

УДК 517. 113
©Спиридонова

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ УЗНАЮЩИЕ ЭЛЕМЕНТЫ – ДНК-/РНК-АПТАМЕРЫ К БЕЛКАМ

В.А. Спиридонова

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992, Воробьевы горы, д.1, строение 40;
тел.: (495)-9393149; факс: (495)-9393181; эл. почта: spiridon@belozersky.msu.ru

Рассмотрены многочисленные данные о получении и свойствах новых молекулярных узнающих элементов - ДНК-/РНК-аптамеров. Основное внимание обращено на аптамеры к белкам, играющим центральную роль в распространенных заболеваниях человека. Обобщены данные об аптамерах к сериновым протеиназам, цитокинам, к белкам вируса гриппа, к белкам вируса иммунодефицита. Высокое сродство и специфичность связывания аптамеров с данными белками делает их привлекательными в качестве прямых ингибиторов белков. Аптамеры могут регулировать активность патогенных белков, и как показывают представленные данные, эта идея перешла из стадии фундаментальных исследований в плоскость решения практических задач.

Ключевые слова: ДНК-/РНК-аптамеры, белки, метод SELEX.

ВВЕДЕНИЕ. Прошедшее десятилетие ознаменовалось существенным прорывом в использовании фундаментальных знаний о ДНК в прикладные работы. Одним из быстро развивающихся направлений является разработка высокотехнологичных аналитических методов с использованием иммобилизованной ДНК. Основное достижение в технологии микроматриц, т.н. ДНК-чипов, состоит в возможности использовать разнообразные библиотеки ДНК, амплифицированные методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для создания наборов ДНК, которые с помощью гибридизации позволяют быстро проанализировать и сопоставить последовательности тысячи различных генов, их мутантные формы, полиморфизм ДНК и открытие новых генов. Второе направление – разработка метода иррационального дизайна нуклеиновых кислот для изучения проблем нуклеиново-белкового узнавания. Метод SELEX (от англ. Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) был разработан одновременно и независимо друг от друга в лабораториях Шостака и Голда (США) в 1990 году [1, 2]. Метод позволяет выделять целевые молекулы нуклеиновых кислот (аптамеры) из огромного набора индивидуальных молекул (более 10^{18}), называемого комбинаторной библиотекой. Аптамеры представляют собой небольшие однотяжевые молекулы ДНК или РНК длиной 40-100 нуклеотидных остатков с достаточно сложной трехмерной структурой. Именно сложная структура обеспечивает способность аптамеров специфически связывать различные молекулы, в том числе и белки. Таким образом, самый сложный процесс биосинтеза белковых “узнающих” элементов - антител, который природа создавала тысячелетиями, теперь удастся моделировать в пробирке.

Селекция начинается с генерации большой библиотеки РНК с фиксированными 5'- и 3'-концами и вырожденным районом длиной 30-60 нуклеотидов (рис. 1). Такая библиотека содержит 10^{14} – 10^{15} вариантов РНК молекул, которые сворачиваются в сложные трехмерные структуры. Библиотека инкубируется с белком, и РНК молекулы, которые связались с белковой мишенью, отделяют от тех, которые с ней не связались. Связавшиеся РНК молекулы далее отделяют от белка и амплифицируют с помощью обратной транскриптазы и ПЦР, чтобы получить новый пул молекул с увеличенным сродством. Процесс повторяется обычно 10-15 раз до тех пор, пока максимальное количество аптамеров, имеющих сродство к мишени, в обогащенной фракции не будет ощутимо заметным. Далее аптамеры клонируют, как правило, в бактериальной вектор и секвенируют. Для ДНК селекция начинается также с библиотеки ДНК, у которой рандомизированный район фланкирован фиксированными последовательностями на 5'- и 3'-концах. Для получения одностежечевых молекул ДНК используют либо асимметричный ПЦР, либо один из праймеров несёт биотинную метку, с помощью которой отделяют одну цепь ДНК от другой на колонках со стрептавидином. На сегодняшний день опубликовано много обзоров с детальным описанием всех этапов данного метода [3-10].

В настоящее время идея, согласно которой нуклеиновые аптамеры могут регулировать (ингибировать) активность белков, сейчас перешла из стадии фундаментальных разработок в плоскость решения практических задач. В обзоре обращено основное внимание на аптамеры к белкам, играющим центральную роль в распространенных заболеваниях человека.

Tuer C. и Gold L. предложили использовать комбинаторные библиотеки РНК для получения РНК-лигандов, которые связывались с T4 ДНК-полимеразой [1]. РНК лиганды были названы аптамерами в работе Ellington A.D. и Szostak J.W. [2]. Они первыми ввели название метода – SELEX. На сегодняшний день имеется большое количество данных, подтверждающих, что аптамеры являются новой, эффективной группой терапевтических препаратов, которые могут играть существенную роль в борьбе со многими болезнями.

Препарат Макуген уже получил одобрение FDA USA (Food and Drug Administration) для лечения возрастной дегенерации тканей глаза (AMD). Ряд аптамеров находятся в стадии пред- и клинических испытаний [11, 12].

1. СВОЙСТВА АПТАМЕРОВ КАК ИНГИБИТОРОВ БЕЛКОВ.

Свойства аптамеров, способных специфически связываться и “узнавать” свои мишени как антитела, делает их привлекательными в терапевтических целях. Подобно антителам они сворачиваются в сложные трехмерные структуры, образуя шпильки, петли. Как ДНК-, так и РНК-аптамеры связываются со своими белковыми мишенями с константой диссоциации от наномолярного до субнаномолярного уровней. Аптамеры различают родственные белки, состоящие из общего набора структурных доменов [13-16].

Надо подчеркнуть, что в предклинических исследованиях в избытке 1000-кратных доз на животных моделях и на человеке терапевтическое применение аптамеров не вызывало аллергических реакций [11, 17]. Были проведены исследования на биосовместимость, по фармакокинетике аптамеров, было изучено введение различных модификаций в структуру аптамера, чтобы в дальнейшем использовать их как лекарства [12].

Деградация под действием нуклеаз - это основная проблема при работе с олигонуклеотидами. Для того чтобы защитить молекулы от действия неспецифических нуклеаз, при селекции используют пиримидиновые нуклеотиды, модифицированные по 2'-позициям рибозы (аминопроизводные и фторпроизводные) [18-20], используют липосомы в качестве носителя [21], проводят постселекционную модификацию гидроксильного радикала по 2'-положению введением метильных, аллильных, аминогрупп и т.д. [22-24].

