет формирования биопленок [75].

Можно предположить, что принципиальная способность аптамеров как фрагментов ДНК или РНК воспроизводиться в аппарате репликации или транскрипции клетки [76] приведет к разработке аптамеров, включенных в состав плазмидного или фагового генома и способных к высокоэффективному размножению внутри бактерии после ее инфекции фаговой частицей [77] или иным вектором, несущим репликационно- и транскрипционно-компетентный аптамер [78].

В качестве альтернативного пути доставки молекул в бактериальные клетки можно рассматривать биспецифические аптамеры, способные не только распознавать внутриклеточные мишени, но и связываться с транспортерами, переносящими биомолекулы во внутриклеточное пространство бактерий по аналогии с механизмом проникновения в клетки бактериоцинов [79]. Одной из приоритетных мишеней для аптамеров, действующих по вышеописанному сценарию, могут быть рибосвитчи [80]. С другой стороны, поскольку искусственные рибосвитчи, основанные на аптамерах, активно используются в экспериментах по модуляции метаболизма и сложных регуляторных процессов в бактериях [81], можно предполагать, что сфера использования «эндогенных» аптамеров в интересах борьбы с бактериальными инфекциями может быть расширена и в область создания вакцинных штаммов, для которых требуется исключительно тонкая настройка степени вирулентности [82].

Одной из проблем использования аптамеров в качестве терапевтических молекул долгое время являлась их относительно низкая аффинность к мишеням. Для аптамеров, блокирующих действие токсинов, константа связывания с мишенью имеет принципиальное значение. Поскольку у токсина, как правило, аффинность к клеточным рецепторам весьма высока, а связывание сопровождается значительными конформационными перестройками [83], относительно низкоаффинные аптамеры в таких условиях будут вытесняться из комплекса с мишенью и окажутся неспособными выполнять блокирующую функцию.

Принципиальная возможность создания высокоаффинных аптамеров (с константами связывания в субнанолярном диапазоне) была продемонстрирована на примере аптамера к тромбину и ряда других [84]. Однако число высокоаффинных аптамеров, полученных классическим путем селекции на основе немодифицированных

ДНК и РНК, относительно невелико. Не исключено, что получение немодифицированных высокоаффинных аптамеров к некоторым типам мишеней столкнется с трудно разрешимыми физико-химическими проблемами [85].

Создание модификаций нуклеозидов, содержащих гидрофобные ароматические группы, а также мутантной ДНК-полимеразы, способной эффективно включать в цепочку ДНК модифицированные нуклеотиды [20], позволило не только повысить аффинность отобранных аптамеров к мишеням, но и значительно расширить круг мишеней, к которым возможно получение одноцепочечных олигонуклеотидов [86]. Новые молекулы получили название SOMAmers (Slow Off-rate Modified Aptamers), что подчеркивает один из важных механизмов селекции — отбор молекул, медленно (в течение десятков минут и часов) диссоциирующих из комплекса с мишенью. Успех в получении высокоаффинных лигандов на основе сомамеров к клинически значимым белковым молекулам, например к интерлейкину 6 [87], обуславливает дальнейшее развитие этой технологии, в частности создание новых ферментов, способных полимеризовать различные модификации нуклеотидов.

### Заключение

Разработка технологий получения высокоаффинных аптамеров далека от завершения, и необходимы усилия как в области модификации структуры самих аптамеров,

так и модернизации подходов к их селекции из библиотек [11, 88]. Решение указанных проблем значительно продвинет разработку антибактериальных препаратов на основе аптамеров.

