МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
 **«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра биофизики

 **РЕФЕРАТ**

**«Способы применения аптамеров в диагностике и терапии»**

**Направление** 011200.68 «Физика»

**Магистерская программа** 011200.68.01 «Биофизика»

Магистрант ФБ13-01М Спивак Е.А.

Преподаватель к.б.н., доцент Суковатая И.Е.

Красноярск 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

[1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 3](#_Toc377414096)

[1.1. Характеристика, способы получения и модификации аптамеров 3](#_Toc377414097)

[1.1.1. Библиотеки аптамеров 3](#_Toc377414098)

[1.1.2. Получение аптамеров. 4](#_Toc377414099)

[1.1.3. Химические модификации аптамеров. 6](#_Toc377414100)

[1.1.4. Использование аптамеров 8](#_Toc377414101)

[ЗАКЛЮЧЕНИЕ 11](#_Toc377414102)

[СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 12](#_Toc377414103)

1. **ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**
	1. **Характеристика, способы получения и модификации аптамеров**

В последние годы были обнаружены новые перспективы использования нуклеиновых кислот в качестве терапевтических и диагностических препаратов. Было открыто свойство олигонуклеотидов специфически связываться с разнообразными молекулами-мишенями. Эти олигонуклеотидыполучили название аптамеры[1].

Аптамеры представляют собой небольшие (обычно от 20 до 60 нуклеотидов) одноцепочечные молекулы РНК или ДНК, способные с высокой аффинностью и специфичностью связываться с молекулой-мишенью. К настоящему времени получено большое количество аптамеров к самым разным мишеням, начиная от простых неорганических молекул и заканчивая сложными белковыми комплексами и целыми клетками. По сути, аптамеры представляют собой нуклеотидные аналоги антител, однако, получение аптамеров – процесс значительно более простой и существенно менее дорогостоящий, чем получение антител [2],[3]. Кроме того, аптамеры не обладают иммуногенностью и токсичностью. Все это делает аптамеры идеальными кандидатами для применения в терапии, диагностике, создании биосенсоров и др.[4].

* + 1. **Библиотеки аптамеров**

Для отбора аптамеров используют библиотеку случайных олигонуклеотидных последовательностей.Олигонуклеотиды в составе библиотеки включают в себя вариабельный участок длиной 30-50 нуклеотидов. Вариабильный участок флнкирован константными участками, позволяющими осуществлять с олигонуклеотидами все необходимые манипуляции, такие, как амплификация и транскрипция. Если область случайных последовательностей содержит 40 нуклеотидов, то в библиотеке образуется 1,21·1024 их вариантов. Очевидно, что синтез полной библиотеки олигонуклеотидов с длиной области случайных последовательностей более 32 нуклеотидов практически невозможен, поскольку потребуется синтезировать как минимум граммовые количества, что чрезвычайно дорогая, трудоемкая и длительная процедура. Обычно для селекции используют библиотеку до ~1014-1015 комбинаций молекул (~1-10-10-9 моль)[5]. В этом случае полнота библиотеки пропадает уже после 26 нуклеотидов в области случайной последовательности. При синтезе неполных библиотек часть комбинаций молекул отсутствует. Но создание комбинаторных библиотек, состоящих из нуклеотидов с очень длинной областью случайных последовательностей, не всегда оправдано [6], более того, имеются примеры отрицательного влияния слишком длинной случайной последовательности на степень связывания [7]. Желательно, чтобы библиотека содержала не менее 109 (а лучше 1011) комбинаций нуклеотидов в комбинаторной библиотеке.

* + 1. **Получение аптамеров.**

Классическаяпроцедураполученияаптамеров, названнаяSELEX (системнаяэволюциялигандовэкспоненциальнымобогащением, **S**ystematic**E**volutionof**L**igandsby**EX**ponentialEnrichment), условносостоитиздвухчередующихсяэтапов (Рис.1). Первый этап заключается в амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) имеющихсяолигонуклеотидов до нужной концентрации. На втором этапе амплифицированный пул инкубируют с молекулой-мишенью и олигонуклеотиды, образовавшие с ней комплекс, используют для первого этапа следующего цикла SELEX



Рисунок 1. Общий принцип SELEX. Случайный пул олигонуклеотидов синтезирован и инкубируется с мишенями. Связавшиеся последовательности затем отделяются и амплифицируются ПЦР. Выбранный пул олигонуклеотидов вступают в новый раунд выбора. После нескольких раундов аптамеры тестируются на каталитическую активность[2].