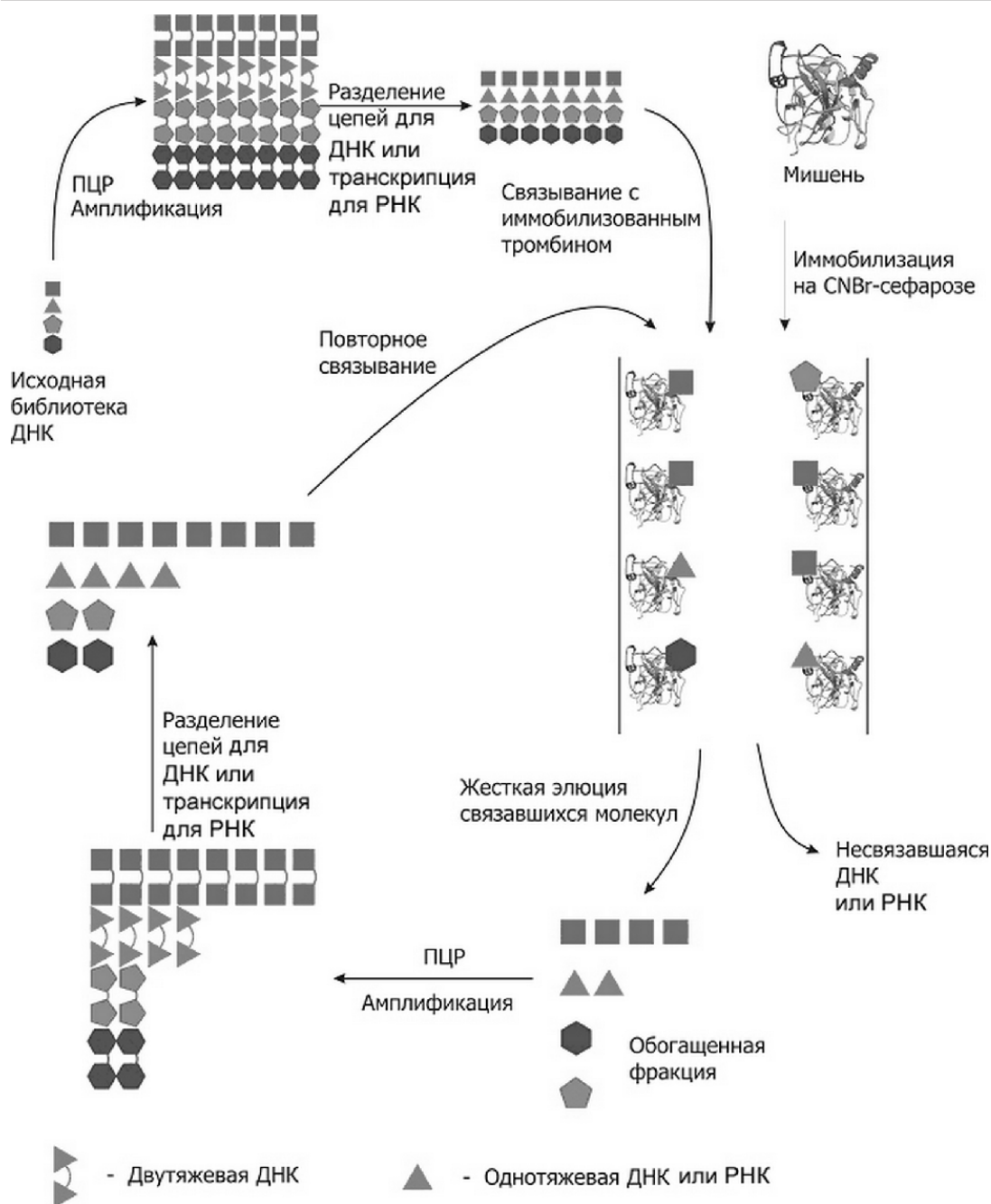


Рисунок 1.

Схема метода SELEX для получения ДНК- или РНК-аптамеров. Исходную рандомизированную библиотеку ДНК переводят в одноцепочечную ДНК (оцДНК) и вводят в реакцию связывания с белком, предварительно иммобилизованным на колонке. РНК получают транскрипцией из исходной библиотеки, в структуру которой включена последовательность промотора для фаговой T7 РНК полимеразы. С молекулами РНК также проводят связывание на колонке иммобилизованным белком. Отбросив не связавшиеся молекулы, отделяют те ДНК/РНК, которые связались, освобождают от белка фенол-хлороформной обработкой, осаждают спиртом и для РНК проводят реакцию получения кДНК с помощью обратной транскриптазы. Далее переводят все молекулы в двухцепочечную ДНК (дцДНК). На следующем этапе в случае ДНК получают оцДНК с помощью асимметричной ПЦР и вводят её на повторное связывание. Для молекул РНК снова проводят транскрипцию, и молекулы РНК вводят в реакцию связывания с иммобилизованным белком. Селекция состоит из 10-15 раундов, позволяет получить ощутимо заметное количество обогащенной фракции аптамеров. Далее проводят клонирование в плазмидный вектор и секвенируют полученные последовательности.

Укороченные полинуклеотиды имеют молекулярную массу 8-14 кДа, что соответствует 25-40 нуклеотидам. Этот маленький размер способствует быстрому выведению через почки за несколько минут. Чтобы пролонгировать время действия аптамеров, их модифицируют полиэтиленгликолем или другими агентами, или прикрепляют к поверхности липосом [21, 25].

Нужно отметить, что аптамеры, как правило, высоко специфичны к своим мишеням, и это нужно учитывать в предклинических испытаниях на животных моделях. Белковые ортологи животных могут снизить эффективность действия таких соединений. Для преодоления этого, был предложен метод, названный “toggle SELEX”. Метод предложен для РНК библиотек, которые инкубировали с этим же белком из человеческой плазмы. И в последующих раундах селекции он проходил через связывание и с животным ортологом, с которым далее будут проводиться предклинические испытания [26].

Проверяя фармакокинетику аптамеров после модификаций, обязательно должна быть проведена проверка на скорость выведения из организма. Это связано с тем, что у пациентов наряду с основным заболеванием могут быть множественные дисфункции, включая почечную недостаточность.

Для того чтобы регулировать активность аптамеров, Rusconi С.Р. развил концепцию антидотного контроля (методом рационального дизайна) [27]. Используя правило комплементарности по Уотсону-Крику, он разработал структуру антидота как комплементарную последовательность, которая, связываясь, изменяет конформацию аптамера и препятствует его комплексообразованию с белковой мишенью (рис. 2). Предложенная концепция создала уникальную возможность регулирования аптамеров, т.к. позволяет контролировать введение лекарственного аптамера при любом клиническом использовании.

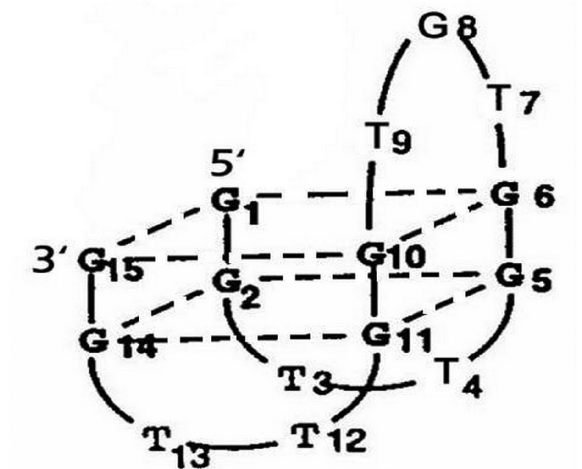


Рисунок 2.

Механизм действия антидота в паре аптамер-антидот [26]. Антидот RB007, олигонуклеотидная последовательность длиной 15 нуклеотидов, образует неактивный комплекс с аптамером к фактору IXa, участвующему в каскаде реакций свертывания крови. Антидот, имея последовательность, комплементарную аптамеру, образует комплекс с аптамером и разрушает его трёхмерную структуру.

Рассматривая аптамеры, как прямые ингибиторы белков, представляется чрезвычайно привлекательным использование их как для исследования механизмов ингибирования, так и при терапевтическом использовании. Возможность получать аптамеры для любого класса молекул позволяет оценить важность их использования и увеличивает разнообразие в применении. Использование аптамеров, которые сохраняют активность в многоклеточных организмах, облегчает предклинические испытания, сберегает время и материальные затраты, необходимые для получения антител на животных моделях. И, наконец,

развитие антитела, который контролирует активность аптамера, возможно, представляет собой наиболее значимый вклад в развитии терапии нуклеиновыми кислотами, создавая безопасность, позволяя четко контролировать дозировку лекарства. Нужно отметить, что не только биомедицинские исследования, но и создание биосенсоров с использованием аптамеров в качестве узнающих элементов на основе микроматриц представляется крайне актуальной задачей и логическим продолжением развития технологии ДНК-чипов.

В этом обзоре обобщены сведения об аптамерах к различным белкам, их сродство к мишеням, описаны ингибирующие свойства, а также сведения о предклинических и клинических испытаниях.

2. СЕРИНОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ.

2.1. Тромбин.

Тромбин – ключевой белок свертывания крови. Это сериновая протеиназа, продуцируемая в результате каскада протеолитических реакций, возникающих в процессе разрыва эпителия. Тромбин получается из протромбина под действием фактора Ха. Тромбин, в свою очередь, конвертирует фибриноген в фибрин, который строит фибриновый матрикс для тромба, захватывая клетки крови [28]. Тромбин также активизирует тромбоциты через взаимодействие с PAR- рецепторами, регулируя экспрессию ряда субстратов и активирующих молекул, таких как Р-селектин [29, 30].

Проблема гемостаза требует найти такой ингибитор тромбина, который был бы специфичен в процессе свертывания крови, не вызывал бы аллергической реакции, с помощью которого можно эффективно управлять этим процессом. Один из первых терапевтических аптамеров, полученных методом SELEX, был к тромбину. Однотяжевой ДНК–аптамер был выделен из пула $\sim 10^{13}$ олигонуклеотидных последовательностей, содержащих 60-нуклеотидную рандомизированную область [31]. После 5 раундов селекции были найдены аптамеры, которые образовывали комплекс с тромбином с $K_d = 25-200$ нМ. Основой аптамеров была последовательность 15-звенной структуры dGGTTGGTGTGGTTGG (15TBA). Аптамер удлинял время образования тромба с 25 до 169 с *in vitro* и с 25 до 43 с в плазме крови человека. Было проведено изучение структуры 15TBA ЯМР, рентгеноструктурным анализом в комплексе с тромбином и отдельно, исследовали связывание аптамера с анион-связывающим участком тромбина, экзосайт I [32-35]. 15TBA формирует сложную компактную третичную структуру, называемую G-квадродуплексом (рис. 3). В ряде других лабораторий также была проведена селекция к тромбину, используя метод SELEX [36, 37]. 15TBA влияет и на агрегацию тромбоцитов, стимулированную тромбином. Тромбин протеолитически активизирует рецептор PAR-1 тромбоцитов, аптамер дозозависимо ингибирует гидролитический разрыв рецептора [38].

