

УДК 577.215.3

АПТАМЕРЫ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ**Кушниров В.В., Митькевич О.В., Ураков В.Н., Тер-Аванесян М.Д.***Институт Биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, e-mail: vkushnirov@inbi.ras.ru*

Аптамерами называют синтетические одноцепочечные молекулы ДНК или РНК, способные специфично связываться с разнообразными молекулами-мишенями. В данном обзоре мы описываем способы получения аптамеров и их существующие и перспективные применения в биологии и медицине.

Ключевые слова: аптамер, SELEX, направленный транспорт лекарств, наночастицы, диагностика, прион, амилоид

APTAMERS AND THEIR USE IN BIOLOGY AND MEDICINE**Kushnirov V.V., Mitkevich O.V., Urakov V.N., Ter-Avanesyan M.D.***A.N. Bach Institute of Biochemistry RAS, Moscow, e-mail: vkushnirov@inbi.ras.ru*

Aptamers are synthetic single stranded DNA or RNA molecules capable of specific binding to other target molecules. In this review we describe the ways of obtaining aptamers and their existing and prospective applications in biology and medicine.

Keywords: aptamer, SELEX, targeted drug delivery, nanoparticles, diagnostics, prion, amyloid

Аптамерами называют одноцепочечные молекулы ДНК или РНК, обладающие определенной пространственной структурой, и благодаря этому способные узнавать другие молекулы или даже проявлять каталитическую активность. Заметим, что такие пространственные структуры могут быть образованы только одноцепочечными ДНК или РНК, поскольку их двуцепочечные формы имеют структуру двойной спирали независимо от последовательности. Название аптамер происходит от латинского *aptus* – подходящий.

Технология SELEX

Для получения аптамеров с заданными свойствами была предложена технология SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment* – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения; [1, 2]. В качестве стартового вещества в этом методе используется библиотека олигонуклеотидов, в которой каждый олигонуклеотид имеет общие 3' и 5' фланги длиной 17–25 нуклеотидов, а средние области длиной 20–60 нуклеотидов уникальны. Такую библиотеку можно синтезировать как единый препарат олигонуклеотида, в котором в средней части в каждой позиции с равной вероятностью включается каждый из четырех нуклеотидов. Данный препарат инкубируют с молекулой-мишенью, которая обычно зафиксирована на каком-либо твердом носителе. Олигонуклеотиды, не связавшиеся с мишенью, удаляют, а связавшиеся амплифицируют при помощи ПЦР, используя общие 3' и 5' фланги. Данный цикл повторяют

несколько раз, в результате чего происходит обогащение последовательностями, имеющими сродство к молекуле – мишени.

Наконец, молекулы аптамеров клонируют в составе плазмид и индивидуально проверяют их свойства. Такая технология позволяет получать аптамеры за сроки от двух недель до нескольких месяцев. Опыт использования SELEX показал, что аптамеры могут быть получены к практически любым мишеням: белкам, полисахаридам, малым органическим молекулам, вирусам и целым клеткам.

Следует отметить, что библиотеки олигонуклеотидов, используемые в SELEX, не содержат всё возможное разнообразие молекул ДНК или РНК. Обычно такие библиотеки содержат порядка 10^8 – 10^{10} М олигонуклеотидов, или 10^{14} – 10^{16} молекул, что соответствует числу вариантов олигонуклеотида с длиной 25 ($4^{25} \approx 10^{15}$). Таким образом, библиотеки со случайным районом длиннее 25 сильно недопредставлены. Это открывает возможность дальнейшего совершенствования аптамеров путем мутагенного SELEX. Эта процедура отличается от обычного SELEX лишь тем, что в каждом цикле размножения аптамеров используется не обычный, а мутагенный ПЦР. Таким образом можно осуществлять «тонкую настройку» аптамеров, повышать их аффинность или специфичность.

Аптамеры можно рассматривать, как аналоги моноклональных антител. При этом они имеют ряд важных преимуществ перед антителами. Их получение значительно проще, дешевле и быстрее, чем получение моноклональных антител. Они имеют значи-

тельно меньший размер, и потому легче проникают в ткани и клетки, могут иметь более высокую аффинность и специфичность.

Аптамеры могут быть использованы в следующих исследовательских, диагностических и терапевтических задачах:

1. Для детекции различных молекул – мишеней, как в научных, так и в диагностических задачах. Они могут заменить антитела в Вестерн-блоттинге, во флуоресцентной гибридизации *in situ* и в методе ELISA.

2. Перспективным для диагностики форматом является создание чипов со множеством аптамеров и возможностью одновременной детекции многих белков.

3. Для аффинной очистки молекул-мишеней.

4. Для эффективного и специфичного ингибирования белков – мишеней. Такое ингибирование может быть использовано как в исследовательских целях, так и для создания новых лекарств. Некоторые такие лекарства уже находятся на стадии клинических испытаний.

