

ОБЗОРЫ

УДК 577.113.6

©Коллектив авторов

АПТАМЕРЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АФФИННЫЕ РЕАГЕНТЫ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРОТЕОМИКИ

С.П. Радько, С.Ю. Рахметова, Н.В. Бодоев, А.И. Арчаков*

Государственное учреждение Научно-исследовательский институт
биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва,
Погодинская ул., 10; тел.: (095) 246-16-41; факс (095) 246-37-71, 246-71-15;
эл. почта: radko@ibmc.msk.ru

Внедрение результатов протеомных исследований в научную и медицинскую практику будет во многом зависеть от прогресса технологий аффинных микрочипов, что определяет интерес к поиску более дешёвых альтернатив моноклональным антителам как аффинным реагентам. Среди синтетических миметиков антител олигонуклеотидные аптамеры представляют наибольший интерес как аффинные реагенты в силу возможности автоматизации метода их селекции и низкой себестоимости синтеза. В обзоре рассмотрен круг вопросов, связанных с автоматизацией и оптимизацией селекции аптамеров, и с селекцией фотоаптамеров, способных к образованию фотоиндуцированных ковалентных сшивок с белковыми мишенями. Обсуждаются существующие подходы к пост-селекционной модификации аптамеров для повышения их аффинности и селективности к белкам-мишеням.

Ключевые слова: аптамеры, фотоаптамеры, автоматизированная селекция, пост-селекционная модификация, аффинность, селективность.

ВВЕДЕНИЕ. В 1990 г. в двух публикациях, появившихся одновременно в журналах Nature [1] и Science [2], была впервые продемонстрирована возможность отбора в совокупности случайных нуклеотидных последовательностей олигонуклеотидов с высоким сродством к заданным молекулярным мишеням. В дальнейшем за ними закрепилось название “аптамеры” (от лат. *aptus* – соответствовать) [3, 4], а метод их селекции *in vitro* в библиотеках случайных олигонуклеотидных последовательностей получил известность как SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment [2]). Аптамеры представляют собой фрагменты однострессовой ДНК или РНК, обычно размером от

*Адресат для переписки

30 до 80 нуклеотидов (нт), образующие трёхмерные структуры в результате взаимодействия комплементарных участков цепи. Пространственное распределение заряженных фосфатных групп и неспаренных оснований образует уникальное распределение функциональных групп, способных к электростатическому и ван-дер-ваальсовым взаимодействиям и образованию водородных связей с соответствующими функциональными группами молекулярной мишени, что, по-видимому, и определяет способность аптамеров к специфическому связыванию [5-7]. За прошедшее годы были получены аптамеры к разнообразным мишеням. Если в начале мишени представляли различные низкомолекулярные соединения, пептиды и белки [6, 8], то в дальнейшем аптамеры были получены также к вирусным частицам [9, 10] и даже клеткам [11-13]. В настоящее время существуют две специализированные обновляемые базы данных: <http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/systems/selex> [14] и <http://aptamer.icmb.utexas.edu> [15], где представлены опубликованные последовательности аптамеров.

Интерес к аптамерам, в первую очередь, обусловлен потенциалом их использования как лекарственных средств [16-21]. За годы, прошедшие со времени появления первых публикаций, посвященных селекции аптамеров, в этой области достигнут заметный прогресс. В декабре 2004 г. первый лекарственный препарат на основе аптамера к фактору роста сосудистого эндотелия (VEGF, vascular endothelial growth factor) под коммерческим наименованием Macugen был разрешён в США к применению при склеротической дегенерации сетчатки (neovascular age-related macular degeneration) [www.fda.gov/cder/consumerinfo/druginfo/macugen.htm]. В США это заболевание является ведущей причиной развития слепоты (около 1,6 млн. случаев в настоящее время и, как ожидается, до 200 тыс. новых случаев ежегодно по мере увеличения среднего возраста популяции). Емкость рынка нового препарата, право на производство которого было приобретено фармацевтической корпорацией Pfizer, оценивается в 1,4 млрд. долларов [19]. Основой препарата служит полученный в 1994 г. модифицированный РНК-аптамер [22] (содержащий 2'-F-пиримидины и 2'-О-метил-пурины, для придания устойчивости к нуклеазам), конъюгированный с молекулой полиэтиленгликоля и эффективно ингибирующий связывание VEGF с рецептором. Два антикоагулянтных препарата на основе аптамеров к протеиназам, участвующим в процессе свертывания крови, а именно фактору IXa [www.regado-biosciences.com] и тромбину [www.archemix.com], прошли в США соответственно фазы I и II клинических испытаний. Противораковый препарат под рабочим названием AGRO100 (основу которого составляет аптамер к нуклеолину – белку, присутствующему на поверхности некоторых типов злокачественных клеток), разрабатываемый компанией Aptamera, успешно завершил прохождение фазы I клинических испытаний в США в 2005 г. [<http://drugresearcher.com/news/news-ng.asp?id=57175-antisoma-acquires-cancer>]. После “поглощения” Aptamera английской компанией Antisoma его клинические испытания продолжены в Великобритании.

Значительное число аптамеров с терапевтическим потенциалом, основанным на ингибировании функций белка-мишени при образовании комплекса аптамер/мишень, находятся на различных стадиях доклинических испытаний [17, 19-21]. Среди них аптамеры к белку gp120 оболочки ВИЧ-1 и гемагглюнину вируса гриппа, способные подавлять пролиферацию вирусов в клеточных культурах. Интересно, что анти-gp-120-РНК-аптамер связывается с консервативным участком белка, ответственным за взаимодействие с корецептором CCR5 и проникновение вируса в клетку. Для антител этот участок оказывается стерически закрытым прилегающими гипервариабельными областями [23]. Следует также отметить аптамеры к белкам, вовлеченным в клеточную трансдукцию, таким как мутантные варианты рецепторной тирозин киназы (предполагается, что именно эти мутантные варианты вовлечены в

развитие множественной эндокринной неоплазии и медуллярного рака щитовидной железы) и интегрин $\alpha V\beta 3$ (его сверхпродукция, как предполагают, связана с образованием меланом) [21]. Другую группу образуют аптамеры к белкам воспаления, среди которых такие экстраклеточные белки как эластаза нейтрофилов человека, тромбоцитарный фактор роста, селектины и ряд других [17].

Экстраклеточные белки, включая белки, экспонированные на клеточной поверхности, по-видимому, представляют наиболее перспективные мишени для терапевтического воздействия с использованием лекарственных препаратов на основе аптамеров. Внутриклеточные белки являются гораздо более сложными для воздействия мишенями. Это связано, в первую очередь, с проблемой эффективной доставки аптамеров внутрь клетки *in vivo*, которая, как и в случае с антителами, антисмысловой ДНК и siRNA, далека от своего решения [17, 19-21]. Предполагается, что это основная причина того, что клинические испытания аптамера к белку HIV-1 Rev показали его недостаточную эффективность *in vivo* [24]. Та же причина, скорее всего, привела к негативным результатам, которые вынудили компанию Corgentech прекратить дальнейшую работу над препаратом на основе аптамера к фактору транскрипции E2F (нацеленным на предупреждение послеоперационного отторжения при коронарном шунтировании) в ходе клинических испытаний [<http://investors.anesiva.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=200943>].

Белки, присутствующие на поверхности определённых типов клеток или появляющиеся на поверхности при трансформациях, в первую очередь злокачественных, могут также представлять перспективную мишень для направленной доставки лекарственных средств с помощью аптамеров. Ярким примером возможности использования аптамеров в таком качестве служит недавняя работа Farokhzad и соавт. [25], где модифицированный РНК-аптамер к белку PSMA (prostate specific membrane antigen) был конъюгирован с наносферами из биodeградируемого полимера, содержащими доцетаксел (docetaxel) – соединение, используемое в химиотерапии рака. На модели мышей с привитыми опухолями человека (путем инъекции клеток LNCaP – клеточной линии, полученной из злокачественно перерождённого эпителия предстательной железы), авторы установили, что однократная инъекция конъюгата аптамер-наносфера приводила к полной регрессии опухолей и 100% выживанию мышей за время наблюдения (109 дней), в то время как инъекция доцетаксела как в растворе, так и инкапсулированного в наносферы, вызывала только частичную регрессию опухоли, а доля выживших животных за тот же срок была соответственно 14% и 57% [25]. Следует отметить, что попытки использования антител для направленной доставки лекарств *in vivo* не были столь успешными.