Антикоагуляционная активность аптамера была тестирована на обезьянах. Протромбиновое время (РТ) увеличивалось в 1,7 раза в течение 10 минут и возвращалось к базовой линии через 10 минут после окончания введения аптамера. 15TBA также ингибировал агрегацию тромбоцитов и продлевал индуцированную тромбином активацию тромбоцитов [39]. Аптамер был изучен на антикоагуляционной модели в экстракорпоральной циркуляции на овцах. Значения РТ достигали 40-45 сек. (базовая линия 21,7 сек), в то время как контрольное РТ оставалось близким к базовой линии. В другом эксперименте 15TBA был изучен на модели шунтирования легочной артерии (СРВ). Были исследованы антикоагулянтная активность, почечный клиренс аптамера, фармакокинетика [40]. Животные были разбиты на две группы, первая, получавшая инъекции гепарина (300 Ед/кг) и протамина болюсно, была использована для контроля активности по СРВ. Вторая группа животных получала 0,3-0,5 мг/кг веса/мин аптамера инфузией. У этих животных было отмечено увеличение РТ, активированного частичного тромбопластинового времени (аРТТ) и активированного времени образования тромба (АСТ), которое затем возвращалось к базовой линии после остановки инфузии [39-41].

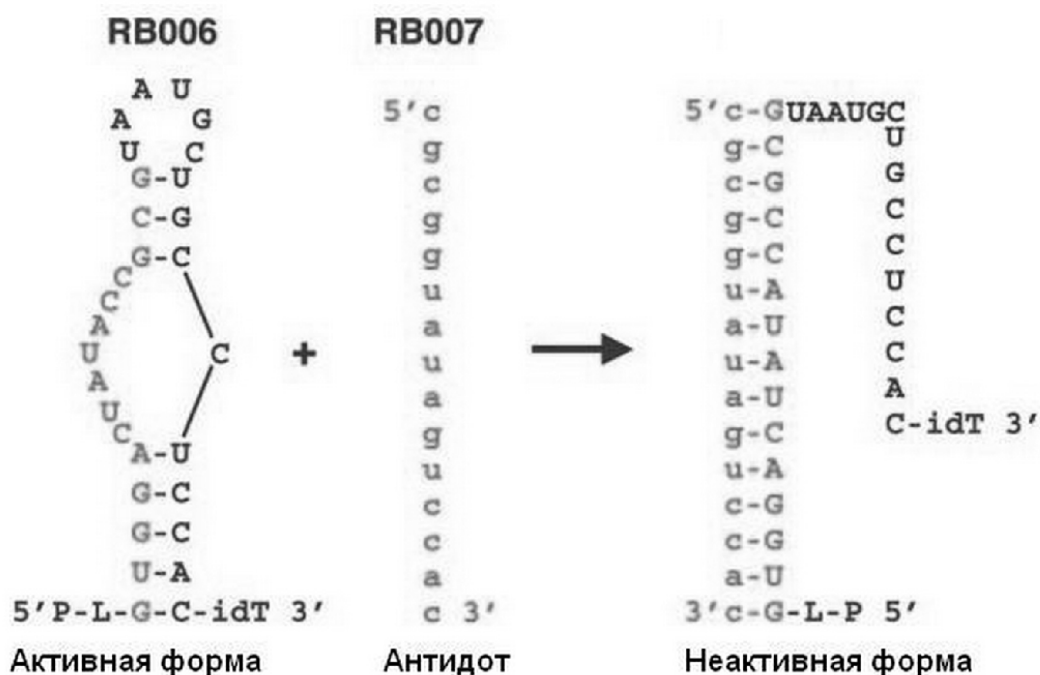


Рисунок 3.

Структура 15 ТВА аптамера к тромбину, ингибирующего фибриноген-гидролитическую активность. 15 ТВА имеет олигонуклеотидную последовательность dGGTTGGTGTGGTTGG.

Структурообразующим элементом для ДНК является G-квадруплексная структура.

Восемь гуанинов из девяти образуют два плоских G-квартета с тремя выпетливаниями: петля TGT располагается в центре структуры, и две симметричные петли TT.

Факторами, ответственными за сохранность G-квадруплекса является наличие октакоординирующего иона калия и стэкинг-взаимодействия между G-квартетами дуплекса.

Ион калия располагается между параллельными плоскостями G-квартета.

Фармакокинетику изучали на модели СРВ и обнаружили, что время полужизни аптамера составляет 1,9 мин, однако, во время 60-мин инфузии время жизни увеличивалось до 7,7 мин. Эти результаты указывают на то, что аптамер мог бы функционировать в животной модели и что немодифицированные ДНК-аптамеры быстро выводятся из организма. В настоящее время этот ДНК-аптамер проходит предклинические испытания в “Archemix Corp.” для подготовки экспериментов на человеке.

РНК-аптамеры против тромбина были получены с использованием библиотеки с 30-нуклеотидной рандомизированной последовательностью [42]. После двенадцати раундов селекции были получены аптамеры против тромбина. Обогащенную фракцию клонировали в pUC18 и секвенировали; в результате были получены два семейства аптамеров. Консервативный мотив в 22 клонх первого набора представлял UCCGGAUCGAAGUUAGUAGGCGGA последовательность внутри варибельной зоны. Один из лучших аптамеров в комплексе с тромбином имел сродство к белку $K_d = 9,3 \pm 1,0$ нМ. Представители второго семейства обладали более низким сродством $K_d = 155 \pm 9,0$ нМ. Конкурентный анализ с гепарином и гирудином показал, что гепарин вытесняет РНК-аптамер из комплекса с тромбином, а гирудин – нет. Это указывало на сродство данного аптамера к экзо-сайту II тромбина. Однако тесты на функциональную активность на животных моделях проделаны не были.

В предклинических испытаниях высоко-специфичные аптамеры, полученные к белкам человека, могут хуже связываться с белками – ортологами на животных моделях. Для преодоления этой проблемы, был предложен т.н. “toggle” подход, при котором 2'-фторпроизводные РНК инкубировали со смесью тромбина человека и свиньи на первом раунде селекции, а в последующих раундах использовали в качестве мишени тромбин человека и свиньи поочередно [43]. После 13 раундов селекции были выявлены клоны с консервативными последовательностями GGGAACAAAGCUGAAGUACUUACCC, которые перекрестно реагируют с тромбином человека и свиньи. Комплекс с тромбином человека имел константу диссоциации: $K_d = 2,8 \pm 0,7$ нМ; с тромбином свиньи: $K_d = 83 \pm 3$ пМ. Аптамер увеличивал время свертывания (концентрация тромбина 10 нМ) плазмы крови с $11,6 \pm 0,2$ с до $22,6 \pm 1,4$ с. В плазме крови свиньи Tog-25 увеличивал время образования тромба с $15,7 \pm 0,7$ сек. до $61,9 \pm 1,2$ сек. Улучшение тромбин-зависимой агрегации тромбоцитов с помощью аптамера происходило дозозависимо. При этом больший эффект достигали на тромбоцитах свиньи, приблизительно 10-кратный избыток Tog-25 ингибировал на 90% активность тромбина [26, 43].

2.2. Фактор VIIa.

Фактор VIIa (FVIIa) является трипсин-подобной протеиназой, которая вовлечена в коагуляционный каскад. В сочетании с тканевым фактором (TF) эта протеиназа играет критически важную роль в процессе образования тромбина и способствует активному тромбообразованию. С помощью метода SELEX из РНК-овой библиотеки были выделены аптамеры на фактор VIIa. Эти аптамеры ингибировали активацию фактора X фактором VIIa, предшественника в коагуляционном каскаде. [15]. После 16 раундов селекции 2'-аминомодифицированной РНК библиотеки выделенные аптамеры образовывали комплекс с FVIIa с $K_d = 11,3 \pm 1,3$ пМ. Специфичность отдельных аптамеров была изучена в реакциях связывания с другими белковыми факторами (FXIa и FXa). Микромолярные значения константы диссоциации этих комплексов указывали на неспецифическое связывание аптамеров с данными белковыми факторами. При добавлении аптамера к FVIIa наблюдали уменьшение начальной скорости активации FX приблизительно на 95%. Эксперименты с использованием разведения реакционной смеси показали дозо-зависимый характер ингибирования. Аптамер удлинял время свертывания до 175% в протромбиновой пробе (PT).

2.3. Фактор IXa.

Фактор IXa (FIXa) – это сериновая протеиназа, которая играет важную роль в создании критической массы тромбина, необходимой в коагуляции. Комплекс TF/ FVIIa, гидролизует белковый фактор FIX, превращает его в активированную форму FIXa, а тот, в свою очередь, связывается с FVIIIa на поверхности тромбоцита и активирует фактор FX до FXa, который переводит протромбин в тромбин [28]. Селекция РНК к FIXa была проведена Rusconi C.P. с сотрудниками, и после восьми раундов селекции был найден аптамер, который связывался с FIXa с $K_d = 0,65 \pm 0,2$ пМ и обладал 5000-кратным сродством к FIXa по сравнению с факторами FVIIa, FXa, FXIa и активированным протеином C [20]. Укороченная версия аптамера к FIXa (9.3t) сохраняла высокое сродство к FIXa ($K_d = 0,58 \pm 0,1$ пМ) и полностью блокировала гидролиз FX энзимным комплексом.