5. Перспективным направлением использования аптамеров является направленный транспорт лекарств. Аптамеры в этом случае определяют адресность доставки (targeting ligands).

Регулируемые аптамеры и аптазимы

Помимо простого связывания с мишенью, аптамеры могут иметь и более сложные функции, например, иметь регулируемые или каталитические свойства.

Для многих исследовательских задач, а также в терапевтическом использовании может быть полезно иметь аптамеры, связывание которых с мишенью поддается регуляции. Таким регулятором может быть дополнительная молекула, связывающаяся с аптамером и изменяющая его сродство к мишени. Для получения таких аптамеров процедуру SELEX модифицируют следующим образом. Если дополнительная молекула должна нарушать связывание аптамера с мишенью, то в каждом цикле связывание производят, как в стандартной процедуре, а элюцию аптамера производят добавлением молекулы-эффектора. Если же дополнительная молекула является условием связывания, то связывание производят в присутствии этой молекулы, а элюцию – буфером, не содержащим ее. Например, при селекции аптамеров к формамидпиримидингликозилазе (фермент репарации ДНК) связавшиеся аптамеры элюировали неомицином [3]. В результате, связывание полу-

ченных аптамеров с мишенью прекращалось в присутствии неомицина.

Метод SELEX позволяет получить и аптамеры, имеющие каталитическую активность, зависящую от связывания с мишенью. Такие аптамеры получили название аптазимов [4, 5]. Олигонуклеотидная библиотека, используемая для получения аптазима исходно содержит в своем составе какой-нибудь охарактеризованный рибозим. Например, рибозим hammerhead, способный расщеплять собственную последовательность. Также в библиотеке присутствует случайная последовательность. В ходе селекции отбираются те молекулы, которые не имеют каталитической активности в отсутствие мишени, и приобретают такую активность в ее присутствии. Часть молекул из этой библиотеки претерпят саморасщепление исходно, поэтому в цикл SELEX отбирают только полноразмерные молекулы. Их инкубируют в присутствии мишени и отбирают расщепленные молекулы. Для следующих циклов SELEX к этим молекулам присоединяют константную отщепленную часть.

Аптазимы можно использовать, например, для генной регуляции *in vivo*. Так, последовательность аптазима, регулируемого теофиллином, поместили в 5'-нетранслируемую часть мРНК. При добавлении теофиллина к клеткам, экспрессирующим такую мРНК, происходила активация аптазима, расщепление этой мРНК и прекращение ее экспрессии [6, 7].

Аптамеры в вирусологии

Аптамеры могут быть использованы в качестве противовирусных агентов. Удобной мишенью при этом является взаимодействие вируса с хозяином, хотя аптамеры могут быть использованы для ингибирования и иных стадий жизненного цикла вируса.

Чтобы ингибировать входение вируса ВИЧ в хелперные Т-клетки, были отобраны аптамеры к гликопротеину 120 (gp120) ВИЧ, конкурирующие с ВИЧ ко-рецептором CCR5. Их связывание с высококонсервативной областью молекулы gp120 позволяет нейтрализовать множество различных изолятов ВИЧ, нарушая взаимодействие gp120-CCR5 [8, 9]. Данный аптамер был использован как основа для химерных бипотентных частиц, содержащих также малую ингибирующую РНК (миРНК), что достигалось путем упаковки в оболочку фага phi29. Эта миРНК ингибировала экспрессию мишени gp120.

Часто мишенью для аптамеров выбирают вирусные РНК-зависимые РНК-полимеразы, поскольку такая транскрипция нехарактерна для клеток хозяина. В случае вируса ВИЧ, ингибирование аптамерами вирусной РНК-полимеразы является весьма привлекательной альтернативой используемым сейчас лекарствам, модифицированным нуклеотидам азидотимидину и дидезоксиинозину. В отличие от таких нуклеотидов, аптамеры не дают заметных вредных побочных эффектов.

Описанные эффекты делают аптамеры весьма перспективным инструментом для борьбы с вирусными инфекциями.

Использование аптамеров в нанотехнологиях

Одно из наиболее перспективных применений аптамеров связано с развитием нанотехнологических подходов к диагностике и лечению болезней. Малый размер аптамеров делает их особенно удобными для нанотехнологических применений, поскольку способность молекул и частиц проникать сквозь ткани сильно возрастает с уменьшением размера. Поскольку аптамеры синтезируются химически, в отличие от антител, это позволяет добавлять к их концам различные химически активные группы, которые могут быть использованы для ковалентного присоединения к наночастицам. Такие частицы могут нести молекулы лекарства, требующие направленной доставки клеткам определенного типа. Адресность доставки может эффективно обеспечивать аптамеры.