Применение аптамеров в качестве “узнающих элементов” при конструировании аффинных биосенсоров и микрочипов (microarrays) представляет другую интересную область возможного приложения аптамеров. В настоящее время аффинные биосенсоры и микрочипы представлены в основном иммуносенсорами [26] и иммуночипами (antibody microarrays) [27], где в качестве “узнающего элемента” выступают иммобилизованные антитела. Иммуносенсоры известны уже более 30 лет [28], в то время как идея иммуночипов родилась около 10-лет назад [29], приблизительно в одно время с появлением ДНК-микрочипов [30]. В то время как ДНК-микрочипы продемонстрировали за это десятилетие впечатляющие технологический прогресс и коммерческий успех (коммерческие ДНК-микрочипы позволяют анализировать мутации, SNPs и уровень экспрессии одновременно для тысяч генов, а годовой объем продаж на рынке ДНК-микрочипов составляет несколько сотен миллионов долларов [31]), достижения в разработке и коммерциализации иммуночипов гораздо скромнее. В принципе, показана возможность создания микрочипов с расположенными на поверхности несколькими тысячами белковых микроячеек для изучения белок-белковых взаимодействий [32]. Доступные сегодня коммерческие иммуночипы позволяют детектировать до 100-200 антигенов в образце одновременно

(например, “Serum Biomarker Chip”, позволяющий определять 120 сывороточных белков и пептидов, среди которых общепринятые и перспективные онкомаркеры [www.schleicher-schuell.com], или “Panorame Ab Microarray – Cell Signaling” [www.sigma-aldrich.com], несущий 224 иммобилизованных антител). Однако разработка и коммерциализация иммуночипов сталкиваются с рядом трудностей, отсутствующих в случае ДНК-микрочипов. Среди них то, что иммобилизация антитела на поверхности микрочипа часто приводит к существенным потерям аффинности и требует тщательного подбора как условий иммобилизации, так и антител, приводя к значительно более высоким финансовым и временным затратам, чем в случае разработки ДНК-микрочипов. Кроме этого, производство моноклональных антител трудоемко и дорогостояще. Эти факторы приводят к существенному удорожанию конечного продукта. Можно ожидать, что прогресс в создании коммерческих микрочипов для одновременной детекции многих сотен или даже тысяч белков в биологических образцах (белковые профили [33]) будет в огромной степени определяться такими финансовыми ограничениями. Это стимулирует растущий интерес к альтернативным методам, которые могут сделать поиск и производство аффинных реагентов более производительными и менее дорогими. Среди них можно упомянуть такие технологии, как фаговые/рибосомные дисплей-библиотеки (phage and ribosomal display libraries) [34] и селекция/синтез аптамеров. Пока что использование аптамеров как синтетических миметиков антител для целей биоаффинного анализа не вступило в фазу практического применения, хотя появление аффинных биочипов на основе аптамеров возможно в ближайшем будущем. Компания SomaLogic (США), являющаяся наряду с компанией Archemix держателем патентов на технологии селекции аптамеров, планирует выйти на рынок с коммерческим предложением биочипов на основе аптамеров в 2007 г. [www.somallogic.com]. Наряду с SomaLogic, ряд других компаний и академических лабораторий ведут интенсивные научные исследования и конструкторские разработки в области создания и использования “аптасенсоров” и “аптачипов” [35]. Как ожидается, к концу десятилетия возможно появление первых коммерчески доступных аффинных биосенсоров на основе аптамеров [36].

Аптамеры, являясь нуклеиновыми кислотами, в силу своих физико-химических свойств и синтетического способа получения, обладают рядом преимуществ по сравнению с антителами при конструировании аффинных биосенсоров. К ним можно отнести: многообразие химических модификаций (например, способность образовывать фотоиндуцированные ковалентные сшивки с белковой мишенью), которые могут быть введены в олигонуклеотид как в процессе SELEX, так и после него; относительная легкость конъюгации в процессе синтеза с различными макромолекулами и молекулами с разнообразными физико-химическими свойствами, в том числе для целей иммобилизации аптамеров на рабочей поверхности сенсора и для детекции образования комплекса аптамер/мишень; способность к многократной денатурации-ренатурации без потери сродства к мишени; возможность относительно длительного хранения при комнатной температуре без потери свойств.

Дополнительно к уникальному набору физико-химических характеристик, которыми обладают аптамеры, процедура их селекции *in vitro* может быть автоматизирована. Последнее может оказаться одним из ключевых факторов для дальнейшего развития и последующего широкого внедрения аффинных микрочипов в практику. С этой точки зрения аптамеры как кандидаты на роль “узнающих элементов” представляют несомненно “выбор №1”. Одна роботизированная установка для получения аптамеров может, по оценкам одного из пионеров исследований в этой области, L. Gold [16], производить до 10 тыс. аффинных реагентов в год. Даже если такая оценка излишне оптимистична, автоматизированная селекция аптамеров, без сомнения, является сегодня единственным методом получения аффинных реагентов, отвечающая по

производительности потенциалу продукции рекомбинантных белков в постгеномную эру, причём с наименьшими относительными затратами.

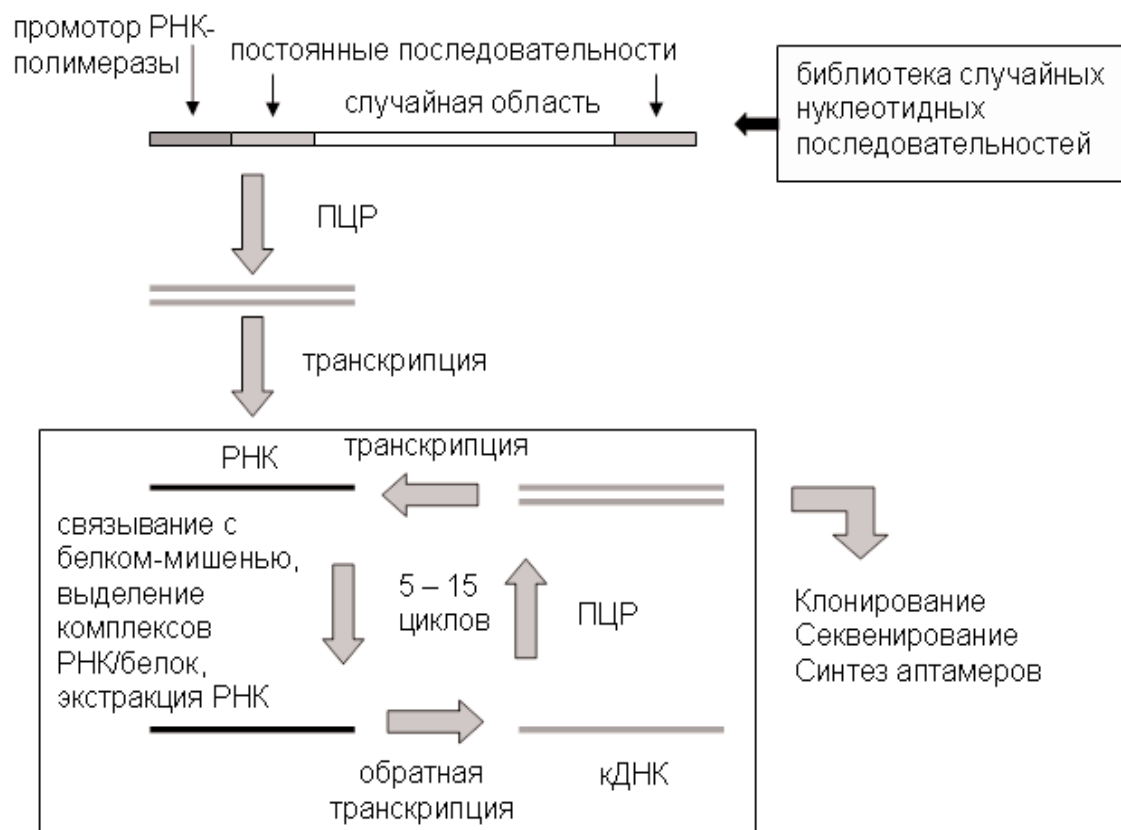
Использование фотоаптамеров, способных образовывать ковалентные сшивки со связавшимися белковыми мишенями при облучении длинноволновым ультрафиолетом (> 300 нм), позволяет создавать аффинные микрочипы, где связывание необратимо [16, 37-39]. Ожидается, что фотоиндуцированные сшивки могут привести к существенному усилению селективности при формировании необратимых комплексов аптамер/белок [16, 37]. Ковалентная природа связи фотоаптамер/мишень позволяет применять жесткие условия отмывки поверхности микрочипа, что, несомненно, усилит чувствительность детекции при прочих равных условиях [31, 37].

Принципы и детали SELEX, а также подходы к модификации получаемых аптамеров с целью придания им дополнительно желаемых свойств, подробно разобраны в ряде обзоров, в том числе опубликованных в отечественной научной периодике [40, 41]. Поэтому мы ограничимся лишь коротким описанием принципа селекции аптамеров *in vitro* и более подробно остановимся на работах, посвященных автоматизации селекции как подходе к высокопроизводительному и относительно дешёвому способу производства аффинных реагентов. Мы также подробно остановимся на методе селекции фотоаптамеров (photoSELEX), который не получал освещения в отечественной литературе, и на вопросах повышения аффинности и селективности аптамеров как предпосылки успеха аффинных биосенсоров и микрочипов на их основе.

1. Автоматизированный SELEX.