Антикоагуляционная активность 9.3t была проверена на активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). Аптамер увеличивал время свертывания в дозо-зависимой манере и удлинял время в несколько раз. Rusconi C.P., развивая теорию антитода, получил РНК-антитод, который обратимо ингибировал активность 9.3t и прямо создавал пару лекарство-антитод для антикоагуляционной терапии. Используя принцип комплементарности, был создан второй РНК олигонуклеотид, который был комплементарен 9.3t аптамеру. При введении антитод-нуклеотида менялась антикоагуляционная активность аптамера к FIXa в течение 10 минут, и это состояние удерживалось в течение

5 часов [16]. Почти у 5% из 12 миллионов людей, которые получают терапию гепарина, через год наступает развитие тромбоцитопении (НТ) [28], и поэтому они не могут далее получать гепаринотерапию. Пациентов, которым требуется повторная антикоагулянтная терапия, переводят на гемодиализ, что, конечно, осложняет жизнь больного.

Для того, чтобы продлить время действия аптамера к фактору FIXa *in vivo* Rusconi С.Р. с сотрудниками получили холестеринное производное (Ch-9.3t), которое обладало высоким сродством ($K_d = 5,3 \pm 1,1$ пМ) и антикоагулянтной активностью [27]. Тестирование на плазме животных (свинья, мышь) показало, что возможно проведение исследований на животных моделях с той же эффективностью, что и в плазме человека. Эксперименты показали, что при использовании антикоагулянтной системы свиньи аптамер увеличивает ТВ и АЧТВ сравнимо с ТВ и АЧТВ в пробах плазмы человека. Разница между модифицированным аптамером и исходным была разительна: для 9.3t время полужизни составляло 5-10 мин, а для Ch-9.3t - 60-90 мин. Антитот 5-2С отменял эффект на 95% в течение 10 мин на животных моделях [27].

Для оценки антитромботического эффекта, препарат был использован на модели тромбоза у мышей, который вызывали введением в сонную артерию хлорида железа животным, получавшим также Ch-9.3t или функционально неактивный аптамер, имеющий случайную нуклеотидную последовательность. У всех мышей группы отрицательного контроля образовывался закупоривающий тромб в течение $8,1 \pm 0,1$ мин. В группе, получавшей аптамер, 80% сохраняли чистый кровоток после 30 мин введения (время образования закупоривающего тромба $\geq 24,4$ мин) [27]. Чтобы измерить влияние антитота 5-2С, была использована модель активного кровотечения (отсечение хвоста). Мышам вводили Ch-9.3t или аптамер со случайной последовательностью и после 1 часа отсекали хвост. Далее измеряли потерю крови после 15 мин. Животные, получавшие Ch-9.3t, теряли намного больше крови ($176 \pm 23,7$ мкл), чем контрольные ($48 \pm 17,8$ мкл). Введение антитота 5-2С сразу же после отсечения хвоста предотвращало геморрагию у животных, получавших аптамер (потеря крови $54,5 \pm 13,6$ мкл) [27].

Биофармацевтическая компания “Regado Biosciences” продолжает исследования пары аптамер к FIXa – антитот, названной REG1, и проводит клинические испытания первой фазы.

2.4. Протеиназа гепатита вируса С - NS3 (HSV-NS3).

Вирус гепатита С (HCV) является основной причиной, вызывающей как sporadический, так и вирусные гепатиты, отличные от гепатитов А или В [44].

Кодируемый вирусом неструктурный белок 3 (NS3) – является сериновой протеиназой, которая обладает протеиназной и хеликазной активностью и представляет хорошую мишень для ингибирования вируса (HCV). Селекция была выполнена с библиотекой, несущей 120-нуклеотидную рандомизированную область, и после 6 раундов селекции были получены два аптамера, которые ингибировали протеиназную и хеликазную активность [45]. Для идентификации аптамера со сродством к активному сайту фермента NS3, была проведена селекция с использованием укороченного полипептида Δ NS3. Используя РНК библиотеку с 30-рандомизированной областью, авторы провели 9 раундов селекции и идентифицировали 45 клонов, которые связывали Δ NS3 [46].

По данным нуклеотидной последовательности аптамеры были поделены на три семейства. Все они содержали консервативную область GA(A/U)UGGGAC. Эти аптамеры образовывали комплекс с полипептидом Δ NS3 с $K_d = 10$ нМ, ингибировали 90% протеиназной активности полипептида Δ NS3 и полноразмерной NS3, связанной с мальтозо-связывающим белком (MBP-NS3). *In vivo* белки вируса HCV процессируются NS3 и кофактором NS4A. Для моделирования физиологических условий влияние аптамера на активность NS3 было тестировано в присутствии P41 пептида, который увеличивает MBP-NS3

активность в семь раз. В этих условиях аптамер ингибировал на 70% активность MBP-NS3 [46].

2.5. Эластаза нейтрофилов человека.

Воспаления, такие как острый респираторный синдром (ARDS), септический шок, артрит, реперфузия ишемии, вовлекают нейтрофильную эластазу (hNE) [47]. Ковалентный ингибитор hNE дифенилфосфонат валина (валР) был связан с РНК-библиотекой, чтобы увеличить сродство ингибитора к hNE [47]. После 10 раундов селекции был выделен РНК-аптамер, конъюгированный с ДНК:валР субстратом (РНК 10.11: ДНК:валР). Аптамер связывался с hNE с $K_d = 71$ нМ и был потенциальным ингибитором фермента $K_i = 5$ нМ *in vitro*. В противоположность аптамеру РНК 10.11 или субстрату ДНК:валР, вводимым поодиночке, модифицированный субстрат аптамер ингибировал активность hNE в *ex vivo* на крысиной модели острого респираторного синдрома ARDS [48]. Для поиска ДНК-аптамера как потенциального ингибитора hNE та же группа авторов провела селекцию на ДНК библиотеке, связанной с валилфосфонатом. В этом случае была использована энантиомерная форма валилфосфоната, которую сравнивали с рацемической смесью. Селекцию ингибиторов осуществляли как против чистой эластазы, так и против секретируемой эластазы в присутствии нейтрофилов [49]. После 18 раундов селекции был выделен аптамер ED45, который ингибировал hNE. Аптамер, укороченный до 42 нуклеотидов и названный NX21909, был тестирован на крысиной модели воспаления легких. При дозе 40 нмоль NX21909 ингибировал нейтрофильную инфильтрацию на 53% в лёгких крысы *in vivo* [49].

3. ЦИТОКИНЫ - РОСТОВЫЕ ФАКТОРЫ.

3.1. VEGF.

Ангиогенез играет центральную роль в ряде физиологических и патологических процессах. VEGF (vascular endothelial growth factor) – один из тех ростовых факторов, который наиболее полно охарактеризован, вовлечён в начальный этап и в развитие ангиогенеза и представляет собой многообещающую мишень в противоопухолевой терапии [50].

Повышенный уровень VEGF, связанный с новообразованием сосудов, наблюдают при росте опухоли и метастазировании, при преждевременном старении, при возрастной дегенерации тканей [50-52].

С помощью метода SELEX были выполнены селекционные циклы против VEGF₁₆₅ [19, 20, 53-55] с использованием 2'-фторзамещенных пиримидинов в РНК библиотеке, Ruckman J. провел 12 раундов селекции и выделил аптамеры с $K_d = 50$ пМ. Для увеличения стабильности против нуклеаз два аптамера дополнительно модифицировали по 2'-О-положению [55]. Эти аптамеры имели $K_d = 49$ и 130 пМ, были специфичны к VEGF₁₆₅ и не связывались с родственными белками: VEGF₁₂₁ или плацентарным PlGF₁₂₉. Аптамеры к VEGF₁₆₅ были способны ингибировать связывание VEGF₁₆₅ с рецепторами Flt-1 и киназным доменом рецептора KDR. Используя йод-меченный VEGF₁₆₅, было оценено ингибирование рецепторов: для Flt-1 $IC_{50} = 50-300$ пМ, для KDR – 2-60 пМ [55].

Для оценки терапевтического потенциала аптамеров к VEGF была использована проба Милеса, проба *in vivo* на ингибирование VEGF₁₆₅ аптамерами, в которой измеряют проницаемость стенок сосудов на животных моделях. Тест проводили на морских свинках (взрослые особи), и наиболее эффективный аптамер замедлял проницаемость стенки сосудов на 58% при концентрации 1 мкМ [55].