### Источник финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00630).

### Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

### Участие авторов

Н.А. Зенинская — сбор материалов, подготовка текста, редактирование; А.В. Колесников — анализ полученных данных, разработка концепции обзорной статьи, подготовка текста; А.К. Рябко — сбор материалов, подготовка текста; И.Г. Шемякин — разработка концепции обзорной статьи; И.А. Дятлов — анализ полученных данных, дизайн исследования; А.В. Козырь — координация подготовки материалов, анализ информационных источников, дизайн исследования.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Klussmann S, editor. *The aptamer handbook: functional oligonucleotides and their applications*. Weinheim: Wiley-VCH; 2006. doi: 10.1002/3527608192.
2. Tan W, Fang X, editors. *Aptamers selected by cell-SELEX for theranostics*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2015. 352 p. doi: 10.1007/978-3-662-46226-3.
3. Ptashne M, Hopkins N. The operators controlled by the lambda phage repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968;60(4):1282–1287. doi: 10.1073/pnas.60.4.1282.
4. Westhof E. Isostericity and tautomerism of base pairs in nucleic acids. *FEBS Lett*. 2014;588(15):2464–2469. doi: 10.1016/j.febslet.2014.06.031.
5. Cech TR. Ribozymes, the first 20 years. *Biochem Soc Trans*. 2002;30(6):1162–1166. doi: 10.1042/bst0301162.
6. Silverman SK. Catalytic DNA: scope, applications, and biochemistry of deoxyribozyme. *Trends Biochem Sci*. 2016;41(7):595–609. doi: 10.1016/j.tibs.2016.04.010.
7. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990;346(6287):818–822. doi: 10.1038/346818a0.
8. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 1990;249(4968):505–510. doi: 10.1126/science.2200121.
9. FDA orders new phase III trial for anticancer drug; SuperGen withdraws orathecin NDA; FDA okays keratinocyte growth factor for prevention of mucositis during chemotherapy; AstraZeneca withdraws application for European approval of Iressa; FDA approves anti-angiogenesis agent for “wet” age-related macular degeneration; Access pharmaceuticals gets clearance for clinical trials of AP5346; FDA establishes nanotechnology site; Microarray chip for genetic analysis receives FDA clearance. *Biotechnol Law Rep*. 2005;24(2):177–179. doi: 10.1089/blr.2005.24.177.
10. Weinberg MS. Therapeutic Aptamers March On. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014;3(9):e194. doi: 10.1038/mtna.2014.46
11. Blind M, Blank M. Aptamer selection technology and recent advances. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015;4(1):e223. doi: 10.1038/mtna.2014.74.
12. Ozer A, Pagano JM, Lis JT. New technologies provide quantum changes in the scale, speed, and success of SELEX methods and aptamer characterization. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014;3(8):e183. doi: 10.1038/mtna.2014.34.
13. Schutze T, Wilhelm B, Greiner N, et al. Probing the SELEX process with next-generation sequencing. *PLoS One*. 2011;6(12):e29604. doi: 10.1371/journal.pone.0029604.
14. Hicke BJ, Stephens AW. Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy. *J Clin Invest*. 2000;106(8):923–928. doi: 10.1172/JCI11324.
15. Sun H, Zu Y. Aptamers and their applications in nanomedicine. *Small*. 2015;11(20):2352–2364. doi: 10.1002/smll.201403073.
16. Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(7):537–550. doi: 10.1038/nrd3141.
17. Nimjee SM, Rusconi CP, Sullenger BA. Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu Rev Med*. 2005;56(1):555–583. doi: 10.1146/annurev.med.56.062904.144915.
18. Thiel KW, Giangrande PH. Therapeutic applications of DNA and RNA aptamers. *Oligonucleotides*. 2009;19(3):209–222. doi: 10.1089/oli.2009.0199.
19. Maier KE, Levy M. From selection hits to clinical leads: progress in aptamer discovery. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016;5:16014. doi: 10.1038/mtm.2016.14.
20. Bruno JG. A review of therapeutic aptamer conjugates with emphasis on new approaches. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013;6(3):340–357. doi: 10.3390/ph6030340.
21. Rohloff JC, Gelinas AD, Jarvis TC, et al. Nucleic acid ligands with protein-like side chains: modified aptamers and their use as diagnostic and therapeutic agents. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014;3(10):e201. doi: 10.1038/mtna.2014.49.
22. Thiel K. Oligo oligarchy—the surprisingly small world of aptamers. *Nat Biotechnol*. 2004;22(6):649–651. doi: 10.1038/nbt0604-649.
23. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(5):371–387. doi: 10.1038/nrd3975.
24. Ozalp VC, Bilecen K, Kavruk M, Oktm HA. Antimicrobial aptamers for detection and inhibition of microbial pathogen growth. *Future Microbiol*. 2013;8(3):387–401. doi: 10.2217/fmb.12.149.