SELEX – метод селекции аптамеров *in vitro* – представляет собой многократно повторённый цикл (рис. 1). Цикл (раунд) включает связывание олигонуклеотидов с мишенью, выделение связавшейся фракции и её амплификацию. Полученные олигонуклеотиды, обладающие более высокой аффинностью к заданной мишени, чем исходные, вновь смешиваются с мишенью. Каждое последующее связывание происходит при постоянном понижении отношения количества (макро)молекул мишени к количеству добавленных олигонуклеотидов. Таким образом, каждый последующий раунд происходит в условиях возрастающей конкуренции за места связывания между олигонуклеотидами с более высокой средней аффинностью к мишени. Процесс повторяется, как правило, до тех пор, пока наблюдается заметное улучшение сродства олигонуклеотидов к мишени. Стартовым материалом является библиотека случайных нуклеотидных последовательностей, синтезируемая в условиях, обеспечивающих равновероятное присутствие каждого из четырёх нуклеотидов в любой позиции случайной области полинуклеотидной цепи. Случайная область, протяжённостью от 20 до 80 нт (чаще 30–60), фланкируется постоянными последовательностями (15-25 нт каждая), которые используются для посадки праймеров в процессе амплификации. В случае РНК-аптамеров 5'-концевая постоянная последовательность содержит дополнительно промотор РНК-полимеразы фага Т7. Обычно библиотека содержит 10^{13} – 10^{15} вариантов последовательностей. Результатом SELEX является субпопуляция олигонуклеотидов, представленная сотнями последовательностей, встречающихся с различной частотой (“поликлональные” аптамеры). Полученные фрагменты ДНК клонируют и секвенируют (как правило, несколько десятков клонов), с последующим анализом и группировкой последовательностей в семейства по степени гомологичности. После чего представителей каждого “семейства” синтезируют с помощью автоматизированного химического синтеза по известным последовательностям и характеризуют по аффинности к мишени, определяя K_D (“моноклональные” аптамеры).

А. Селекция РНК-аптамера



В. Селекция ДНК-аптамера

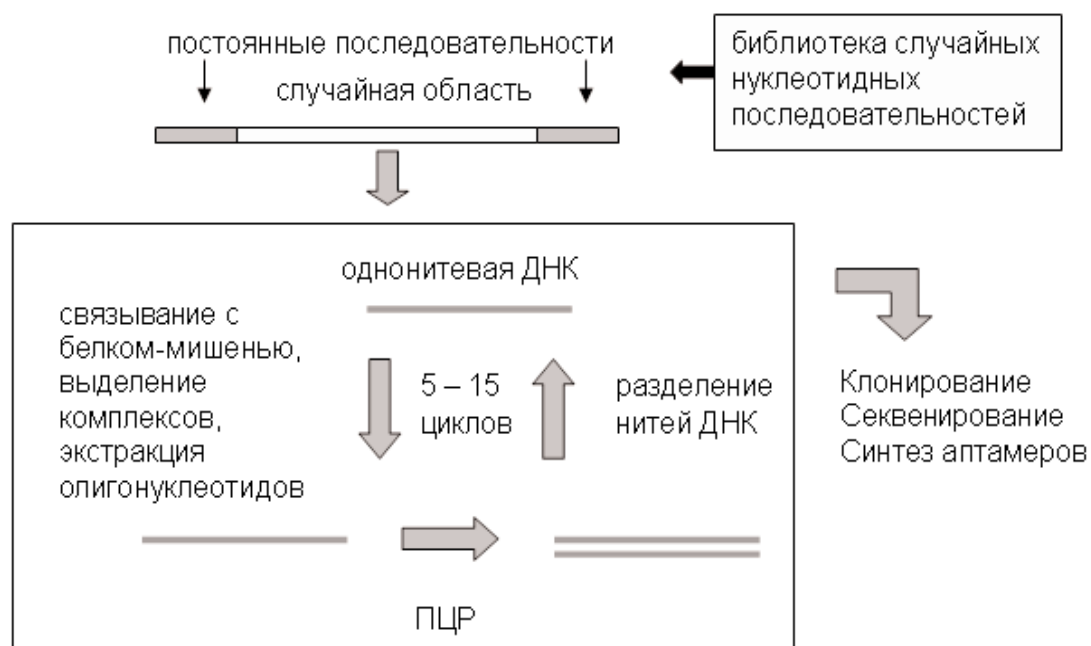


Рисунок 1.
Схемы селекции РНК- и ДНК-аптамеров.

Селекция аптамеров является трудоемким процессом и может занять от нескольких недель до нескольких месяцев [7, 42]. Однако в отличие от метода получения моноклональных антител, процедура SELEX не требует применения животных и сводится к повторяющемуся набору последовательных механических манипуляций. Основная часть манипуляций представляет добавление и отбор дозированных объемов различных растворов, что позволяет автоматизировать процесс в целом или частично. Две операции наиболее критичны с точки зрения автоматизации: 1) выделение обогащенной фракции олигонуклеотидов, связавшихся с мишенью; 2) выделение “смысловой”, то есть с аффинностью к мишени, цепи ДНК после амплификации при селекции ДНК-аптамеров или очистка РНК-олигонуклеотидов после транскрипции. Подход, который был положен в основу метода автоматизированной селекции аптамеров, основан на иммобилизации мишени на твердом носителе, что позволяет применить для выделения обогащенной фракции олигонуклеотидов со сродством к мишени аффинную хроматографию как в классическом “колоночном” формате [43], так и используя микросферы различного типа в комбинации с вакуумной фильтрацией или магнитосепарацией [44-47]. Аналогично, сорбция одной из цепей ДНК на микросферах, покрытых стрептавидином или авидином, достигаемая применением биотинилированного праймера при проведении ПЦР, была использована для разделения “аффинной” и комплементарной ей “неаффинной” цепей [44-47]. Такое разделение технологично и совместимо с автоматизацией процедуры SELEX. Другой подход [43] может быть основан на использовании асимметричной ПЦР, когда праймеры присутствуют в неэквивалентных количествах, в результате чего происходит преимущественное накопление одной из цепей [48].

Первая публикация, посвященная автоматизированной селекции *in vitro*, появилась в 2001 г., когда Cox и Ellington [44] описали протокол автоматизированной селекции РНК-аптамера к лизоциму. В последующем была выполнена автоматизированная селекция аптамеров к ряду других белков (синтетаза тРНК СУТ-18, белок-терминатор транскрипции Rho, MAP киназа, киназа человека MEK1, белок сплайсосомы U1A) [45, 46], пептиду (субстанция Р) [47] и органическому соединению (трихлорфеноксиуксусной кислоте) [43]. Во всех случаях основу автоматизированной установки для проведения SELEX составили роботизированные многоканальные дозаторы (Beckman Biomek 2000 [44-46], RoboAmp 4200E [47], TECAN MiniPrep [43]), интегрированные с многоканальными блоками вакуумной фильтрации или магнитосепарации и ДНК-амплификаторами. В отдельном случае роботизированная установка была дополнена флуоресцентным мультисканом, что позволило выполнять текущий контроль отношения мишень/олигонуклеотид в каждом раунде для оптимизации процесса SELEX [47]. Значения K_D полученных аптамеров лежали в пико-наномолярной области, что не уступает в среднем аффинности аптамеров, полученных “ручной” селекцией. Время, затраченное на получение аптамера при использовании автоматизированной селекции, было значительно короче по сравнению с “ручной” селекцией. Так, при получении аптамера к лизоциму 12 раундов селекции потребовали всего 2 суток работы робота [44].

Роботизированные многоканальные дозаторы, по-видимому, являются наиболее подходящим коммерчески доступным оборудованием для автоматизации селекции, позволяющим реализовывать разнообразные технологические схемы. Будучи ориентированными на работу с многолуночными микропланшетами, такие дозаторы позволяют создавать автоматизированные системы, способные в принципе проводить селекцию аптамеров ко многим мишеням одновременно. Эта возможность в комбинации с технологической непрерывностью процесса, скоростью манипуляций и относительно небольшими количествами используемых реагентов может действительно послужить основой высокопроизводительного автоматизированного метода получения аффинных реагентов.

Наряду с развитием систем для автоматизации селекции аптамеров на основе роботизированных платформ, недавно была продемонстрирована возможность автоматизации SELEX с использованием микрофлюидики [49]. Хотя селекция аптамера *per se* не была продемонстрирована, авторы показали возможность проведения в микромасштабе (рабочие объемы составляли ~ 1 мкл) этапов связывания олигонуклеотида с иммобилизованной мишенью, его элюцию, реакций обратной и прямой транскрипции и ДНК-амплификацию как непрерывный автоматизированный процесс [49]. Внедрение микрофлюидики в практику SELEX может привести к созданию компактных производительных и относительно недорогих автоматических установок, которые, в принципе, могут быть размещены в любой лаборатории, заинтересованной в генерировании аффинных реагентов с исследовательскими и практическими целями.

2. Фотоаптамеры.

Образование фотоиндуцированных сшивок между белками и нуклеиновыми кислотами в составе комплексов, где один или оба компонента комплекса несут фотоактивные хромофоры, давно известно [50] и широко использовалось и используется для структурных исследований нуклеопротеиновых комплексов [51]. Хромофоры, которые могут быть инкорпорированы в нуклеиновые кислоты, включают арилазиды, 8-азидогуанин и 8-азидoadенин, 4-тиоурацил, 5-йодоцитозин, 5-бромурацил и 5-йодурацил. Два последних получили наиболее широкое применение в практике научных исследований в виде 5-бром-дезоксимуридина и 5-йодуридина. При включении в нуклеотидные цепи, они способны образовывать ковалентные сшивки с рядом аминокислот (Trp, Tyr, His, Phe, Cys, Cys-Cys, Met, Thr) при облучении ультрафиолетом (УФ), если последние контактируют с указанными фотоактивными основаниями. При этом йод-замещенные основания характеризуются более высоким выходом сшивок по сравнению с бром-замещенными [51, 52], в то время как последние более фотостабильны в отсутствие доноров электронов при возбуждении УФ [51]. Следует также отметить, что одновременно с образованием фотосшивок происходит фотодеградация нуклеотидных цепей. Хорошо известно, что включение 5-Br-dU в цепочку ДНК приводит к возникновению УФ-индуцированных однонитевых разрывов [50, 51, 53].