Отбор олигонуклеотидов с большей аффинностью и отделение несвязавшихся с молекулой-мишенью олигонуклеотидов с меньшей аффинностью происходят благодаря жесткой конкуренции за место связывания. С каждым раундом селекции давление отбора увеличивается, в результате в среднем через 5-15 циклов образуется максимально обогащенныйпул, содержащий пул с наибольшим сродством к молекуле-мишени [3].

* + 1. **Химические модификации аптамеров.**

В силу физико-химических свойств нуклеиновых кислот и потенциала современного 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[2].

Существует два альтернативных подхода к получению модифицированных аптамеров.

1. SELEX использует химически модифицированные олигонуклеотиды. В этом случае модификации вносят только в 2'-положение нуклеотидов, 5'-положение пиримидинов, 7- и 8-положение пуринов и др. Модифицированные нуклеотиды используются непосредственно при проведении отбора, но при этом модификации не должна влиять на способность нуклеотида служить субстратом для РНК- или ДНК-полимеразы.
2. Модификации подвергаются уже полученные аптамеры. Это значительно увеличивает разнообразие доступных модификаций. Здесь нет ограничений для синтеза, но при этом следует учитывать, что модификация может изменить сродство аптамера к мишени[2].

Цели, достигаемые химическими модификациями:

1. Увеличение потенциального разнообразия олигонуклеотидов.
2. Придание устойчивости к действию нуклеаз. Один из способов – использование зеркальных аналогов природных нуклеотидов (L-рибоза, L-дезоксирибоза). Такие аптамеры называются *шпигельмерами* (от нем. Spiegel – зеркало), а метод их отбора назван зеркальным SELEX (mirror-imageSELEX). Олигонуклеотиды из L-нуклеотидов обладают очень высокой устойчивостью, так как не узнаются природными нуклеазами. Включениегрупп 2'Omеи 3'-3' dTтакжепридаетустойчивостькдействиюнуклеаз[8].
3. Включение функциональных групп (5-йод-, 5-бром-, 4-тиоуридин-), активирующихся при облучении, позволяет получить аптамеры, способные к образованию ковалентных сшивок с белком-мишенью. Метод получения фотоаптамеров получил название ковалентного SELEX (covalentSELEX). Технология получения фотоаптамеров используется для создания микрочипов при анализе экспрессии белков человека [9].
4. Внесение в состав аптамера флуоресцентных групп, например, [18F], используется для анализа его связывания с белком-мишенью. Это имеет значение для детекции молекул-мишеней. В простейшем случае связывание можно детектировать по изменению флуоресценции аптамера, которое вызывается изменениями окружения флуоресцентной группы при образовании комплекса. В настоящее время уже разработаны методы, позволяющие направленно отбирать аптамеры, флуоресценция которых меняется при связывании с молекулой-мишенью[10].
5. Ассоциация аптамера с лекарственными препаратами используется для целевой доставки лекарства [11].
6. Конъюгация аптамеров применяется для увеличения полужизни аптамера [12].
	* 1. **Использование аптамеров**
			1. **Взаимодействие аптамеров с внутриклеточными мишенями**

Большинство описанных аптамеров отобраны к мишеням, находящимся на поверхности клеток или непосредственно в кровотоке. В перспективе это может существенно облегчить их применение, поскольку для получения терапевтического результата необходимо только ввести аптамер в кровоток. Однако в последнее время достигнуты определенные успехи в разработке способов доставки аптамеров внутрь клетки. Одним из перспективных подходов в данной области является применение специальных систем экспрессии, способных эффективно производить аптамер в нужных концентрациях в самой клетке с последующим их накоплением либо в нуклеоплазме, либо в цитоплазме. Например, экспрессия аптамеров в клетках, трансфицированных рекомбинантным вектором с кодирующими аптамер нуклеотидными последовательностями под промотором U6, способна обеспечить специфическую инактивацию внутриядерных белков-мишеней [13]. Экспрессия аптамеров с помощью промотора одной из тРНК обеспечивает их преимущественную цитоплазматическую локализацию. Синтез аптамеров в клетках определенного типа могут обеспечить вирусные экспрессионные системы за счет их направленной доставки в клетки [14]. Повысить концентрацию экспрессирующихся внутри клетки аптамеров (называемых также интрамерами) можно не только за счет высокого уровня экспрессии, обеспечиваемого сильным промотором, но и в результате снижения скорости нуклеазной деградации интрамера (экранирование 3’- и 5’-концов с помощью таких дополнительных структурных элементов, как, например, шпильки).