25. Shum KT, Lui EL, Wong SC, et al. Aptamer-mediated inhibition of Mycobacterium tuberculosis polyphosphate kinase 2. *Biochemistry*. 2011;50(15):3261–3271. doi: 10.1021/bi2001455.
26. Baig IA, Moon JY, Lee SC, et al. Development of ssDNA aptamers as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis acetohydroxyacid synthase. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1854(10 Pt A):1338–1350. doi: 10.1016/j.bbapap.2015.05.003.
27. Gokhale K, Tilak B. Mechanisms of bacterial acetohydroxyacid synthase (AHAS) and specific inhibitors of Mycobacterium tuberculosis AHAS as potential drug candidates against tuberculosis. *Curr Drug Targets*. 2015;16(7):689–699. doi: 10.2174/1389450116666150416115547.
28. Schlesinger SR, Lahousse MJ, Foster TO, Kim SK. Metallo- $\beta$ -lactamases and aptamer-based inhibition. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2011;4(2):419–428. doi: 10.3390/ph4020419.
29. Teng J, Yuan F, Ye Y, et al. Aptamer-based technologies in foodborne pathogen detection. *Front Microbiol*. 2016;7:1426. doi: 10.3389/fmicb.2016.01426.
30. Hamula CL, Peng H, Wang Z, et al. The effects of SELEX conditions on the resultant aptamer pools in the selection of aptamers binding to bacterial cells. *J Mol Evol*. 2015;81(5–6):194–209. doi: 10.1007/s00239-015-9711-y.
31. Kolovskaya OS, Savitskaya AG, Zamay TN, et al. Development of bacteriostatic DNA aptamers for salmonella. *J Med Chem*. 2013;56(4):1564–1572. doi: 10.1021/jm301856j.
32. Ohuchi S. Cell-SELEX Technology. *Biores Open Access*. 2012;1(6):265–272. doi: 10.1089/biores.2012.0253.
33. Chen F, Zhou J, Luo F, et al. Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent Mycobacterium tuberculosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;357(3):743–748. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.007.
34. Pan Q, Wang Q, Sun X, et al. Aptamer against mannose-capped lipoarabinomannan inhibits virulent Mycobacterium tuberculosis infection in mice and rhesus monkeys. *Mol Ther*. 2014;22(5):940–951. doi: 10.1038/mt.2014.31.
35. Galili U. Anti-Gal: an abundant human natural antibody of multiple pathogenesis and clinical benefits. *Immunology*. 2013;140(1):1–11. doi: 10.1111/imm.12110.
36. Kristian SA, Hwang JH, Hall B, et al. Retargeting pre-existing human antibodies to a bacterial pathogen with an alpha-Gal conjugated aptamer. *J Mol Med (Berl)*. 2015;93(6):619–631. doi: 10.1007/s00109-015-1280-4.
37. Abdel-Motal UM, Guay HM, Wigglesworth K, et al. Immunogenicity of influenza virus vaccine is increased by anti-gal-mediated targeting to antigen-presenting cells. *J Virol*. 2007;81(17):9131–9141. doi: 10.1128/JVI.00647-07.
38. Bruno JG, Carrillo MP, Phillips T. In vitro antibacterial effects of antilipopolsaccharide DNA aptamer-C1qrs complexes. *Folia Microbiol (Praha)*. 2008;53(4):295–302. doi: 10.1007/s12223-008-0046-6.
39. Dixon TC, Fadl AA, Koehler TM, et al. Early Bacillus anthracis-macrophage interactions: intracellular survival and escape. *Cell Microbiol*. 2000;2(6):453–463. doi: 10.1046/j.1462-5822.2000.00067.x.
40. Ali SR, Timmer AM, Bilgrami S, et al. Anthrax toxin induces macrophage death by p38 MAPK inhibition but leads to inflammatory activation via ATP leakage. *Immunity*. 2011;35(1):34–44. doi: 10.1016/j.immuni.2011.04.015.
41. Ribet D, Cossart P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect*. 2015;17(3):173–183. doi: 10.1016/j.micinf.2015.01.004.
42. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Hook M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(1):49–62. doi: 10.1038/nrmicro3161.
43. Pan Q, Zhang XL, Wu HY, et al. Aptamers that preferentially bind type IVB pili and inhibit human monocytic-cell invasion by *Salmonella enterica* serovar typhi. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(10):4052–4060. doi: 10.1128/aac.49.10.4052-4060.2005.
44. Balcazar JL, Subirats J, Borrego CM. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front Microbiol*. 2015;6:1216. doi: 10.3389/fmicb.2015.01216.