Потенциальная способность олигонуклеотидов с модифицированными фотореактивными основаниями к фотосшивкам с белками была положена в основу получения фотоаптамеров – особого класса аптамеров, способных образовывать фотоиндуцированные ковалентные сшивки специфически, с белком-мишенью. Существует ряд подходов к получению таких аптамеров, среди которых, в первую очередь, следует отметить “photoSELEX” [54]. Фото-SELEX представляет вариант селекции аптамеров *in vitro*, где в библиотеке случайных олигонуклеотидных последовательностей, содержащих 5-Br-dU вместо dT, вместе с отбором по аффинности ведётся отбор по способности к образованию фотосшивок с белком-мишенью. Впервые процедура селекции фотоаптамеров была описана в работе Golden и соавт. [54], где в качестве мишени использовали bFGF (basic fibroblast growth factor, основной фактор роста фибробластов). Принципиально “фотоселекция” не отличается от процедуры SELEX, за исключением того, что раунды селекции по аффинности чередуются с раундами, где смесь аптамер/мишень подвергается воздействию УФ-излучения с длиной волны 308 нм с помощью эксимерного (XeCl) лазера. Основная методологическая проблема состояла в необходимости амплифицировать набор ДНК-олигонуклеотидов, находящихся в составе ковалентных комплексов с мишенью после облучения, чтобы отобрать среди аффинных олигонуклеотидов субпопуляцию, способную к образованию сшивок. Это было достигнуто комбинированием денатурирующего гель-электрофореза для разделения ковалентных и нековалентных комплексов аптамер/мишень с последующим перевариванием белковой составляющей комплекса протеиназой K. Как отмечают авторы [54], получаемые аддукты

оказались совместимыми с ПЦР при совместном использовании полимераз *Taq* и *Pwo*. Результатом “фотоселекции” были два аптамера к bFGF с $K_D = 16$ и 560 пМ и эффективностью сшивки соответственно 50 и 81%. Идентичный подход был использован в последующем для получения фотоаптамеров к белку gp120_{MN} HIV-1 [55]. Наилучший аптамер имел $K_D = 83$ нМ и эффективность фотосшивания 30%.

Несколько иной вариант получения фотоаптамеров был продемонстрирован Jensen и соавт. [56]. В этом случае отправной точкой для селекции послужил ранее полученный аптамер (РНК-аптамер к белку Rev вируса иммунодефицита человека), последовательность которого была частично рандомизирована, причём U был заменён на 5-I-U. Полученный набор олигонуклеотидных последовательностей был использован для процесса “фотоселекции”, аналогичного описанному выше. В результате были получены 52 последовательности, которые по степени гомологии образовывали 2 класса. Класс 1 имел K_D между 1 и 10 нМ и эффективность сшивания около 30%–40%, а класс 2 - $K_D = 30$ –50 нМ, а эффективность сшивания – 60%–70% [56].

Дополнительно к процедуре фото-SELEX, фотоаптамеры было предложено получать с помощью “пост-SELEX”-модификации: замене одного и более нуклеотидов (тимидина в ДНК- и уридина в РНК) на их фотоактивные аналоги в известной последовательности аптамера [57]. Такие замены могут быть сделаны рационально, но это требует знания структуры комплекса аптамер/белок-мишень. Они могут быть проведены также путём “перебора” всех возможных вариантов. Каждая модификация аптамера проверяется в отношении аффинности и эффективности фотосшивания. Однако в общем случае такой подход не обязательно приведёт к появлению фотоаптамера. Так, замены U на 5-I-U в РНК-аптамере к белку HIV-1 Rev не привели к появлению способности к фотоиндуцированному сшиванию [56]. В случае РНК-аптамеров к VEGF аналогичный подход хоть и сделал их способными к образованию фотосшивков, но за счёт драматической потери аффинности [58]. Тем не менее, существует и удачный пример: одна из замен тимидина на 5-I-dU в полинуклеотидной цепи ДНК-аптамера к тромбину привела к появлению желаемой фотоиндуцированной активности (эффективность фотосшивания около 40%), при этом аффинность к тромбину ($K_D = 0,5$ нМ) не изменилась [59]. Сохранение высокой аффинности явилось, по-видимому, результатом того, что радиусы йода и метильной группы близки (2,20 и 2,24 Å, соответственно).

Сильной стороной фотоаптамеров как потенциальных “узнающих элементов” аффинных биосенсоров и биочипов является то, что связывание мишени, происходящее на первом этапе как результат аффинного взаимодействия, дополняется образованием необратимого комплекса после облучения, что требует уникального взаиморасположения фотоактивного основания данного фотоаптамера и определённой аминокислоты белка. Таким образом, фотоаптамеры можно рассматривать как аффинные реагенты, потенциально обладающие селективностью, характерной для иммунохимических методов, где используется так называемый “сэндвич-формат”. Необратимый характер связывания фотоаптамер/мишень после облучения даёт возможность использовать “жесткие” условия отмывки рабочих поверхностей биочипов, включая применение детергентов и денатурантов (рис. 2). Эффективное и быстрое удаление молекул, связанных на поверхности неспецифически, а, значит, нековалентно, открывает путь к использованию на практике ряда методов с исключительно низким физическим порогом детекции (“молекулярные детекторы”, среди которых, в первую очередь, следует упомянуть сканирующую атомно-силовую микроскопию, криомассдетекторы, ближнепольную сканирующую оптическую микроскопию), способных регистрировать отдельные молекулы и их комплексы [60]. Это, в свою очередь, может понизить концентрационный порог детекции до значений ниже 10^{-15} М, что, как ожидается, позволит количественно детектировать в плазме/сыворотке крови специфические белковые маркёры, чья ассоциация с патологиями, в первую очередь, злокачественными, хорошо установлена сегодня на тканевом уровне [60].

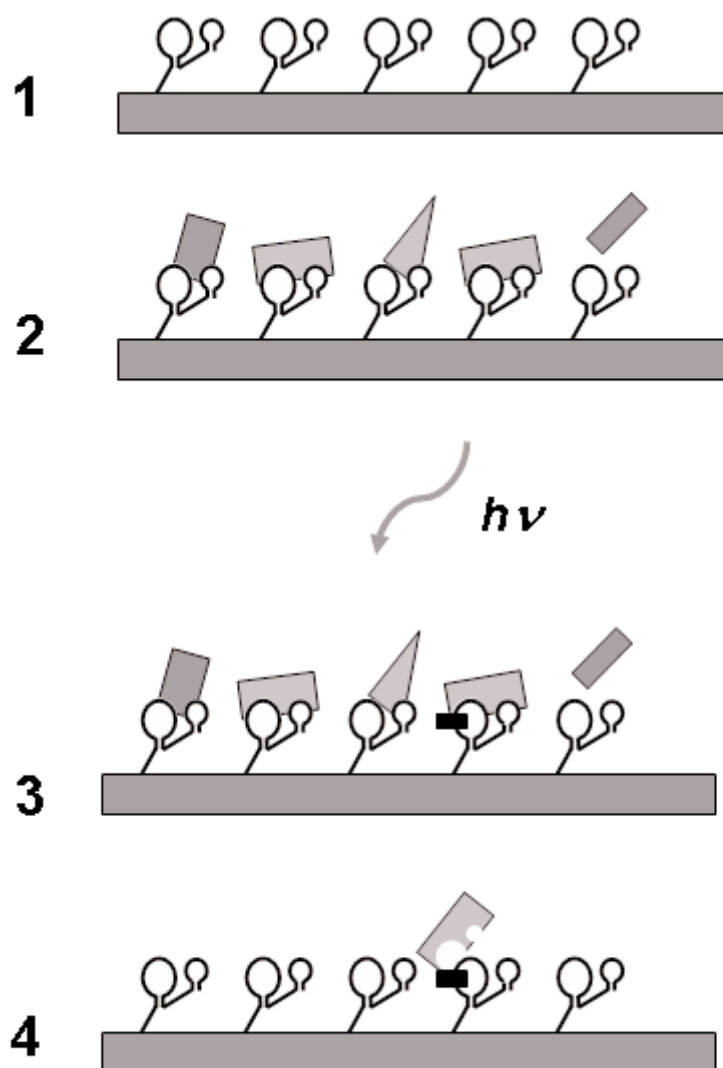


Рисунок 2.

Схематическое изображение использования фотоаптамеров для детекции белка-мишени в составе сложной белковой смеси. 1. иммобилизация фотоаптамера на поверхности микрочипа; 2. связывание белковых молекул сложной белковой смеси с иммобилизованным фотоаптамером; 3. облучение поверхности микрочипа УФ-излучением и образование ковалентных комплексов между молекулами-мишенями и частью фотоаптамеров; 4. удаление всех белковых молекул, связанных нековалентно.