Другой подход к решению проблемы взаимодействия аптамеров с внутриклеточными молекулами-мишенями – проникновение аптамеров в клетки из кровотока в результтерецептор-зависимого эндоцитоза [15], [16]. Например, аптамеры, связывающиеся с простат-специфичным мембранным антигеном (prostat-specificmembraneantigen, PSMA), позволяют за счет их эндоцитоза эффективно и избирательно доставлять конъюгированные терапевтические агенты в клетки опухолей, содержащих на своей поверхности такие антигены.

* + - 1. **Аптамеры для диагностики и терапии**

Моно- и поликлональне антитела в настоящее время являются незаменимыми инструментами в диагностике разнообразных заболеваний. Однако во многих случаях, когда требуется эффективное и специфичное взаимодействие с молекулой-мишенью (диагностируемым маркером), аптамеры уже сейчас успешно заменяют антитела.

Аптамеры также применяются при создании биосенсоров в качестве распознающих элементов. Биосенсоры на основе аптамеров могут использоваться не один раз, а многократно, без потери чувствительности, что обусловлено присущей всем нуклеиновым кислотам способностью к денатурации и ренатурации.

Низкая стоимость производства, отсутствие иммуногенности и возможность проводить различные модификации сделали аптамеры крайне перспективными кандидатами для применения в качестве терапевтических средств. Основа использования аптамеров в данной области – способность ингибировать ферментативную активность того белка-мишени, с которым связался аптамер. Ингибирование ферментативной активности может быть обусловлено как взаимодействием аптамера с активным центром фермента, так и в результате спровоцированных взаимодействий с аптамером конформационных изменений в структуре белка[11]. Однако взаимодействие с аптамером не всегда приводит к ингибированию фермента. Иногда наблюдается обратная ситуация: фермент переходит из неактивной формы в активную, что обусловлено сходством действия аптамера и активирующего лиганда по отношению к белку[3].

Конъюгирование аптамеров, полученных к белковым маркерам клеток определенного типа с терапевтическим агентом также предоставляет ряд уникальных возможностей. Одна из таких возможностей – доставка лекарственного средства непосредственно к тому типу клеток, который несет на поверхности специфические белковые маркеры. В качестве терапевтического агента могут быть применены:

1. крайне токсичные вещества, не позволяющие применять их в высоких терапевтических дозах.
2. Быстро деградирующие и быстро выводящиеся вещества, такие, как миРНК.
3. Наночастицы, исследуемые в качестве потенциальных переносчиков лекарственных средств в район опухоли. Низкая эффективность доставки лекарственных средств в опухолевую ткань с использованием конъюгированных наночастиц с антителами связана с тем, что в кровотоке такие крупные конъюгаты быстро поглощаются фагоцитарной системой и, кроме того, проявляют низкую способность к проникновению в твердые опухоли.
4. Эндогенные ферменты. Конъюгирование ферментов с аптамерами может оказаться крайне полезным для доставки в те клетки, в которых эти ферменты либо отсутствуют, либо не работают должным образом, с последующим потенциальным восстановлением функций клеток.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Аптамеры представляют собой довольно новый класс веществ, а разработка всевозможных протоколов, направленных на адаптацию аптамеров к тем или иным задачам, занимает много времени.

Применение аптамеров в диагностике имеет значительно меньшие ограничения, чем в терапии, поскольку отсутствует непосредственная угроза здоровью людей. Основным препятствием широкому распространению аптамеров является отсутствие стандартизации аптамеров в разрабатываемых протоколах. Так, полученные в разных лабораториях аптамеры к одной и той же молекуле-мишени, помимо различий в первичной структуре, почти наверняка будут различаться и такими параметрами, как аффинность, специфичность и другие кинетические характеристики. Можно надеяться, что выявление конкретной молекулы-мишени с помощью только одного аптамера с наилучшими параметрами связывания в скором будущем обусловит широкое применение аптамеров в диагностике.