На обезьянах была исследована фармакокинетика 2'-фторпиримидин- и 2'-О-метил пуриновых аптамеров к VEGF, названных NX-1838. При внутривенном введении эти аптамеры в виде ковалентно связанных с полиэтиленгликолем 40 кДа имели время полужизни 9,3 ч при скорости выведения 6,2 мл/ч. Подкожное введение таких аптамеров показало 80% адсорбцию в тканях в течение 8-12 ч [25].

Доклиническое и клиническое исследование NX-1838, названного Макуген (Macugen), было проведено “Eyetechnopharmaceuticals Inc.” для лечения возрастной дегенерации тканей (AMD) у больных диабетом [11, 12].

Синтезированный аптамер NX-1838 был изучен и на крысиной модели ангиогенеза. Эти исследования подтвердили существенное ингибирование, на 80% процесса образования новых сосудов с помощью VEGF в присутствии аптамера. На клинической стадии исследований фазы 1А не было выявлено существенных осложнений при однократном введении лекарства. Кроме того, 80% пациентов показали стабильное улучшение при наблюдении в течение 3 месяцев после инъекций, 27% продемонстрировали трехкратное улучшение зрения среди диабетиков (ETDRS) [10].

Клинические исследования препарата (Фаза 2) показали, что при многократном введении Макугена с или без фотодинамической терапии (PDT) никаких серьезных ухудшений не наблюдается, а, наоборот, 87,5% пациентов показали стабильное улучшение зрения, а 25% продемонстрировали значительное улучшение по системе ETDRS (Early Treatment for Diabetic Retinopathy Study).

На 3-ей фазе клинических испытаний использовали Макуген (коммерческое название Pegaptanib) как единственный лекарственный препарат при введении в стекловидное тело в дозах 0,3; 1,0; 3,0 мг каждые 6 недель в течение 48 недель [56]. Во всех трех группах испытуемых наблюдали статистически значимое улучшение зрения. Тяжелая потеря зрения, определяемая как потеря видения 30 букв и более, уменьшилась с 22 до 10% в группе, получавших 0,3 мг Макугена. Кроме того, 33% сохранили или увеличили остроту зрения в сравнении с 23% контрольными пациентами. Никаких антител против Макугена не было обнаружено. “Eyetechnopharmaceuticals Inc.” в содружестве с “Pfizer” получили разрешение от FDA для использования Макугена при лечении AMD (возрастной дегенерации тканей).

Эти первые результаты показывают, что аптамеры могут быть эффективными лекарственными препаратами.

Известно, что интенсивное развитие опухоли сопровождается образованием новых сосудов, поэтому были предприняты исследования с целью использовать аптамер к VEGF для блокирования роста сосудов и как следствие остановки развития опухоли.

Аптамер, полученный Ruckman J., был тестирован на мышах, которым прививали опухоль Уилмса (детский рак почки). Опухоль имплантировали в почку мыши и поддерживали её рост неделю. Группа мышей получала ежедневную инъекцию 200 мкг аптамера к VEGF, а контрольная группа - фосфатно-солевой буфер в течение 5 недель [57]. После декапитации животных наблюдали уменьшение в весе опухоли на 84% у обработанных мышей в сравнении с контрольной группой. Кроме того, метастазы в легких были видны только у 20%, в сравнении с 60% у контрольной группы. Аптамеры, тестированные на мышью бластоме, показали уменьшение роста опухоли на 53% в сравнении с контролем [57].

3.2. Основной ростовой фактор фибробластов.

Увеличение уровня основного ростового фактора фибробластов (bFGF) коррелирует с возникновением разных болезней, включая ретинопатию, ревматоидный артрит, лейкемию [58].

Создание аптамера против bFGF провели Jellinek D. с сотр. на основе библиотеки с 2'-аминопиримидинпроизводными РНК в течение 11 раундов селекции [58]. Был найден аптамер m21A, который связывался с bFGF с $K_d = 0,35$ нМ и конкурировал за bFGF как с нефракционированным гепарином, так и с низкомолекулярным гепарином. Ингибирующая активность m21A была проверена на клетках китайского хомячка (CHO), где аптамер связывался со своей мишенью с $K_d = 1-3$ нМ [59]. Было изучено воздействие m21A на миграцию эндотелиальных клеток в дуоденальной области в клетках аорты быка, где присутствует активный эндогенный bFGF. Аптамер m21A ингибировал

клеточную миграцию клеток в дозо-зависимой манере при концентрации >50 нМ в сравнении с контролем. РНК-аптамер ингибировал связывание bFGF с клеточным рецептором [20].

3.3. Тромбоцитарный фактор роста.

Тромбоцитарный фактор роста (PDGF) – митоген, представляющий собой димер, составленный из двух гомологичных цепей, с тремя дисульфидными связями, вовлечен в процесс заживления ран и в прогрессирование ряда болезней, включая атеросклероз и гломерулонефрит. Множество опухолевых клеточных линий продуцируют и секретируют PDGF [60].

Селекция ДНК *in vitro* против рекомбинантного PDGF-AB человека была выполнена за 12 раундов. ДНК-аптамеры имели $K_d = 50$ пМ. Три аптамера эффективно ингибировали связывание PDGF-BB с α и β рецепторами PDGF с $K_i = 1$ нМ. PDGF-аптамеры также ингибировали митогенные эффекты PDGF-BB на клетках, экспрессирующих рецепторы с PDGF β с $K_i = 2,5$ нМ [61].

Один аптамер, названный 36t, был укорочен и получен в виде 2'-О-метил-, 2'-О-фтор- производного, закрыт группой с 3'- конца с целью придать устойчивость к нуклеазам и связан с 40кДа ПЕГом, чтобы увеличить время циркуляции в кровотоке [62]. Модифицированный аптамер связывался с белком человека с высокой эффективностью ($K_d = 100$ пМ), и в дальнейшем был тестирован на крысиной модели гломерулонефрита. В этой модели введение двух доз в день аптамера (2,2 мг/кг) уменьшало митоз на 64% в течение 6 дней и на 78% за 9 дней. У животных, получавших раствор аптамера, наблюдали уменьшение моноцит-макрофагового индекса и сверхпродукцию компонентов клубочкового матрикса. Контрольному животному в течение 6 дней вводили олигонуклеотид со случайной последовательностью или просто раствор ПЕГа [63].

3.4. Интерферон γ человека.

Интерферон γ обладает многочисленными иммунорегуляторными эффектами. Его противовирусное и антипролиферативное действие менее выражено, чем у IFN- α и IFN- β . Однако при этом IFN- γ служит наиболее сильным активатором макрофагов и индукторов экспрессии молекул МНС класса II [58]. В здоровой нервной ткани IFN- γ (гамма-интерферон) практически отсутствует, однако при воспалительных процессах в нервной системе и при рассеянном склерозе он образуется в избытке. Секреция IFN- γ может быть результатом воспаления и аутоиммунных болезней. Селекцией РНК-овой библиотеки получили аптамеры, которые ингибировали рецепторное связывание IFN- γ . Были использованы 2'-фторзамещенные пиримидины, 2'-аминопиримидины или смесь двух модификаций [64].

Полученный аптамер 2'-амино-30 имел константу диссоциации в комплексе с рецептором $K_d = 2,7$ нМ. В культуре клеток A549 он ингибировал связывание IFN- γ со своим рецептором с $K_d = 10$ нМ. Этот аптамер также ингибировал индукцию МНС комплекса, регулируемую IFN- γ , и экспрессию ICAM-1, значение IC₅₀ составляло 700 и 200 нМ, соответственно [64].

3.5. Ангиопоэтин-2.

Эндотелиальный рецептор тирозинкиназы Tie2 играет важную роль в стабильности сосудистой стенки. Ангиопоэтин-2 (Ang-2) – это природный антагонист, который, по-видимому, экспрессируется только во время активного ангиогенеза, например, при росте опухоли [65]. Чтобы исследовать ингибирование Ang-2 в присутствии аптамеров, было проведено 11 раундов селекции РНК и выделены РНК молекулы, которые специфически связываются с Ang-2. Самое высокое сродство в комплексе с Ang-2 показал аптамер с $K_d = 3,1$ нМ. Он не связывался с Ang-1 ($K_d > 1$ мкМ). Этот аптамер укоротили до 41 звена ($K_d = 2,2$ нМ), и в укороченном варианте он ингибировал функции Ang-2 в клеточной культуре и на крысиной модели, где аптамер существенно ингибировал неоваскуляризацию на 40% [65].

4. АПТАМЕРЫ К БЕЛКАМ ВИРУСА ГРИППА.

Грипп – одно из наиболее распространенных заболеваний в мире. Контроль за ним проводят с помощью активных компаний по вакцинации населения, а также используя лекарства, блокирующие действие нейраминидазы. Использование аптамера помогает блокировать связывание вируса с клеточными рецепторами. Выделенные ДНК-аптамеры, связываясь с гемагглютинином вирусных частиц, блокировали проникновение вируса в клетку [66, 67].