Слабой стороной фотоаптамеров является их фотоиндуцированная деградация и, как следствие, полная или частичная потеря сродства к мишени. Так, Koch и соавт. [61] наблюдали появление олигонуклеотидов с более низким молекулярным весом при облучении смесей аптамер-мишень в растворе. 100% эффективность сшивки никогда не достигалась. По оценкам авторов [61], относительная скорость фотодегградации аптамеров в присутствии мишени составляла от 15 до 30% скорости фотосшивания. Следует, однако, отметить, что использованные в работе [61] фотоаптамеры (длиной 61 нт) имели в своём составе от 5 до 7 фотоактивных нуклеотидов (5-Br-dU) при том, что только один

фотоактивный нуклеотид в определённой позиции в составе аптамера, как правило, участвует в образовании сшивки [58, 59, 62]. Нельзя исключить, что сохранение такого фотоактивного нуклеотида с заменой всех остальных на их “неактивные” аналоги приведёт к существенному снижению скорости фотодеградаций. Использование в качестве фотоактивных нуклеотидов 5-I-dU вместо 5-Br-dU представляется в этом случае предпочтительнее, так как может снизить вероятность потери аффинности как результат такой “пост-photoSELEX” модификации (радиус брома 1,96 Å против 2,20 Å и 2,24 Å для соответственно, йода и метильной группы тимина).

3. Подходы к повышению аффинности и селективности аптамеров.

Возможность количественной и чувствительной детекции белка-мишени по комплексообразованию с аптамером в присутствии избыточного количества других белков определяется во многом как аффинностью аптамера к белку-мишени, так и его селективностью. Аффинность и селективность, таким образом, являются факторами, которые обуславливают, в первую очередь, перспективы аптамера как “узнающего элемента” биосенсора или биочипа. В то время как аффинность количественно выражают через равновесную константу связывания $K_B = 1/K_D$, где K_D – константа диссоциации комплекса аптамер/мишень, общепринятого количественного выражения селективности нет [63, 64]. В соответствии с определением, данным IUPAC, селективность выражает степень, в которой метод (в нашем случае – аффинный реагент) может распознавать определённую субстанцию в многокомпонентных смесях [www.iupac.org/publications/ci/2002/2401/pac-selectivity.html]. При этом специфичность понимается как предел селективности – то есть полное отсутствие каких-либо взаимодействий с компонентами смеси за исключением определяемой субстанции. Следует отметить, что в современной литературе, особенно биохимической, термины специфичность и селективность всё ещё используются как взаимозаменяемые.

В публикации, появившейся в 1999 г., Brody и соавт. [37] утверждают, что среди ста первых аптамеров к белковым мишеням, полученных в компании NeXstar Pharmaceuticals (первая биотехнологическая компания, чьей специализацией была селекция аптамеров *in vitro*), большинство имели K_D , значения которых лежали в интервале от 1 пМ до 1 нМ. Такая аффинность в среднем не уступает аффинности антител. Однако анализ аффинности аптамеров, чьи последовательности и константы диссоциации опубликованы (например, содержащиеся в базе данных на <http://aptamer.icmb.utexas.edu>), приводит к более скромной оценке. В среднем комплексы аптамер/мишень имеют K_D , значения которых лежат в наномолярном диапазоне. Причины такого расхождения не ясны, хотя, возможно, связаны с условиями отбора (оптимизация условий селекции, объем клонированных и скринированных в отношении уровня аффинности последовательностей). Тем не менее, аффинность известных аптамеров во многих случаях не отвечает тем требованиям, которые сегодня предъявляются к чувствительности и селективности аналитических тест-систем, используемых в биомедицинских исследованиях и клинической диагностике. Повышение селективности и аффинности, как думается, будут определяющими для успешного внедрения аптамеров как “узнающих элементов” биосенсоров и биочипов.

3.1. Оптимизация процедуры SELEX.

Одной из проблем, которая затрудняет селекцию высокоаффинных аптамеров в библиотеках случайных нуклеотидных последовательностей, является так называемая “тирания коротких мотивов” (“tyranny of short motives” [7]). Более короткие последовательности в нуклеотидной цепи, формирующие пространственные структуры с умеренной аффинностью к белку-мишени, могут “выиграть” при отборе в силу их большего относительного представительства. Так, 10-нуклеотидный мотив появится, к примеру, в 30-нуклеотидной случайной библиотеке около 1 раза на миллион, в то время как 20-нуклеотидный мотив – 1 раз на триллион. То есть последний должен обладать гораздо более высокой

аффинностью, чтобы связываться с мишенью в условиях возрастающей конкуренции в каждом последующем раунде и не быть утерянным после нескольких раундов селекции. Одной из иллюстраций “тирании коротких мотивов” является тот факт, что увеличение размера библиотеки при селекции аптамеров к той же мишени в тех же условиях приводило к отбору аптамеров с похожими нуклеотидными мотивами [7]. Другой иллюстрацией может служить результат Collett и соавт. [65]: в конечном наборе последовательность с наибольшей аффинностью к белку-мишени была обнаружена только один раз среди 80-ти секвенированных клонов, в то время как последовательность с меньшей аффинностью встретила 36 раз. Ещё одна проблема, затрудняющая селекцию высокоаффинных аптамеров, состоит в том, что ПЦР, которая является составной частью SELEX, может “смещать” выбираемую популяцию олигонуклеотидных последовательностей от оптимума по аффинности в сторону оптимального соотношения аффинности и “репликативности”. Высокая аффинность аптамера подразумевает конформационную стабильность, которая тесно связана с термостабильностью его дуплексных участков [5, 7]. Однако такие последовательности могут быть дискриминированы в пользу менее термостабильных ампликонов при проведении ПЦР [66].

Негативные эффекты “тирании коротких мотивов” и дискриминации более термостабильных последовательностей в процессе проведения SELEX можно минимизировать путем увеличения числа клонированных последовательностей, представленных в конечном олигонуклеотидном наборе, и путем оптимизации каждого раунда селекции, включая как условия проведения ПЦР, так и связывания мишени с олигонуклеотидами. Наряду с хорошо известным подходом, состоящим в добавлении в избыточных количествах к смеси олигонуклеотид/мишень неспецифически связывающихся и неамплифицирующихся нуклеотидных последовательностей, таких как тРНК, может потребоваться и подбор соотношения олигонуклеотид/мишень в каждом раунде, времени и температуры инкубации, условий разделения комплексов и свободных олигонуклеотидов. Всё перечисленное с очевидностью приведёт к резкому увеличению трудоемкости процедуры селекции. В принципе, автоматизация SELEX и использование высокопроизводительных автоматизированных систем клонирования, секвенирования и синтеза олигонуклеотидов делают возможным оптимизацию SELEX в короткие сроки, даже если это потребует варьирования условий селекции в весьма широком диапазоне и последующего широкомасштабного клонирования для выявления последовательностей, представленных в конечном наборе с низкой частотой. Скрининг получаемых последовательностей в отношении аффинности к мишени может быть выполнен с использованием микрочипов [65] или многоканальных биосенсоров. Однако, очевидно, что такая масштабная оптимизация селекции потребует как крупных начальных инвестиций в создание инструментальной базы, так и больших текущих расходов на поддержание работы оборудования и проведение экспериментов.

Интересный подход к оптимизации селекции аптамеров *in vitro* основан на фракционировании олигонуклеотидов, освобождающихся в процессе неравновесной диссоциации комплексов олигонуклеотид/мишень. Идея подхода состоит в том, что фракция олигонуклеотидов, чьё взаимодействие с мишенью характеризуется меньшими константами скорости диссоциации, содержит аптамеры с более высокой аффинностью. Впервые этот подход был реализован в серии работ, где SELEX проводили с использованием капиллярного электрофореза (КЭ) для фракционирования комплексов белок/олигонуклеотид [67-70]. Успех подхода во многом определяется эффективностью разделения комплексов и свободных олигонуклеотидов и белковых мишеней. КЭ, являясь высокоэффективным методом разделения макромолекул в растворе, представляет в этом отношении уникальную возможность, позволяя проводить отбор аптамеров к мишени в растворе. Комплекс, находящийся в растворе в условиях равновесия

со свободными олигонуклеотидами и мишенью, в процессе электрофоретического разделения переходит в условия неравновесной диссоциации в силу различной скорости электрофоретической миграции комплекса и его компонентов. Варьирование времени разделения и сбор определённых фракций зоны миграции комплекса дают возможность отбора аптамеров с заранее заданными кинетическими и равновесными параметрами связывания [67-70]. При количестве раундов в 3-4 раза меньшем по сравнению с традиционной процедурой SELEX, были получены ДНК-аптамеры к IgE [67], нейропептиду Y [68], фарнезилтрансферазе (farnesyltransferase) [69] и белку MutS [70] с K_D , лежащими в наномолярной области. Недавно этот подход получил дальнейшее развитие [71]: оказалось, что три последовательных разделения смеси “случайная ДНК-библиотека/белок-мишень” с помощью капиллярного электрофореза могут улучшить среднюю аффинность набора олигонуклеотидов на 4 порядка без амплификации ДНК. Вся процедура заняла менее 1 ч и может быть выполнена в автоматическом режиме на коммерчески доступных установках (оборудованных флуоресцентным детектором) для капиллярного электрофореза.