К настоящему моменту найдено то или иное решение почти всех проблем, возникающих при работе с аптамерами. Поэтому можно предположить, что благодаря ряду уникальных свойств аптамеры в скором времени займут достойное место среди терапевтических и диагностических препаратов.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

|  |  |
| --- | --- |
| 1. | Song Kyung-MiAptamers and Their Biological Applications / Kyung-Mi Song, Seonghwan Lee, Changill Ban //Sensors, № 12, pp. 612-631, 2012 |
| 2. | Кульбачинский А.В.Методы отбора к белковым мишеням/ Кульбачинский А.В. //Успехи биол. химии, № 46, pp. 193-224, 2006.  |
| 3. | Mayer G.The Chemical Biology of Aptamers / G. Mayer //Angewandte chemie, № 48, p. 2672 – 2689, 2009.  |
| 4. | Bouchard P.R. Discovery and Development / P.R. Bouchard, R.M. Hutabarat, K.M. Thompson //Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol, № 50, pp. 237-257, 2010.  |
| 5. | Cramery A. 1020-Fold aptamer library amplification without gel purification / Cramery A., Stremmer Willem P.C. //Nucleic Acid Research, т. 21, № 18, p. 4410, 1993.  |
| 6. | Gold L. From oligonucleotide shapes to genomic SELEX: Novel biological regulatory loops / Gold, L. at all //Proc.Natl.Acad.Sci.USA.Biochemistry, № 94, pp. 59-64, 1997.  |
| 7. | КопыловА.М. Комбинаторнаяхимиянуклеиновыхкислот: SELEX / Копылов А.М., Спиридонова В.А. //Молекулярнаябиология, т. 34, № 6, pp. 1097-1113, 200.  |
| 8. | Floege J. Novel approach to specific growth factor inhibition in vivo antagonism of platelet-derived growth factor in glomerulonephrites by aptamers / Floege J., Ostendorf T., Janssen U. at all //Am.J.Pathol., № 254, pp. 269-179, 1999.  |
| 9. | Golden M.C. Potential of PhotoSELEX-Evolved ssDNA Aptamers / Golden M.C., Collins B.D., Willis M.C., Koch T.H. //J.Biotechnol, № 81, pp. 167-178, 2000.  |
| 10. | Pestourie C. Aptamers against extracellular targets for in vivo application / Pestourie C., Tavitian B., Duconge F. //Biochemie, № 87, pp. 921-930, 1995.  |
| 11. | Dausse E. Aptamers: a new class of oligonucleotides in the drug? / Eric Dausse, Sonia Da Rocha Gomes and Jean-Jacques Toulme //Pharmacology, № 9, pp. 602-607, 2009.  |
| 12. | Nimjee S.M. Aptamers: an emerging class of therapeutics / Shahid M. Nimjee, Christopher P. Rusconi and Bruce A. Sullenge //Annu. Rev. Med., № 56, pp. 555-583, 2005.  |
| 13. | Good P.D. Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei / P.D. Good, A.J. Krikos, S.X. Li, E. Bertrand, N.S. Lee, L. Giver, A. Ellington, J.A. Zaia, J.J. Rossi and D.R. Engelke //Gene Therapy, т. 4, № 1, pp. 45-54, 1997.  |
| 14. | Mi J. H1 RNA polymerase III promoter-driven expression of an RNA aptamer leads to high-level inhibition of intracellular protein activity / Jing Mi, Xiuwu Zhang, Zahid N Rabbani, Yingmiao Liu, Zhen Su, Zeljko Vujaskovic, Christopher D. Kontos, Bruce A. Sullenger, Bryan M. Clary //Nucleic Acids, т. 34, № 12, p. 3577–3584, 2006.  |
| 15. | Meyer C. Interleukin-6 receptor specific RNA aptamers for cargo delivery into target cells / Cindy Meyer, Katja Eydeler, Eileen Magbanua, Tijana Zivkovic, Nicolas Piganeau, Inken Lorenzen, Joachim Grötzinger, Günter Mayer, Stefan Rose-John, Ulrich Hahn //RNA Biology, т. 9, № 1, pp. 67-80, 2012.  |
| 16. | Douglas S.M. A Logic-Gated Nanorobot for Targeted Transport of Molecular Payloads / Shawn M. Douglas, Ido Bachelet, George M. ChurchScience, т. 335, pp. 831-834, 2012.  |