Первым примером такого рода стал аптамер А10, распознающий простато-специфичный мембранный антиген (PSMA), трансмембранный белок, имеющий повышенную экспрессию при раке простаты. Этот аптамер был конъюгирован с наночастицами, содержащими лекарство, и оказался способен эффективно доставлять их к раковым клеткам [10]. На мышинной модели рака простаты однократное введение данного конъюгата в опухоль существенно уменьшало ее размер за 109 дней наблюдения [11]. Конъюгаты аптамера с токсином были исследованы, как противораковое лекарство. Аптамер А9 был конъюгирован с гелонином, рибосомным токсином, который вызывает клеточную смерть, разрывая специфическую гликозидную связь в рибосомной РНК, и нарушая белковый синтез. Способность этих конъюгатов индуцировать клеточную гибель была в 600 раз выше в отношении клеток, экспрессирующих PSMA, а токсичность для

нормальных (нецелевых) клеток была значительно снижена [12].

Перспективность терапии, основанной на РНК-интерференции, уже показана в преclinical испытаниях. Однако препятствием остается проблема доставки малых интерферирующих миРНК в целевые клетки [13]. Используя аптамеры к PSMA антигену, связанному с раком, удалось создать конъюгаты аптамера с миРНК для эффективной доставки миРНК в раковые клетки. На основе аптамера А10 к PSMA были созданы его гибриды с миРНК. Эти миРНК были направлены против генов, важных для пролиферации опухоли. Когда эти гибриды попадали в целевые клетки, миРНК автоматически отщеплялись от гибрида под действием фермента Dicer. Таким способом в мышинной модели рака простаты удалось добиться ингибирования роста и регрессии опухоли [14].

Аптамеры к амилоидогенным белкам и амилоидам

Одна из возможностей, открываемых методом SELEX – получение аптамеров, распознающих разные структурные состояния одного и того же белка. При этом аптамеры, распознающие амилоидогенные белки и распознающие амилоидные фибриллы отличаются как по специфичности, так и по потенциальным применениям. Так, были получены РНК и ДНК аптамеры к растворимой форме прионного белка PrP [15, 16]. Было показано, что *in vitro* РНК аптамер к PrP человека блокирует его переход в патогенную форму PrP^{Sc} [17], что открывает принципиальные возможности для разработки подходов к терапии прионных заболеваний. Аналогичным образом могут быть использованы и аптамеры к растворимой форме других амилоидогенных белков.

Альтернативно, аптамеры могут специфически распознавать амилоидные и прионные фибриллы, но не взаимодействовать с мономерной формой белка, составляющего эти фибриллы. Наличие дополнительного условия – невзаимодействие с мономерной формой белка – несколько усложняет цикл SELEX. Так, Wang и соавт. [18] сначала производили «вычитание» – удаление олигонуклеотидов, взаимодействующих с мономером белка, в данном случае, нормальной клеточной формы PrP^C; а затем связывали оставшиеся олигонуклеотиды с мишенью, прионом PrP^{Sc}. В работе Суриной и соавт. [19] был использован более оригинальный подход: олигонуклеотиды

связывали со смесью амилоидов дрожжевого прионогенного белка Sup35 и мономеров Sup35, а затем смесь разделяли посредством центрифугирования. При этом аптамеры вместе с амилоидами попадали в осадок и затем в следующий цикл селекции. Аптамеры, полученные в этих работах, действительно узнавали только фибриллярную форму белков-мишеней. Однако, что весьма интересно, многие из полученных аптамеров также были способны связываться с амилоидами других белков. В частности, все аптамеры к фибриллам белка Sup35 также связывались с амилоидами белка PrP, но не с мономерами PrP [20]. Кроме того, некоторые аптамеры к Sup35 также распознавали фибриллы белка Rnq1 и полиглутамина. Полиспецифичность аптамеров к амилоидам была обнаружена и в других работах. Так, РНК аптамеры к амилоидной форме β 2-микроглобулина также связывались с амилоидами лизоцима, хотя и не связывались с некоторыми другими амилоидами [21]; а ДНК аптамеры к α -синуклеину, связанному с болезнью Паркинсона, также взаимодействовали с амилоидом β , связанному с болезнью Альцгеймера [22]. Такая полиспецифичность указывает на наличие общих структурных черт у разных амилоидов. Наиболее очевидное применения для аптамеров к амилоидам – диагностика прионных и амилоидных болезней.

Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации (№ 11.519.11.2001).