Подход, основанный на неравновесной диссоциации комплексов олигонуклеотид/белок-мишень, может быть реализован также на проточных биосенсорах типа *Biacore* [72], где белковая мишень иммобилизуется на поверхности проточной ячейки. Авторы [72], используя библиотеку случайных олигонуклеотидных последовательностей, полученную путём частичной рандомизации отобранного ранее РНК-аптамера, получили новый аптамер к гемагглютинуину вируса гриппа с большей аффинностью (K_D уменьшилась с 200 пМ до 115 пМ). *Biacore* позволяет проводить мониторинг кинетики образования и неравновесной диссоциации комплекса олигонуклеотид/мишень в реальном времени на основе физического явления, известного как поверхностный плазмонный резонанс, что не требует предварительного мечения олигонуклеотидов или мишени. Фракции олигонуклеотидов, диссоциирующих в определённые временные интервалы, могут быть собраны, амплифицированы и использованы в следующем раунде селекции, делая в принципе возможным отбор аптамеров с желаемыми кинетическими и равновесными параметрами связывания, причём характерных для них в иммобилизованном состоянии.

Многоканальные проточные биосенсоры, такие как “FlexChip” компании *Biacore*, позволяющие проводить одновременно до 400 измерений кинетических характеристик связывания/диссоциации, могут быть также использованы для широкомасштабного улучшения селективности аптамеров в результате молекулярной эволюции. Взяв за основу набор “поликлональных” аптамеров, полученных в ходе проведения SELEX, можно генерировать больший набор олигонуклеотидных последовательностей, используя случайную рекомбинацию и мутацию *in silico* с помощью комбинаторных методов, подобных EMA (evolution-mimicking algorithm). Характеризуя полученные олигонуклеотиды по способности узнавать белок-мишень в сложных смесях (например, в присутствии сыворотки крови), можно отобрать лучшие и повторить цикл. Такой итерационный процесс был недавно успешно использован для улучшения способности тромбинового ДНК-аптамера ингибировать тромбин [73]. При проведении SELEX отбор происходит, как известно, по возрастающей способности олигонуклеотидов к связыванию с определённой белковой мишенью, что не обязательно характеризует их как обладающих ингибиторной способностью или достаточной селективностью.

3.2. Модифицированные аптамеры.

Как альтернативный подход к улучшению аффинности рассматривалась возможность проведения “пост-SELEX”-модификаций, которые могли бы стабилизировать конформацию аптамера [5, 7]. Было предложено стабилизировать третичную структуру введением ковалентных линкеров, связывающих комплементарные участки коротких дуплексов. Однако, несмотря на многообразие

химических модификаций, предложенных для формирования линкеров [7], примеры их практического применения для увеличения сродства олигонуклеотидов к белкам единичны, а результаты с точки зрения повышения аффинности не однозначны. Можно отметить работу Nelson и соавт. [74], которые показали, что 22-мерный олигорибонуклеотид, представляющий последовательность, известную как *RBE* (*HIV-1 Rev Binding Element*), если стабилизирован стильбендиамидным линкером, связывающим 5'- и 3'-концы его концевой дуплексной участка, имеет практически такое же сродство к Rev-белку, как и включающий его 94-мерный фрагмент региона генома ВИЧ-1, ответственного за связывание белка *Rev* (*Rev Responsive Element*). В тоже время, “кэпирование” концевой дуплекса ДНК-аптамера к тромбину соединениями, способными к образованию дисульфидной связи, либо его стабилизация путём введения линкера, основу которого составил триэтиленгликоль [75], не привело к однозначным результатам, подтверждающим возрастание ингибиторной активности как следствия увеличения конформационной стабильности. Попытка стабилизировать пространственную структуру аптамера к тенасину С (*Tenascin-C*) путем включения LNA (*Locked Nucleic Acids*) в состав дуплексных участков [76] (LNA/LNA дуплексы обладают исключительно высокой термостабильностью [77]) привело к потере в аффинности. По-видимому, стерические эффекты, связанные с замещением РНК на LNA, воспрепятствовали эффективному связыванию модифицированного аптамера с мишенью.

Использование фотоаптамеров рассматривалось как один из возможных подходов к улучшению селективности [17, 37]. Действительно, требование, что фотоактивное основание и определённая аминокислота должны находиться в непосредственной близости, а, возможно, и в определённой взаимной ориентации, для возникновения ковалентной сшивки, даёт основание ожидать, что формирование фотоиндуцированного необратимого комплекса фотоаптамер/белок-мишень будет происходить специфично. Однако результаты работы Smith и соавт. [55] выявили более сложную картину, показывающую, что вышеприведённое утверждение не является общим. Все три фотоаптамера, использованные в работе [55] (один к белку HIV-1 gp120_{MN}, два – к bFGF), образовывали как обратимые, так и необратимые комплексы с белками, гомологичными белкам-мишеням (HIV-1 gp120_{SF2} и aFGF, acidic FGF, кислый фактор роста фибробластов), с тромбином (белок с высоким неспецифическим сродством к полианионам) и с PDGF (*platelet derived growth factor*, фактор роста тромбоцитов), известным высоким неспецифическим сродством к ДНК. Для двух аптамеров эффективность образования необратимых комплексов с этими белками по отношению к белкам-мишеням была ниже, чем в случае обратимых комплексов, что говорит об увеличении селективности. В тоже время, один из аптамеров к bFGF, продемонстрировал ухудшение эффективности образования необратимых комплексов с aFGF и тромбином по сравнению с обратимыми комплексами. Это указывает на необходимость более детального (и, как результат, более трудоемкого) скрининга клонов фотоаптамеров на заключительном этапе “фотоселекции” при отборе кандидатов для использования в биочипах, ориентированных на работу со сложными многокомпонентными биологическими образцами, такими как сыворотка/плазма крови.

3.3. Аптамерные конструкции.

Принципиально иной подход к повышению аффинности был продемонстрирован в ряде работ, где авторы объединяли несколько аптамеров в одну молекулярную конструкцию [78-83]. При образовании комплекса между мишенью и такой конструкцией возможно возникновение нескольких молекулярных контактов. Каждый из молекулярных контактов, возникающий при образовании комплекса, даёт свой вклад в суммарную свободную энергию взаимодействия. Вследствие экспоненциальной зависимости между свободной энергией и константой диссоциации, комплекс с несколькими молекулярными

контактами значительно стабильнее комплекса, образованного за счёт одного контакта. Создание молекулярных конструкций из двух и более аптамеров делает, таким образом, возможным получение аффинных реагентов с высоким сродством к мишени из аптамеров умеренной аффинности.

К настоящему времени апробированы три подхода к созданию аптамерных конструкций: (1) два одинаковых или различных аптамера к одной белковой мишени соединялись непосредственно друг с другом посредством гибких линкеров как нуклеотидной [83], так и ненуклеотидной [78-80] природы; (2) аптамеры присоединялись к “остову”, представляющему ДНК-дуплекс, за счёт гибких линкеров [81]; (3) аптамеры являлись частью “жестких” аптамерных конструкций, остовом которых выступают ДНК-дуплексы [82]. Последний подход тесно примыкает к наметившемуся в конце 90-х новому направлению, известному как “структурная ДНК-нанотехнология” (structural DNA nanotechnology) [84, 85], в рамках которой разрабатываются (в числе прочих) методы создания упорядоченных трехмерных наноструктур из ДНК-олигонуклеотидов. Это достигается путём использования определенных комплементарных мотивов и “липких” концов, позволяющих проводить направленную сборку сложных пространственных структур из “олигонуклеотидных блоков”.

В качестве гибких линкеров ненуклеотидной природы использовали либо молекулу глицерина [78, 79], либо гексаэтиленгликоля [78, 80], что, скорее всего, определено доступностью таких линкеров как коммерческих фосфоамидитов, делая возможным их введение в нуклеотидную цепь в процессе синтеза. Аффинность гомодимеров была от 2-х до 66-ти раз выше аффинности составляющих их аптамеров [78-80]. По-видимому, для каждого случая существуют как оптимальная длина линкера, так и оптимальный способ формирования аптамерной конструкции [78, 79]. Степень усиления сродства также зависела от того, происходило ли взаимодействие с мишенью в растворе или с мишенью, находящейся (иммобилизованной) на поверхности той или иной природы. Так, аптамерная конструкция, образованная с помощью 3'-3'-концевого гексаэтиленгликолевого линкера из двух анти-L-селектин-аптамеров, узнающими как свободный, так и экспонированный на поверхности лейкоцитов L-селектин, показала 10- и 18-кратное улучшение сродства к лимфоцитам и нейтрофилам, соответственно, в то время как её сродство к свободному L-селектину ($K_D = 0,8$ нМ) не менялось по сравнению с исходным аптамером ($K_D = 0,7$ нМ) [80].

Аптамеры в составе гомодимеров, очевидно, конкурируют за одно и то же место связывания на мишени – то есть в каждый момент мишень и гомодимер могут иметь только один молекулярный контакт, либо гомодимер может быть в комплексе с двумя мишенями одновременно. В недавней публикации Umebara и соавт. [83] были исследованы гетеродимеры, состоящие из двух аптамеров, узнающих разные места белковой мишени. РНК-аптамеры к соответственно протеазному и геликазному доменам белка NS3 вируса гепатита С объединялись в единую последовательность с помощью рU-цепочек. Среди полученных гетеродимеров два наиболее эффективных ингибировали как протеазную, так и геликазную активности в 4-5 раза лучше (отношение IC_{50}), чем исходные аптамеры. Хотя IC_{50} и K_D не обязательно взаимосвязаны, в случае димеров большая ингибиторная активность отражает, скорее всего, более высокую аффинность. Например, в случае гомодимера, состоящего из аптамеров к Taq-полимеразе, возрастанию ингибиторной активности в 11 раз (IC_{50} уменьшалась от 152 нМ для аптамера до 14 нМ для димера) соответствовало 66-кратное уменьшение K_D [79].