На поверхности вируса находятся выступающие домены гемагглютинина (гликопротеина), который способен агглютинировать клетки крови, в первую очередь эритроциты. Гемагглютинин обеспечивает способность вируса присоединяться к клетке. Нейраминидаза отвечает, во-первых, за способность вирусной частицы проникать в клетку-хозяина, и, во-вторых, за способность вирусных частиц выходить из клетки после размножения. Получены два ДНК-аптамера к пептиду (91-261) гемагглютинина, эта область включает зону связывания олигосахаридного компонента рецептора клеток. Аптамер A22 проявлял высокую связывающую активность и блокировал агглютинацию красных кровяных клеток цыпленка [66]. Влияние A22 было подтверждено микроскопическими исследованиями, при которых наблюдали сохранение структуры клеток в сравнении с контрольными препаратами, у которых наблюдали разрушение структуры в присутствии вируса. Эти же авторы выделили два РНК-аптамера к гемагглютинуину. Была использована библиотека с рандомизированной последовательностью в 30 нуклеотидов. Предсказанная вторичная структура длиной 73 оснований включала нуклеотиды рандомизированной области, а также константные последовательности фланкирующего района. Один из аптамеров образовывал комплекс с гемагглютинином с константой $K_d = 2,9$ нМ. Сродство аптамера было в 15 раз выше, чем у моноклонального антитела к белку. Более того, с помощью РНК-аптамера можно было отличать гемагглютинины, выделенные из двух разных штаммов (Panama и Aichi) [67].

5. АПТАМЕРЫ К БЕЛКАМ, СВЯЗЫВАЮЩИМ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ.

5.1. Tat-белок.

Терапевтическое использование аптамеров было предпринято при изучении репликации HIV. Вирусы иммунодефицита человека ВИЧ-1 и ВИЧ-2, относящиеся к подсемейству лентивирусов, избирательно поражают Т-хелперы. Регуляторный Tat-белок активирует вирусную репликацию. Элемент (TAR) длиной в 60 нуклеотидов, присутствующий во всех предсказанных вирусных транскриптах, требуется для функционирования Tat-белка. С целью захвата Tat-белка, в РНК-овую ловушку было предложено экспрессировать TAR последовательность, в 60 нуклеотидов длиной [68, 69]. TAR – транскрипт вируса HIV экспрессировали в клетках СЕМ SS. РНК-овая ловушка ингибировала до 99% репликации вируса HIV *in vitro*. Ингибирование репликации протекало при экспрессии TAR аптамеров с высоким уровнем с тРНК-ого промотора в клетках CD4+. Изменение нуклеотидной последовательности шпильки или петель в структуре TAR-аптамера нарушало способность ловушки связывать Tat белок и ингибировать репликацию HIV [68, 70].

С помощью метода SELEX была выполнена селекция на Tat белок с целью получить аптамер, связывающий Tat белок. Используя 120-звенные рандомизированные библиотеки и проведя 11 раундов селекции, был получен укороченный вариант РНК-аптамера, названный RNA^{Tat} , образующий комплекс с Tat белком с $K_d = 120$ пМ. Этот 37-звенный аптамер ингибировал HIV-1 *in vitro* и снижал репликацию вируса на 70% в культуре клеток [71].

В других исследовательских группах также были получены РНК-овые ловушки, которые связывали Tat белок и ингибировали HIV-1 [72, 73].

Но было отмечено существование несовместимости между TAR и Tat взаимодействиями HIV-1 и HIV-2, относящихся к разным подсемействам. В то время как Tat-1 может трансаktivировать HIV-2 через TAR-2, Tat-2 не взаимодействует с TAR-1 в HIV-1 [74].

5.2. HIV-1 Rev (ревертаза).

Вирусный белок Rev способствует транспорту молекул РНК, подвергнутых частичному сплайсингу, в цитоплазму, которые обеспечивают синтез обычных ретровирусных продуктов. RRE элемент (Rev Responsive Element), состоящий примерно из 234 нуклеотидных звеньев, образует сложную трехмерную структуру, с которой и связывается Rev белок. Используя промотор тРНК для экспрессии RRE элемента, основного Rev- связывающего сайта в вирусе HIV-1, в клетках оценивали влияние избыточного синтеза данной конструкции. Экспрессией химерного тРНК- RRE аптамера была подавлена вирусная репликация более, чем на 90% [75]. Аптамеры прошли 1 фазу клинических испытаний, в которых данная конструкция была трансдуцирована *in vitro* в клетки CD34+ из клеток костного мозга пациентов с HIV-1 с последующей реинфузией этим больным. После введения аптамера не наблюдали никакого неблагоприятного отклика, однако отмечали невысокий уровень экспрессии гена RRE-аптамера, по-видимому, из-за неоптимальных условий введения гена [76].

5.3. HIV обратная транскриптаза.

Обратная транскриптаза (RT) стала первой мишенью при разработке метода SELEX в HIV- терапии. Tuerk и Gold опубликовали основополагающую работу о SELEX. Они использовали обратную транскриптазу как мишень для выделения РНК-лигандов, которые бы ингибировали HIV репликацию [1]. Используя рандомизированную библиотеку по 32 позициям, после 9 раундов селекции авторы выделили РНК, которая специфически связывалась с обратной транскриптазой HIV и ингибировала её активность [77]. Структура РНК аптамера была впоследствии охарактеризована и эксперименты на клетках показали уменьшение репликации HIV-1 на 90-99% [78]. Кроме того, Т клетки, экспрессирующие аптамер, полностью блокировали распространение HIV в культуре [79].

5.4. Транскрипционный фактор E2F.

Пролиферация клеток сердечной мышцы и сосудов - это центральная проблема в развитии таких сердечно-сосудистых болезней, как гиперплазия, атеросклероз, злокачественные опухоли [80, 81]. E2F является центральным в регуляции клеточной пролиферации. Фактор E2F связывается с высокой специфичностью с двутяжевой ДНК, содержащей восемь пар оснований TTTTCGCGC. Был сконструирован 14-звенный ДНК-аптамер. Он содержал последовательность для связывания E2F и был тестирован на способность ингибировать активность E2F [82]. В мышечных клетках сосудов (VSMC), стимулированных E2F, 14-звенный олигонуклеотид (ODN) ингибировал пролиферацию VSMC и экспрессию генов *c-myc*, *cdc2*, контролирующих клеточный цикл и антиген (PCNA). *In vivo* 14-звенный ODN ввели трансфекцией на модели пересадки тканей в сонные артерии крысы и показали заметную супрессию образования фиброзной оболочки в сравнении с нетрансфицированными сегментами артерии. Кроме того, это ингибирование поддерживали в течение 8 недель после одной трансфекции [81]. С помощью метода SELEX были выделены ДНК аптамеры к E2F, которые ингибировали ДНК-связывающую активность белка [82].

Эти интересные результаты позволили группе Dzaui провести испытания аптамера к E2F на человеке, чтобы определить, можно ли ограничить гиперплазию интимы при введении аптамера в вену [83, 84]. E2F аптамер доставляли в паховую вену с помощью трансфекции. Эффективность клеточной трансфекции составляла 89%, экспрессия *c-myc* и PCNA уменьшалась до 73 и 70%, соответственно, в сравнении с контрольной группой. После 12-месячных осмотров некоторое

число стенозов было замечено в группе больных, получивших E2F аптамер, в сравнении с контрольной группой.

Сейчас E2F аптамер находится в третьей фазе клинических испытаний в корпорации “Corgenetch Inc.”, чтобы оценить его эффективность при ограниченных коронарных и периферических сосудистых повреждениях. На сегодняшний день разработка аптамера уже близка к клиническому использованию.

E2F аптамер был также использован для оценки длительности действия при гиперплазии неоинтимы и атеросклерозе. [85]. На модели гиперхолестеролемии на кроликах вводили в шейную вену E2F аптамер и олигонуклеотид случайной последовательности. После 6 месяцев, когда животные находились на холестеринсодержащей диете, группа с E2F аптамером не имели бляшек, в то время как в группе животных, получавших олигонуклеотид со случайной последовательностью, и в контрольной группе имело место интенсивное образование бляшек [85].

Наконец, SELEX был использован для получения РНК-аптамера, который связывается и ингибирует E2F. В экспрессионную кассету тРНК была вставлена данная конструкция, которая блокировала ($IC_{50}=15\text{нМ}$) связывание E2F1 с ДНК [86]. Для тестирования способности E1 РНК аптамера блокировать пролиферацию, фибробласты человека были обработаны E1 РНК-аптамером и индуцированы на пролиферацию. РНК-аптамер ингибировал S-фазу на 80% в сравнении с контролем [86]. Таким образом, природный и *in vitro* полученный аптамеры, по-видимому, являются ингибиторами пролиферации.