45. Ning Y, Cheng L, Ling M, et al. Efficient suppression of biofilm formation by a nucleic acid aptamer. *Pathog Dis*. 2015;73(6):ftv034. doi: 10.1093/femspd/ftv034.
46. Chen F, Zhang X, Zhou J, et al. Aptamer inhibits Mycobacterium tuberculosis (H37Rv) invasion of macrophage. *Mol Biol Rep*. 2012;39(3):2157–2162. doi: 10.1007/s11033-011-0963-3.
47. Feng C, Dai S, Wang L. Optical aptasensors for quantitative detection of small biomolecules: a review. *Biosens Bioelectron*. 2014;59:64–74. doi: 10.1016/j.bios.2014.03.014.
48. Hurwitz M, Eliot RS. Arrhythmias in acute myocardial infarction. *Dis Chest*. 1964;45(6):616–626. doi: 10.1378/chest.45.6.616.
49. Bhardwaj AK, Vinothkumar K, Rajpara N. Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2013;8(1):68–83. doi: 10.2174/1574891x11308010012.
50. Zhao ZG, Yu YM, Xu BY, et al. Screening and anti-virulent study of N-acyl homoserine lactones DNA aptamers against *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2013;18(2):406–412. doi: 10.1007/s12257-012-0556-6.
51. Cai S, Singh BR. Strategies to design inhibitors of Clostridium botulinum neurotoxins. *Infect Disord Drug Targets*. 2007;7(1):47–57. doi: 10.2174/187152607780090667.
52. Tok JB, Fischer NO. Single microbead SELEX for efficient ssDNA aptamer generation against botulinum neurotoxin. *Chem Commun (Camb)*. 2008;(16):1883–1885. doi: 10.1039/b717936g.
53. Chang TW, Blank M, Janardhanan P, et al. In vitro selection of RNA aptamers that inhibit the activity of type A botulinum neurotoxin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396(4):854–860. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.05.006.
54. Jacobsen JA, Jourden JLM, Mille MT, Cohen SM. To bind zinc or not to bind zinc: an examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803(1):72–94. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.08.006.
55. Kolesnikov AV, Kozyr' AV, Shemyakin IG. The prospects for using aptamers in diagnosing bacterial infections. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virol*. 2012;27(2):49–55. doi: 10.3103/s0891416812020048.
56. Hong KL, Sooter LJ. Single-stranded DNA aptamers against pathogens and toxins: identification and biosensing applications. *Biomed Res Int*. 2015;2015:419318. doi: 10.1155/2015/419318.
57. Bruno JG, Richarte AM, Carrillo MP, Edge A. An aptamer beacon responsive to botulinum toxins. *Biosens Bioelectron*. 2012;31(1):240–243. doi: 10.1016/j.bios.2011.10.024.
58. Klussmann S, Nolte A, Bald R, et al. Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat Biotechnol*. 1996;14(9):1112–1115. doi: 10.1038/nbt0996-1112.
59. Purschke WG, Radtke F, Kleinjung F, Klussmann S. A DNA Spiegelmer to staphylococcal enterotoxin B. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(12):3027–3032. doi: 10.1093/nar/gkg413.
60. Vivekananda J, Salgado C, Millenbaugh NJ. DNA aptamers as a novel approach to neutralize Staphylococcus aureus alpha-toxin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;444(3):433–438. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.076.
61. Wang K, Gan L, Jiang L, et al. Neutralization of staphylococcal enterotoxin B by an aptamer antagonist. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(4):2072–2077. doi: 10.1128/AAC.04414-14.
62. Berens C, Groher F, Suess B. RNA aptamers as genetic control devices: the potential of riboswitches as synthetic elements for regulating gene expression. *Biotechnol J*. 2015;10(2):246–257. doi: 10.1002/biot.201300498.
63. Winkler W, Nahvi A, Breaker RR. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*. 2002;419(6910):952–956. doi: 10.1038/nature01145.
64. Cressina E, Chen L, Moulin M, et al. Identification of novel ligands for thiamine pyrophosphate (TPP) riboswitches. *Biochem Soc Trans*. 2011;39(2):652–657. doi: 10.1042/BST0390652.
65. Mandal M, Breaker RR. Gene regulation by riboswitches. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(6):451–463. doi: 10.1038/nrm1403.
66. Wittmann A, Suess B. Engineered riboswitches: Expanding researchers' toolbox with synthetic RNA regulators. *FEBS Lett*. 2012;586(15):2076–2083. doi: 10.1016/j.febslet.2012.02.038.