Аптамерные конструкции, включающие более двух аптамеров, были собраны с использованием ДНК-дуплекса, изначально не являвшегося частью аптамера, как остова для их крепления. Тетрамер, состоящий из РНК-аптамеров к CTLA-4 (cytotoxic T-cell antigen-4 – клеточный рецептор, участвующий в активации Т-лимфоцитов) [81], был сконструирован за счёт спаривания

последовательности, добавленной с 5'-конца к последовательности РНК-аптамера ("липкие" концы), с комплементарными участками, фланкирующими ДНК-дуплекс. Размер дуплекса был подобран так, что бы расположить каждый из двух аптамеров в тетрамере в одной плоскости на расстоянии ~7 нм друг от друга, позволяя, таким образом, потенциально связываться с двумя молекулами CTLA-4. Полученный "тетраптамер" был в 20 раз более эффективен в ингибировании функций CTLA-4 *in vitro* (оценивалось по скорости пролиферации Т-клеток в культуре), чем соответствующий "мономер" [81].

Можно ожидать, что жестко фиксированное пространственное взаиморасположение "сайтов узнавания" в аптамерной конструкции, которое, тем не менее, позволяет им независимо и одновременно взаимодействовать с соответствующими участками поверхности белковой мишени, приведёт к гораздо более существенному возрастанию аффинности, чем в случае использования гибких линкеров. В качестве иллюстрации можно указать на РНК-аптамер к Tat-белку HIV-1 (ответствен за активацию транскрипции путем связывания с определенным участком генома вируса, известным как trans-activation response region, TAR-1), который содержит инвертированные повторы с нуклеотидными последовательностями, сходными с TAR-1 [86]. В результате образуются две боковые петли на жестком РНК-дуплексе, структура которых сходна со структурой TAR-1 элемента и которые могут одновременно взаимодействовать с двумя аргининовыми остатками на поверхности Tat-белка [87]. Аффинность такого аптамера оказалась более чем на 2 порядка выше, чем аффинность TAR-1 элемента (K_D соответственно 120 пМ и 16 нМ). Однако, несмотря на привлекательность идеи, попытка создания высокоаффинных "жестких" аптамерных конструкций, комбинируя известные аптамеры, пока имела ограниченный успех. Di Guisto и King [82] собрали гомодимеры и гомотетрамеры аптамеров к фибриноген-связывающему экзосайту тромбина путём введения "липких концов", фланкирующих аптамерные последовательности, с последующим лигированием разрывов для придания конструкции топологической жесткости и дополнительной стабильности (T_m увеличивалась более чем на 20°C). Хотя полученные конструкции обладали повышенной способностью ингибировать тромбин, увеличение не было столь высоким, как можно было бы надеяться (IC_{50} уменьшалась с 19 нМ до 6-7 нМ).

Создание аптамерных конструкций, способных к одновременному образованию множественных молекулярных контактов с белковой мишенью, требует аптамеров, узнающих различные участки поверхности белка-мишени. Можно указать несколько подходов к селекции таких аптамеров. Например, селекцию можно проводить в условиях, где различные области поверхности белковой молекулы по-разному доступны олигонуклеотидам. Так, Vock и соавт. [4] получили аптамер, узнающий фибриноген-связывающий экзосайт тромбина, в то время как Tasset и соавт. [59] получили аптамер, узнающий гепарин-связывающий экзосайт. В первом случае SELEX проводили, используя тромбин, иммобилизованный на агарозных гранулах, покрытых конканавалином А, во втором, – используя тромбин в растворе, с последующей сорбцией комплексов олигонуклеотид/белок на нитроцеллюлозных фильтрах. Другой подход – получение аптамеров к пептидам, представляющим различные регионы белка-мишени (по аналогии с получением антител к белкам с помощью пептидных фрагментов), или к структурно-функциональным доменам белка, полученным генно-инженерными методами. Xu и Ellington [88] получили аптамер к пептидному фрагменту белка Rev HIV-1, который связывался с самим белком, хотя и с меньшей аффинностью. Используя рекомбинантный белок NS3 вируса гепатита С, который состоит из двух доменов – с протеазной и геликазной активностями, и рекомбинантный белок, представляющий только "геликазный домен" NS3, были получены аптамеры, избирательно связывающиеся с данными доменами [89, 90]. Пары аптамеров, узнающих различные регионы на поверхности

белка-мишени, предложено также получать с помощью “двухшаговой селекции”: первый шаг состоит в получении аптамера, используя SELEX, а второй – проводя SELEX в присутствии насыщающих концентраций первого аптамера [91].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Аптамеры представляют новый класс синтетических аффинных реагентов, получение которых возможно с помощью автоматизированной процедуры селекции *in vitro*, чья потенциальная производительность оставляет далеко позади все известные на сегодня технологии генерации моноклональных антител и их миметиков. Хотя процедура SELEX имеет ряд недостатков, существует очевидный потенциал для их преодоления. Можно ожидать, что повышение в среднем аффинности отбираемых аптамеров произойдёт либо за счёт экстенсивной оптимизации селекции в сочетании с автоматизацией, либо за счёт рационального контроля кинетики диссоциации комплексов олигонуклеотид/мишень. Появление метода селекции фотоаптамеров, способных к образованию ковалентных комплексов аптамер/мишень, делает возможным создание аффинных биосенсоров и микрочипов, где связывание мишени с “узнающим элементом” может быть необратимым. В силу физико-химических свойств нуклеиновых кислот и потенциала современного автоматизированного химического синтеза олигонуклеотидов, аптамерные последовательности могут быть модифицированы для получения молекулярных конструкций с новыми свойствами или большим сродством к мишеням, что является предпосылкой появления “наноинженерного” подхода к созданию аффинных реагентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ellington A.D., Szostak J.W. (1990) *Nature*, **346**, 818-822.
2. Tuerk C., Gold L. (1990) *Science*, **249**, 505-510.
3. Ellington A.D., Szostak J.W. (1992) *Nature*, **355**, 850-852.
4. Bock L.C., Griffin L.C., Latham J.A., Vermaas E.H., Toole J.J. (1992) *Nature*, **355**, 564-566.
5. Eaton B.E., Gold L., Zichi D.A. (1995) *Chem. Biol.*, **2**, 633-638.
6. Patel D.J., Suri A.K. (2000) *J. Biotechnol.*, **74**, 39-60.
7. Osborne S.E., Ellington A.D. (1997) *Chem. Rev.*, **97**, 349-370.
8. Wilson D.S., Szostak J.W. (1999) *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 11-47.
9. Pan W., Craven R.C., Qiu Q., Wilson C.B., Wills J.W., Golovine S., Wang J.F. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11509-11513.
10. Wang J., Jiang H., Liu F. (2000) *RNA*, **6**, 571-583.
11. Wang C., Zhang M., Yang G., Zhang D., Ding H., Wang H., Fan M., Shen B., Shao N. (2003) *J. Biotechnol.*, **102**, 15-22.
12. Daniels D.A., Chen H., Hicke B.J., Swiderek K.M., Gold L. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15416-15421.
13. Blank M., Weinschenk T., Priemer M., Schluesener H. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 16464-16468.
14. Ponomarenko J.V., Orlova G.V., Ponomarenko M.P., Lavryushev S.V., Frolov A.S., Zybova S.V., Kolchanov N.A. (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, 205-208.
15. Lee J.F., Hesselberth J.R., Meyers L.A., Ellington A.D. (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, 95-100.
16. Brody E.N., Gold L. (2000) *J. Biotechnol.*, **74**, 5-13.
17. Nimjee S.M., Rusconi C.P., Sullenger B.A. (2005) *Annu. Rev. Med.*, **56**, 555-583.
18. Sun S. (2000) *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **2**, 100-105.
19. Thiel K. (2004) *Nature Biotechnol.*, **22**, 649-651.
20. Mayer G., Jenne A. (2004) *Biodrugs*, **18**, 351-359.
21. Lee J.F., Stovall G.M., Ellington A.D. (2006) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **10**, 282-289.
22. Jellinek D., Green L.S., Bell C., Janjic N. (1994) *Biochemistry*, **33**, 10450-10456.