5.5 Фактор NF-κB.

Транскрипционный ядерный фактор каппа В (NF-κB) активирует гены, вовлеченные в воспалительные процессы и синтез цитокинов, интерферонов, МНС белков, ростовых факторов и молекул клеточной адгезии, которые играют решающую роль при инфарктах и других ишемических болезнях [87]. Он также необходим при экспрессии генов HIV-1 и последующей регуляции клеточных опухолей. Был найден природный аптамер двутяжевой ДНК, который связывается с NF-κB с высоким сродством. Этот аптамер, названный “природной ловушкой”, исследовали *in vivo* при кардиоишемической перфузии и был отмечен эффект на обработанных животных при ингибировании травмы [88]. Через три дня после трансфекции на крысиных моделях с тромбозом у животных, трансфицированных аптамером, восстановился коронарный кровоток на 97 против 61% в контроле. Группа животных, получавших аптамер, показывала низкий процент нейтрофильной адгезии к эндотелиальным клеткам (38 против 81%) и низкий уровень интерлейкина-8 (109 против 210 нг/мг) по сравнению с контролем [89].

Флуоресцент-меченный NF-κB аптамер был изучен на мышинной модели нефритов, где аптамер блокировал мелкоочаговое воспаление и экспрессию маркеров воспаления IL-1α, IL-1β, IL-6, ICAM-2, VCAM-1 [90].

С помощью метода SELEX был получен РНК-аптамер против p50 субъединицы NF-κB. 14 раундов селекции позволили выделить РНК-аптамер, который связывался с p50 с высоким сродством и ингибировал связывание NF-κB с ДНК, препятствуя димеризации белка [91].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Работа с аптамерами имеет ряд преимуществ по сравнению с антителами:

- в лечебной практике применение аптамеров возможно там же, где уже используются антитела для лечения; при этом аптамеры - неиммуногенны;
- аптамеры имеют такое же высокое сродство к своим белковым мишеням, как и антитела;
- аптамеры могут быстрее связываться и проникать к патологическому очагу;
- к аптамеру можно получить антитод, с помощью которого можно регулировать активность введенного аптамера.

Метод SELEX, разработанный сначала для белков, узнающих нуклеиновые кислоты, в настоящее время активно используется и для исследований белков, не имеющих природных комплексов с нуклеиновой кислотой. Метод можно применять как для работ с индивидуальными белками, так и в работе с культурами клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Tuerk C., Gold L.* (1990) *Science*, **249**, 505-510.
2. *Ellington A.D., Szostak J.W.* (1990) *Nature*, **346**, 818-822.
3. *Nimjee S.M., Rusconi C.P., Harriington R.A., Sullenger B.A.* (2005) *Trends Cardiovasc. Med.*, **15**, 41-45.
4. *Brody E.N., Gold L.* (2000) *J. Biotechnol.*, **74**, 5-13.
5. *Proske D., Blank M., Buhmann R., Resch A.* (2005) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69**, 367-374.
6. *Guo K.T., Schäfer R., Paul A., Ziemer G., Wendel H.P.* (2007) *Mini Rev. Med. Chem.*, **7**, 701-705.
7. *Shamah S.M., Healy J.M., Cload S.T.* (2008) *Acc. Chem. Res.*, **41**, 130-138.
8. *Копылов А.М., Спиридонова В.А.* (2000) *Молекулярная биология*, **34**, 1097-1113.
9. *Кульбачинский А.В.* (2006) *Успехи биологической химии*, **46**, 193-224.
10. *Радько С.П., Рахметова С.Ю., Бодоев Н.В., Арчаков А.И.* (2007) *Биомедицинская химия*, **53**, 5-24.
11. *Eyetechnology Group* (2002) *Retina*, **22**, 143-152.
12. *Eyetechnology Group* (2003) *Ophthalmology*, **110**, 879-881.
13. *Doudna J.A., Cech T.R., Sullenger B.A.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2355-2359.
14. *Lee S.W., Sullenger B.A.* (1997) *Nat. Biotechnol.*, **15**, 41-45.
15. *Rusconi C.P., Yeh A., Lysterly H.K., Lawso J.H., Sullenger B.A.* (2000) *Thromb. Haemost.*, **84**, 841-845.
16. *Rusconi C.P., Scardino E., Layzer J., Pitoc G.A., Ortel T.L., Monroe D., Sullenger B.A.* (2002) *Nature*, **419**, 90-94.
17. *White R.R., Sullenger B.A., Rusconi C.P.* (2000) *J. Clin. Invest.*, **106**, 929-934.
18. *Pagratitis N.C., Bell C., Chang Y.F., Jennings S., Fitzwater T., Jellinek D., Dang C.* (1997) *Nat. Biotechnol.*, **15**, 68-73.
19. *Green L.S., Jellinek D., Bell C., Beebe L.A., Feistner B.D., Gill S.C., Jucker F.M., Janjić N.* (1995) *Chem. Biol.*, **2**, 683-695.
20. *Jellinek D., Green L.S., Bel C., Lynott C.K., Gill N., Vargeese C., Kirschenheuter G., McGee D.P., Abesinghe P., Pieken W.A.* (1995) *Biochemistry*, **34**, 11363-11372.
21. *Willis M.C., Collins B.D., Zhang T., Green L.S., Sebesta D.P., Bell C., Kellogg E., Gill S.C., Magallanez A., Knauer S., Bendele R.A., Gill P.S., Janjić N.* (1998) *Bioconjug. Chem.*, **9**, 573-582.
22. *Aurup H., Siebert A., Benseler F., Williams D., Eckstein F.* (1994) *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4963-4968.
23. *Beigelman L., McSwiggen J.A., Draper K.G., Gonzalez C., Jensen K., Karpeisky A.M., Modak A.S., Matulic-Adamic J., DiRenzo A.B., Haerberli P.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 25702-25708.
24. *Serebryany V., Beigelman L.* (2003) *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **22**, 1007-1009.
25. *Tucker C.E., Chen L.S., Judkins M.B., Farmer J.A., Gill S.C., Drolet D.W.* (1999) *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **732**, 203-212.
26. *White R., Rusconi C., Scardino E., Wolberg A., Lawson J., Hoffman M., Sullenger B.* (2001) *Mol. Ther.*, **4**, 567-573.

27. *Rusconi C.P., Roberts J.D., Pitoc G.A., Nimjee S.M., White R.R., Quick G.Jr., Scardino E., Fay W.P., Sullenger B.A.* (2004) *Nat. Biotechnol.*, **22**, 1423-1428.
28. *Панченко Е.П., Добровольский А.Б.* (1999) В кн. Тромбозы в кардиологии. Механизмы развития и возможности терапии, Изд. "Спорт и культура", М., с. 55-74.
29. *Струкова С.М.* (2001) *Биохимия*, **66**, 8-18.
30. *Coughlin S.R.* (2000) *Nature*, **407**, 258-264.
31. *Bock L.C., Griffin L.C., Latham J.A., Vermaas E.H., Toole J.J.* (1992) *Nature*, **355**, 564-566.
32. *Wu Q., Tsiang M., Sadler J.E.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 24408-24412.
33. *Macaya R.F., Schultze P., Smith F.W., Roe J.A., Feigon J.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3745-3749.
34. *Paborsky L.R., McCurdy S.N., Griffin L.C., Toole J.J., Leung L.L.* (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 20808-20811.
35. *Wang K.Y., McCurdy S., Shea R.G., Swaminathan S., Bolton P.H.* (1993) *Biochemistry*, **32**, 1899-1904.
36. *Macaya R.F., Waldron J.A., Beutel B.A., Gao H., Joesten M.E., Yang M., Patel R., Bertelsen A.H., Cook A.F.* (1995) *Biochemistry*, **34**, 4478-4492.
37. *Tasset D.M., Kubik M.F., Steiner W.* (1997) *J. Mol. Biol.*, **272**, 688-698.
38. *Boncler M.A., Koziolkiewicz M., Watala C.* (2001) *Thromb. Research*, **104**, 215-222.
39. *Griffin L.C., Tidmarsh G.F., Bock L.C., Toole J.J., Leung L.L.K.* (1993) *Blood*, **81**, 3271-3276.
40. *Li W.X., Kaplan A.V., Grant G.W., Toole J.J., Leung L.L.K.* (1994) *Blood*, **83**, 677-682.
41. *Reyderman L., Stavchansky S.* (1998) *Pharmaceutical Research*, **15**, 904-910.
42. *Kubik M.F., Stephens A.W., Schneider D., Marlar R.A., Tasset D.* (1994) *Nucl. Acid Res.*, **22**, 2619-2626.
43. *Jeter M.L., Ly L.V., Fortenberry Y.M., Whinna H.C., White R.R., Rusconi C.P., Sullenger B.A.* (2004) *FEBS Lett.*, **568**, 10-14.
44. *Kumar P.K., Machida K., Urvil P.T., Kakiuchi N., Vishnuvardhan D., Shimotohno K., Taira K., Nishikawa S.* (1997) *Virology*, **237**, 270-282.
45. *Fukuda K., Vishnuvardhan D., Sekiya S., Hwang J., Kakiuchi N., Taira K., Shimotohno K., Kumar P.K., Nishikawa S.* (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 3685-3694.
46. *Hwang J., Fauzi H., Fukuda K., Sekiya S., Kakiuchi N., Shimotohno K., Taira K., Kusakabe I., Nishikawa S.* (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **279**, 557-562.
47. *Smith D., Kirschenheuter G.P., Charlton J., Guidot D.M., Repine J.E.* (1995) *Chem. Biol.*, **2**, 741-750.
48. *Charlton J., Kirschenheuter G.P., Smith D.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 3018-3026.
49. *Bless N.M., Smith D., Charlton J., Czermak B.J., Schmal H., Friedl H.P., Ward P.A.* (1997) *Curr. Biol.*, **7**, 877-880.
50. *Rosen L.S.* (2005) *Oncologist*, **10**, 382-391.
51. *Pierce E.A., Avery R.L., Foley E.D., Aiello L.P., Smith L.E.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 905-909.
52. *Kvanta A., Algvere P.V., Berglin L., Seregard S.* (1996) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **37**, 1929-1934.
53. *Holash J., Maisonpierre P.C., Compton D., Boland P., Alexander C.R., Zagzag D., Yancopoulos G.D., Wiegand S.J.* (1999) *Science*, **284**, 1994-1998.
54. *Ikebukuro K., Hasegawa H., Sode K.* (2007) *Nucleic Acids Symposium Series*, **51**, 399-400.
55. *Ruckman J., Green L.S., Beeson J., Waugh S., Gillette W.L., Henninger D.D., Claesson-Welsh L., Janjić N.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 20556-20567.
56. *Gragoudas E.S., Adamis A.P., Cunningham E.T. Jr., Feinsod M., Guyer D.R.* (2004) *N Engl. J. Med.*, **351**, 2805-2816.