67. Topp S, Gallivan JP. Emerging applications of riboswitches in chemical biology. *ACS Chem Biol*. 2010;5(1):139–148. doi: 10.1021/cb900278x.
68. Trausch JJ, Batey RT. Design of modular “plug-and-play” expression platforms derived from natural riboswitches for engineering novel genetically encodable RNA regulatory devices. *Methods Enzymol*. 2015;550:41–71. doi: 10.1016/bs.mie.2014.10.031.
69. Hughes D, Karlen A. Discovery and preclinical development of new antibiotics. *Ups J Med Sci*. 2014;119(2):162–169. doi: 10.3109/03009734.2014.896437.
70. Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*. 2015;517(7535):455–459. doi: 10.1038/nature14098.
71. Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis. *Science*. 2005;307(5707):223–227. doi: 10.1126/science.1106753.
72. Kavruk M, Celikbicak O, Ozalp VC, et al. Antibiotic loaded nanocapsules functionalized with aptamer gates for targeted destruction of pathogens. *Chem Commun (Camb)*. 2015;51(40):8492–8495. doi: 10.1039/c5cc01869b.
73. Song MY, Jurm J, Park YK, Kim BC. An aptamer cocktail-functionalized photocatalyst with enhanced antibacterial efficiency towards target bacteria. *J Hazard Mater*. 2016;318:247–254. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.07.016.
74. Ornellas PO, Antunes LD, Fontes KB, et al. Effect of the antimicrobial photodynamic therapy on microorganism reduction in deep caries lesions: a systematic review and meta-analysis. *J Biomed Opt*. 2016;21(9):90901. doi: 10.1117/1.jbo.21.9.090901.
75. Zoccolillo ML, Rogers SC, Mang TS. Antimicrobial photodynamic therapy of *S. mutans* biofilms attached to relevant dental materials. *Lasers Surg Med*. Forthcoming 2016. doi: 10.1002/lsm.22534.
76. Meitert J, Aram R, Wiesemann K, et al. Monitoring the expression level of coding and non-coding RNAs using a TetR inducing aptamer tag. *Bioorg Med Chem*. 2013;21(20):6233–6238. doi: 10.1016/j.bmc.2013.07.035.
77. Chaloin L, Lehmann MJ, Sczakiel G, Restle T. Endogenous expression of a high-affinity pseudoknot RNA aptamer suppresses replication of HIV-1. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(18):4001–4008. doi: 10.1093/nar/gkf522.
78. Yosef I, Manor M, Kiro R, Qimron U. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(23):7267–7272. doi: 10.1073/pnas.1500107112.
79. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(2):95–105. doi: 10.1038/nrmicro2937.
80. Lee CH, Han SR, Lee SW. Therapeutic applications of aptamer-based riboswitches. *Nucleic Acid Ther*. 2016;26(1):44–51. doi: 10.1089/nat.2015.0570.
81. Vazquez-Anderson J, Contreras LM. Regulatory RNAs: charming gene management styles for synthetic biology applications. *RNA Biol*. 2013;10(12):1778–1797. doi: 10.4161/rna.27102.
82. Wang S, Kong Q, Curtiss R. New technologies in developing recombinant attenuated Salmonella vaccine vectors. *Microb Pathog*. 2013;58:17–28. doi: 10.1016/j.micpath.2012.10.006.
83. Mechaly A, Levy H, Epstein E, et al. A novel mechanism for antibody-based anthrax toxin neutralization: inhibition of prepore-to-pore conversion. *J Biol Chem*. 2012;287(39):32665–32673. doi: 10.1074/jbc.M112.400473.
84. Tian L, Heyduk T. Bivalent ligands with long nanometer-scale flexible linkers. *Biochemistry*. 2009;48(2):264–275. doi: 10.1021/bi801630b.
85. Hasegawa H, Savory N, Abe K, Ikebukuro K. Methods for improving aptamer binding affinity. *Molecules*. 2016;21(4):421. doi: 10.3390/molecules21040421.
86. Diafa S, Hollenstein M. Generation of aptamers with an expanded chemical repertoire. *Molecules*. 2015;20(9):16643–16671. doi: 10.3390/molecules200916643.
87. Gupta S, Hirota M, Waugh SM, et al. Chemically modified DNA aptamers bind interleukin-6 with high affinity and inhibit signaling by blocking its interaction with interleukin-6 receptor. *J Biol Chem*. 2014;289(12):8706–8719. doi: 10.1074/jbc.M113.532580.
88. Lollo B, Steele F, Gold L. Beyond antibodies: new affinity reagents to unlock the proteome. *Proteomics*. 2014;14(6):638–644. doi: 10.1002/pmic.201300187.

### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Зенинская Наталья Алексеевна**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «ГНЦ ПМБ» 312084

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, тел.: +7 (496) 731-20-84, e-mail: nataliazeninskaya@mail.ru. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5388-292X>. SPIN-код: 8215-3219

**Колесников Александр Владимирович**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «ГНЦ ПМБ», заведующий лабораторией иммунопротеомики микроорганизмов ОАО «Института инженерной иммунологии»

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, тел.: +7 (496) 731-20-84, e-mail: pfu2000@mail.ru. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8108-0265>. SPIN-код: 5324-5998

**Рябко Алёна Константиновна**, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «ГНЦ ПМБ»

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, тел.: +7 (496) 731-20-84, e-mail: ryabko\_alena@mail.ru. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7478-909X>. SPIN-код: 3992-7400

**Шемякин Игорь Георгиевич**, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора ФБУН «ГНЦ ПМБ» по научной работе, заведующий лабораторией молекулярной биологии

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, тел.: +7 (496) 736-00-60, e-mail: shemyakin@obolensk.org. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9667-1674>. SPIN-код: 3180-1459

**Дятлов Иван Алексеевич**, член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «ГНЦ ПМБ»

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, тел.: +7 (496) 736-00-03, e-mail: dyatlov@obolensk.org. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1078-4585>. SPIN-код: 6567-8380

**Козырь Арина Владимировна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «ГНЦ ПМБ»

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, тел.: +7 (496) 731-20-84, e-mail: avkozzyr@gmail.com. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6295-5943>. SPIN-код: 7791-8537