23. Dey A.K., Khati M., Tang M., Wyatt R., Lea S.M., James W. (2005) *J. Virol.*, **79**, 13806-13810.
24. 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.
25. Farokhzad O.C., Cheng J., Teply B.A., Sherifi I., Jon S., Kantoff P.W., Richie J.P., Langer R. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 6315-6320.
26. Stefan R.I., van Staden J.F., Aboul-Enein H.Y. (2000) *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366**, 659-668.
27. Pavlickova P., Schneider E.M., Hug H. (2004) *Clin. Chim. Acta*, **343**, 17-35.
28. Aizawa M., Morioka A., Suzuki S., Nagamura Y. (1979) *Anal. Biochem.*, **94**, 222-228.
29. Ekins R., Chu F. (1997) *J. Int. Fed. Clin. Chem.*, **9**, 100-109.
30. Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. (1995) *Science*, **270**, 467-470.
31. Mitchell P. (2002) *Nat. Biotechnol.*, **20**, 225-229.
32. Zhu H., Bilgin M., Bangham R., Hall D., Casamayor A., Bertone P., Lan N., Jansen R., Bidlingmaier S., Houfek T., Mitchell T., Miller P., Dean R.A., Gerstein M., Snyder M. (2001) *Science*, **293**, 2101-2115.
33. Арчаков А.И. (2000) *Вопр. мед. химии*, **46**, 335-343.
34. Li M. (2000) *Nat. Biotechnol.*, **18**, 1251-1256.
35. Deisingh A.K. (2006) *Handb. Exp. Pharmacol.*, **173**, 341-357.
36. O'Sullivan C.K. (2002) *Anal. Bioanal. Chem.*, **372**, 44-48.
37. Brody E.N., Willis M.C., Smith J.D., Jayasena S., Zichi D., Gold L. (1999) *Mol. Diagn.*, **4**, 381-388.
38. Bock C., Coleman M., Collins B., Davis J., Foulds G., Gold L., Greef C., Heil J., Heilig J.S., Hicke B., Hurst M.N., Husar G.M., Miller D., Ostroff R., Petach H., Schneider D., Vant-Hull B., Waugh S., Weiss A., Wilcox S.K., Zichi D. (2004) *Proteomics*, **4**, 609-618.
39. Petach H., Gold L. (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 309-314.
40. Власова И.Е., Власов В.В. (1993) *Мол. биология*, **27**, 5-13.
41. Копылов А.М., Спиридонова В.А. (2000) *Мол. биология*, **34**, 1097-1113.
42. Jayasena S.D. (1999) *Clin. Chem.*, **45**, 1628-1650.
43. Zhang H., Hamasaki A., Toshiro E., Aoyama Y., Ito Y. (2000) *Nucleic Acids Symp Ser.*, **44**, 219-220.
44. Cox J.C., Ellington A.D. (2001) *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 2525-2531.
45. Cox J.C., Rajendran M., Riedel T., Davidson E.A., Sooter L.J., Bayer T.S., Schmitz-Brown M., Ellington A.D. (2002) *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **5**, 289-299.
46. Cox J.C., Hayhurst A., Hesselberth J., Bayer T.S., Georgiou G., Ellington A.D. (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**, 108-121.
47. Eulberg D., Buchner K., Maasch C., Klussmann S. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, 45-54.
48. Gyllensten U.B., Erlich H.A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7652-7656.
49. Hybarger G., Bynum J., Williams R.F., Valdes J.J., Chambers J.P. (2006) *Anal. Bioanal. Chem.*, **384**, 191-198.
50. Taichman L.B. (1979) *Nucleic Acids Res.*, **6**, 2029-2038.
51. Meisenheimer K.M., Koch T.H. (1997) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **32**, 101-140.
52. Willis M.C., Hicke B.J., Uhlenbeck O.C., Cech T.R., Koch T.H. (1993) *Science*, **262**, 1255-1257.
53. Hutchinson F. (1973) *Q. Rev. Biophys.*, **6**, 201-246.
54. Golden M.C., Collins B.D., Willis M.C., Koch T.H. (2000) *J. Biotechnol.*, **81**, 167-178.
55. Smith D., Collins B.D., Heil J., Koch T.H. (2003) *Mol. Cell. Proteomics.*, **2**, 11-18.
56. Jensen K.B., Atkinson B.L., Willis M.C., Koch T.H., Gold L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 12220-12224.
57. Eaton B.E., Gold L., Hicke B.J., Janjic N., Jucker F.M., Sebesta D.P., Tarasow T.M., Willis M.C., Zichi D.A. (1997) *Bioorg. Med. Chem.*, **5**, 1087-1096.

58. Ruckman J., Green L.S., Beeson J., Waugh S., Gillette W.L., Henninger D.D., Claesson-Welsh L., Janjic N. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 20556-20567.
59. Tasset D.M., Kubik M.F., Steiner W. (1997) *J. Mol. Biol.*, **272**, 688-698.
60. Ivanov Y.D., Govorun V.M., Bykov V.A., Archakov A.I. (2006) *Proteomics*, **6**, 1399-1414.
61. Koch T.H., Smith D., Tabacman E., Zichi D.A. (2004) *J. Mol. Biol.*, **336**, 1159-1173.
62. Golden M.C., Resing K.A., Collins B.D., Willis M.C., Koch T.H. (1999) *Protein Sci.*, **8**, 2806-2812.
63. Wessman J., Stefan R.I., van Staden J.F., Danzer K., Lindner W., Burns D.T., Fajgelj A., Muller H. (2001) *Pure Appl. Chem.*, **73**, 1381-1386.
64. Danzer K. (2001) *Fresenius J. Anal. Chem.*, **369**, 397-402.
65. Collett J.R., Cho E.J., Lee J.F., Levy M., Hood A.J., Wan C., Ellington A.D. (2005) *Anal. Biochem.*, **338**, 113-123.
66. Meyers L.A., Lee J.F., Cowperthwaite M., Ellington A.D. (2004) *J. Mol. Evol.*, **58**, 681-691.
67. Mendonsa S.D., Bowser M.T. (2004) *Anal. Chem.*, **76**, 5387-5392.
68. Mendonsa S.D., Bowser M.T. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 9382-9383.
69. Berezovski M., Drabovich A., Krylova S.M., Musheev M., Okhonin V., Petrov A., Krylov S.N. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 3165-3171.
70. Drabovich A.P., Berezovski M., Okhonin V., Krylov S.N. (2006) *Anal. Chem.*, **78**, 3171-3178.
71. Berezovski M., Musheev M., Drabovich A., Krylov S.N. (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 1410-1411.
72. Misono T.S., Kumar P.K. (2005) *Anal. Biochem.*, **342**, 312-317.
73. Noma T., Ikebukuro K. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **347**, 226-231.
74. Nelson J.S., Giver L., Ellington A.D., Letsinger R.L. (1996) *Biochemistry*, **35**, 5339-5344.
75. 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.
76. Schmidt K.S., Borkowski S., Kurreck J., Stephens A.W., Bald R., Hecht M., Friebe M., Dinkelborg L., Erdmann V.A. (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5757-5765.
77. Braasch D.A., Corey D.R. (2001) *Chem. Biol.*, **8**, 1-7.
78. Davis K.A., Abrams B., Lin Y., Jayasena S.D. (1996) *Nucleic Acids Res.*, **24**, 702-706.
79. Lin Y., Jayasena S.D. (1997) *J. Mol. Biol.*, **271**, 100-111.
80. Ringquist S., Parma D. (1998) *Cytometry*, **33**, 394-405.
81. Santulli-Marotto S., Nair S.K., Rusconi C., Sullenger B., Gilboa E. (2003) *Cancer Res.*, **63**, 7483-7489.
82. Di Giusto D.A., King G.C. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 46483-46489.
83. Umehara T., Fukuda K., Nishikawa F., Kohara M., Hasegawa T., Nishikawa S. (2005) *J. Biochem. (Tokyo)*, **137**, 339-347.
84. Yan H., Zhang X., Shen Z., Seeman N.C. (1999) *Nature*, **415**, 62-65.
85. Seeman N.C. (2005) *Methods Mol. Biol.*, **303**, 143-166.
86. Yamamoto R., Katahira M., Nishikawa S., Baba T., Taira K., Kumar P.K. (2000) *Genes Cells*, **5**, 371-388.
87. Matsugami A., Kobayashi S., Ouhashi K., Uesugi S., Yamamoto R., Taira K., Nishikawa S., Kumar P.K.R., Katahira M. (2003) *Structure*, **11**, 533-545.
88. Xu W., Ellington A.D. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7475-7480.
89. 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.
90. Nishikawa F., Funaji K., Fukuda K., Nishikawa S. (2004) *Oligonucleotides*, **14**, 114-129.
91. Heyduk E., Heyduk T. (2005) *Anal. Chem.*, **77**, 1147-1156.

Поступила: 03. 10. 2006.

APTAMERS AS PERSPECTIVE AFFINE REAGENTS FOR CLINICAL PROTEOMICS

S.P. Radko, S.Yu. Rakhmetova, N.V. Bodoev, A.I. Archakov

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, Russia;
tel.: (495) 246-16-41; fax: (495) 246-37-71; e-mail: radko@ibmc.msk.ru

Application of proteomic results to scientific and medical practice will depend in many respects on progress of affine microchips technologies that determine the continuous search for inexpensive and robust affine reagents alternative to monoclonal antibodies. Among synthetic mimetics of antibodies, the oligonucleotide aptamers are of the greatest interest as affine reagents due to the possibility to automate their selection and due to the low cost of oligonucleotide synthesis. In the review the problems related to the automation and optimization of aptamer selection and to the selection of photoaptamers capable to formation of photo-induced covalent complexes with protein targets have been considered. The existing approaches to the post-selection modification of the aptamers to increase their affinity and selectivity to protein targets are discussed.

Key words: aptamers, photoaptamers, automatic selection, post-selection modification, affinity, selectivity.