Список литературы

1. Ellington A.D., Szostak J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands // *Nature*. – 1990. – Т. 346, № 6287. – С. 818–22.
2. Tuerk C., Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase // *Science*. – 1990. – Т. 249, № 4968. – С. 505–10.
3. Vuyisich M., Beal P.A. Controlling protein activity with ligand-regulated RNA aptamers // *Chem Biol*. – 2002. – Т. 9, № 8. – С. 907–13.
4. Famulok M. Allosteric aptamers and aptazymes as probes for screening approaches // *Curr Opin Mol Ther*. – 2005. – Т. 7, № 2. – С. 137–43.
5. Hesselberth J., Robertson M.P., Jhaveri S., Ellington A.D. In vitro selection of nucleic acids for diagnostic applications // *J Biotechnol*. – 2000. – Т. 74, № 1. – С. 15–25.
6. Davidson E.A., Ellington A.D. Engineering regulatory RNAs // *Trends Biotechnol*. – 2005. – Т. 23, № 3. – С. 109–12.
7. Thompson K.M., Syrett H.A., Knudsen S.M., Ellington A.D. Group I aptazymes as genetic regulatory switches // *BMC Biotechnol*. – 2002. – Т. 2. – С. 21.
8. Dey A.K., Griffiths C., Lea S.M., James W. Structural characterization of an anti-gp120 RNA aptamer that neutralizes R5 strains of HIV-1 // *RNA*. – 2005. – Т. 11, № 6. – С. 873–84.
9. Dey A.K., Khati M., Tang M., Wyatt R., Lea S.M., James W. An aptamer that neutralizes R5 strains of human immunodeficiency virus type 1 blocks gp120-CCR5 interaction // *J Virol*. – 2005. – Т. 79, № 21. – С. 13806–10.
10. Farokhzad O.C., Jon S., Khademhosseini A., Tran T.N., Lavan D.A., Langer R. Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells // *Cancer Res*. – 2004. – Т. 64, № 21. – С. 7668–72.
11. Farokhzad O.C., Cheng J., Teply B.A., Sherifi I., Jon S., Kantoff P.W., Richie J.P., Langer R. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2006. – Т. 103, № 16. – С. 6315–20.
12. Chu T.C., Marks J.W., 3rd, Lavery L.A., Faulkner S., Rosenblum M.G., Ellington A.D., Levy M. Aptamer:toxin conjugates that specifically target prostate tumor cells // *Cancer Res*. – 2006. – Т. 66, № 12. – С. 5989–92.
13. de Fougerolles A., Vornlocher H.P., Maraganore J., Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics // *Nat Rev Drug Discov*. – 2007. – Т. 6, № 6. – С. 443–53.
14. McNamara J.O., 2nd, Andrecke E.R., Wang Y., Viles K.D., Rempel R.E., Gilboa E., Sullenger B.A., Giangrande P.H. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras // *Nat Biotechnol*. – 2006. – Т. 24, № 8. – С. 1005–15.
15. Sekiya S., Noda K., Nishikawa F., Yokoyama T., Kumar P.K., Nishikawa S. Characterization and application of a novel RNA aptamer against the mouse prion protein // *J Biochem*. – 2006. – Т. 139, № 3. – С. 383–90.
16. Ogasawara D., Hasegawa H., Kaneko K., Sode K., Ikebukuro K. Screening of DNA aptamer against mouse prion protein by competitive selection // *Prion*. – 2007. – Т. 1, № 4. – С. 248–54.
17. Proske D., Gilch S., Wopfner F., Schatzl H.M., Winnacker E.L., Famulok M. Prion-protein-specific aptamer reduces PrPSc formation // *Chembiochem*. – 2002. – Т. 3, № 8. – С. 717–25.
18. Wang P., Hatcher K.L., Bartz J.C., Chen S.G., Skinner P., Richt J., Liu H., Sreevatsan S. Selection and characterization of DNA aptamers against PrP(Sc) // *Exp Biol Med (Maywood)*. – Т. 236, № 4. – С. 466–76.
19. Surina E.R., Morozkina E.V., Marchenko E.V., Ter-Avanessian M.D., Benevolenskiy S.V. [Selection of DNA aptamers, specifically interacting with fibrillar form of the yeast Sup35 protein] // *Mol Biol (Mosk)*. – 2009. – Т. 43, № 4. – С. 682–8.
20. Mitkevich O.V., Kochneva-Pervukhova N.V., Surina E.R., Benevolensky S.V., Kushnirov V.V., Ter-Avanessian M.D. DNA aptamers detecting generic amyloid epitopes // *Prion*. – Т. 6, № 4. – С. 400–6.
21. Bunka D.H., Mantle B.J., Morten I.J., Tennent G.A., Radford S.E., Stockley P.G. Production and characterization of RNA aptamers specific for amyloid fibril epitopes // *J Biol Chem*. – 2007. – Т. 282, № 47. – С. 34500–9.
22. Tsukakoshi K., Abe K., Sode K., Ikebukuro K. Selection of DNA aptamers that recognize alpha-synuclein oligomers using a competitive screening method // *Anal Chem*. – Т. 84, № 13. – С. 5542–7.