57. Huang J., Moore J., Soffer S., Kim E., Rowe D., Manley C.A., O'Toole K., Middlesworth W., Stolar C., Yamashiro D., Kandel J. (2001) *J. Pediatr. Surg.*, **36**, 357-361.
58. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д., В кн. "Иммунология", М, "Мир", 2000, с. 210.
59. Jellinek D., Lynott C.K., Rifkin D.B., Janjić N. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11227-11231.
60. Heldin C.H. (1992) *EMBO J.*, **11**, 4251-4259.
61. Lindner V., Reidy M.A. (1995) *Am. J. Pathol.*, **146**, 1488-1497.
62. Green L.S., Jellinek D., Jenison R., Ostman A., Heldin C.H., Janjić N. (1996) *Biochemistry*, **35**, 14413-14424.
63. Floege J., Ostendorf T., Janssen U., Burg M., Radeke H.H., Vargeese C., Gil S.C., Green L.S., Janjić N. (1999) *Am. J. Pathol.*, **154**, 169-179.
64. Kubik M.F., Bell C., Fitzwater T., Watson S.R., Tasset D.M (1997) *J. Immunol.*, **159**, 259-267.
65. White R.R., Shan S., Rusconi C.P., Shetty G., Dewhirst M.W., Kontos C.D., Sullenger B.A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5028-5033.
66. Jeon S.H., Kayhan B., Ben-Yedidia T., Arnon R. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 48410-48419.
67. Gopinath S.C.B., Misono T.S., Kawasaki K., Mizuno T., Imai M., Odagiri T. (2006) *J. Gen. Virology*, **87**, 479-487.
68. Sullenger B.A., Gallardo H.F., Ungers G.E., Gilboa E. (1990) *Cell*, **63**, 601-608.
69. Bohjanen P.R., Colvin R.A., Puttaraju M., Been M.D., Garcia-Blanco M.A. (1996) *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3733-3738.
70. Sullenger B.A., Gallardo H.F., Ungers G.E., Gilboa E. (1991) *J. Virol.*, **65**, 6811-6816.
71. Yamamoto R., Katahira M., Nishikawa S., Baba T., Taira K., Kumar P.K. (2000) *Genes Cells*, **5**, 371-388.
72. Matsugami A., Tamura Y., Kudo M., Uesugi S., Yamamoto R., Kumar P., Katahira M. (2004) *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf)*, **48**, 111-112.
73. Lisiewicz J., Sun D., Smythe J., Lusso P., Lori F., Louie A., Markham P., Rossi J., Reitz M., Gallo R.C. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8000-8004.
74. Browning C.M., Cagnon L., Good P.D., Rossi J., Engelke D.R., Markovitz D.M. (1999) *J. Virol.*, **73**, 5191-5195.
75. Bahner I., Kearns K., Hao Q.L., Smogorzewska E.M., Kohn D.B. (1996) *J. Virol.*, **70**, 4352-4360.
76. Kohn D.B., Bauer G., Rice C.R., Rothschild J.C., Carbonaro D.A., Valdez P., Hao Q., Zhou C., Bahner I., Kearns K., Brody K., Fox S., Haden E., Wilson K., Salata C., Dolan C., Wetter C., Aguilar-Cordova E., Church J. (1999) *Blood*, **94**, 368-371.
77. Tuerk C., MacDougal S., Gold L. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6988-6992.
78. Jaeger J., Restle T., Steitz T.A. (1998) *EMBO J.*, **17**, 4535-4542.
79. Joshi P., Prasad V.R (2002) *J. Virol.*, **76**, 6545-6557.
80. Nevins J.R. (1992) *Science*, **258**, 424-429
81. Morishita R., Gibbons G.H., Horiuchi M., Ellison K.E., Nakama M., Zhang L., Kaneda Y., Ogihara T., Dzau V.J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5855-5859.
82. Ishizaki J., Nevins J.R., Sullenger B.A. (1996) *Nat. Med.*, **2**, 1386-1389.
83. Mann M.J., Gibbons G.H., Hutchinson H., Poston R.S., Hoyt E.G., Robbins R.C., Dzau V.J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6411-6416.
84. Mann M.J., Whittemore A.D., Donaldson M.C., Belkin M., Conte M.S., Polak J.F., Orav E.J., Ehsan A., Dell'Acqua G., Dzau V.J. (1999) *Lancet*, **354**, 1493-1498.
85. Ehsan A., Mann M.J., Dell'Acqua G., Dzau V.J. (2001) *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **121**, 714-722.
86. Martell R.E., Nevins J.R., Sullenger B.A. (2002) *Mol Ther.*, **6**, 30-34.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ УЗНАЮЩИЕ ЭЛЕМЕНТЫ – ДНК-/РНК-АПТАМЕРЫ К БЕЛКАМ

87. Verma I.M., Stevenson J.K., Schwarz E.M., Van Antwerp D., Miyamoto S. (1995) *Genes Dev.*, **9**, 2723-2735.
88. Morishita R., Sugimoto T., Aoki M., Kida I., Tomita N., Moriguchi A., Maeda K., Sawa Y., Kaneda Y., Higaki J., Ogihara T. (1997) *Nat. Med.*, **3**, 894-899.
89. Sawa Y., Morishita R., Suzuki K., Kagisaki K., Kaneda Y., Maeda K., Kadoba K., Matsuda H. (1997) *Circulation*, **96**, 280-284.
90. Tomita N., Morishita R., Tomita S., Gibbons G.H., Zhang L., Horiuchi M., Kaneda Y., Higaki J., Ogihara T., Dzau V.J. (2000) *Gene Ther.*, **7**, 1326-1332.
91. Lebruska L.L., Maher L.J. (1999) *Biochemistry*, **38**, 3168-3174.

Поступила: 24. 03. 2009.

MOLECULAR RECOGNITION ELEMENTS – DNA/RNA-APTAMERS TO PROTEINS

V.A. Spiridonova

AN Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology, MV Lomonosov Moscow State University,
Vorobievy Gory, 1, bld. 40, Moscow, 119992 Russia; tel.: (495)-9393149; fax: (495)-9393181;
e-mail: spiridon@belozersky.msu.ru

In this review summarizes data on DNA/RNA aptamers – a novel class of molecular recognition elements. Special attention is paid to the aptamers to proteins involved into pathogenesis of wide spread human diseases. These include aptamers to serine protease, to cytokines/growth factors, to influenza viral protein, nucleic acid binding proteins. Strong and specific binding for a given protein target of aptamers make them an attractive class of direct protein inhibitors. They can inhibit pathogenic proteins and it is becoming clear that aptamers have the potential to be a new and effective class of therapeutic molecules.

Key words: DNA/RNA aptamers, SELEX, proteins of blood coagulation, aptamers to cytokines/growth factors.