

*На правах рукописи*

ТИМОШЕНКО ВАЛЕНТИНА ВИКТОРОВНА

**НОВЫЕ РНК-АПТАМЕРЫ И АПТАСЕНСОРЫ  
ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ АУТОАНТИТЕЛ, ХАРАКТЕРНЫХ ДЛЯ  
РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА**

02.00.10 – биоорганическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Новосибирск 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

**Научный руководитель:**

**Воробьева Мария Александровна**, к.х.н.

**Официальные оппоненты:**

**Коваль Владимир Васильевич**, к.х.н., доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, зам.директора по научной работе.

**Позмогова Галина Евгеньевна**, д.х.н., профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства, зав.лаб.

**Карпенко Лариса Ивановна**, д.б.н., доцент, Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, в.н.с.

Защита состоится 11 сентября 2020 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.02.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Автореферат разослан 10 августа 2020 г.

Учёный секретарь диссертационного совета  
к.х.н., доцент

Коваль В. В.



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Аптамеры – синтетические молекулы ДНК и РНК, способные высокоспецифично узнавать определенные молекулы-мишени за счет образования уникальной пространственной структуры. Они находят широкое применение для детекции различных молекул-мишеней и ингибирования их функциональной активности, а также обладают большим потенциалом для использования в качестве основы чувствительных и специфических биосенсоров. К уникальным преимуществам аптамеров относятся возможность их селекции практически для любой заданной мишени, возможность химического или химико-ферментативного синтеза в препаративных количествах, а также введения разнообразных химических модификаций, длительный срок хранения и устойчивость в широком диапазоне условий.

Создание НК-аптамеров к белкам-биомаркерам различных заболеваний человека является одним из интенсивно развивающихся направлений современной биоорганической химии, молекулярной биологии и биомедицины. Такие аптамеры вызывают большой интерес в качестве основы для новых таргетных терапевтических препаратов и диагностических систем. Среди белков-мишеней следует особо отметить специфические антитела, характерные для аутоиммунных заболеваний (АИЗ). Каждое АИЗ характеризуется уникальным спектром аутоантител, что позволяет рассматривать их как потенциальные диагностические маркеры. При этом на сегодняшний день подходы к ранней диагностике АИЗ и контролю их течения развиты недостаточно. Одним из АИЗ, для которого актуальна проблема лабораторной диагностики, является рассеянный склероз (РС) – аутоиммунное заболевание центральной нервной системы, при котором поражается миелиновая оболочка нервных волокон. Ранняя диагностика и своевременное начало терапии позволяют существенно замедлить развитие РС и улучшить качество жизни пациентов. В то же время его диагностика представляет собой сложную комплексную задачу и требует анализа совокупности клинических и лабораторных данных, причем достоверного метода специфичной лабораторной диагностики РС пока не существует.

Выявление биомаркеров, ассоциированных с РС, и разработка на их основе диагностических платформ могут открыть новые возможности для прогнозирования течения заболевания и определения эффективности лечения. Характерной особенностью РС является наличие в организме аутоантител к основному белку миелина (ОБМ), которые вносят вклад в разрушение миелиновой оболочки нервных волокон за счет своей протеолитической активности. В ряде работ предлагается рассматривать анти-ОБМ аутоантитела в качестве потенциальных диагностических биомаркеров РС (*Kalinina, E.V.*

*et.al. J. Immunol. Meth., 2002, 269(1-2), 197-211. Polosukhina, D.I.et.al. J. Cell. Mol. Med., 2004, 8(3), 359-368).*

В данной работе впервые предложено создание биосенсоров на основе РНК-аптамеров для детекции анти-ОБМ аутоантител, характерных для РС.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы являлось создание 2'-модифицированных РНК-аптамеров к анти-ОБМ аутоантителам, характерным для рассеянного склероза, и конструирование на их основе биолюминесцентных аптасенсоров для детекции данных аутоантител в препаратах из сыворотки крови. Для достижения поставленной цели было необходимо **решить следующие задачи:**

- получить 2'-F-РНК<sup>1</sup>-аптамеры, способные специфично и с высоким сродством связываться с аутоантителами, исследовать их свойства;
- минимизировать нуклеотидные последовательности аптамеров при сохранении аффинности и селективности связывания;
- исследовать возможность использования полученных аптамеров как молекулярных узнающих элементов при создании биолюминесцентных аптасенсоров для детекции анти-ОБМ антител, разработать оптимальную конструкцию аптасенсора и протокол детекции;
- провести тестирование созданного аптасенсора на индивидуальных препаратах от пациентов с РС и здоровых доноров и оценить чувствительность и специфичность разработанного метода детекции.

**Научная новизна полученных результатов и практическая значимость.** В рамках работы были получены два новых 2'-F-РНК-аптамера с высокой аффинностью к анти-ОБМ аутоантителам, характерным для РС. Нуклеотидные последовательности полученных аптамеров были минимизированы с сохранением сродства и селективности связывания. Было показано, что оба аптамера способны связываться с антителами-мишенями даже в присутствии большого избытка других антител того же класса и дискриминировать суммарные сывороточные антитела больных РС от антител здоровых доноров и больных системной красной волчанкой. Впервые показана принципиальная возможность использования полученных аптамеров в качестве узнающих элементов биолюминесцентных аптасенсоров. Предложена стратегия конструирования сенсора на основе пары аптамеров и фотопротейина обелина в качестве репортерной группы для получения биолюминесцентного сигнала. Созданный новый аптасенсор протестирован на выборке индивидуальных образцов сывороток крови пациентов с РС и клинически здоровых доноров. Показано, что значения биолюминесцентного сигнала от образцов больных статистически достоверно выше по сравнению с контрольной группой. Разработанный метод анализа характеризуется высокой

<sup>1</sup> Здесь и далее под 2'-F-РНК мы подразумеваем РНК, в которых все пиримидиновые нуклеотиды заменены их 2'-F-модифицированными аналогами

чувствительностью и специфичностью. Данные характеристики позволяют рассматривать полученный аптасенсор как потенциальный инструмент для оценки содержания анти-ОБМ антител в сыворотке крови пациентов с РС, который может быть использован при установлении диагностической и прогностической значимости этого маркера.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Получены два 2'-F-РНК-аптамера с высоким сродством и селективностью связывания с анти-ОБМ антителами, характерными для рассеянного склероза. Их нуклеотидные последовательности минимизированы с 71 нуклеотидного звена до 57 и 26 звеньев, соответственно.

2. Полученные 2'-F-РНК-аптамеры могут быть использованы в качестве узнающих элементов для биолюминесцентных микропланшетных аптасенсоров с фотопротеином обелином в качестве репортерной группы.

3. Оптимальная конструкция аптасенсора включает в себя биотинилированный 26-звенный аптамер в качестве иммобилизованного на поверхности первичного компонента сенсора, и 57-звенный аптамер – в качестве вторичного компонента, ковалентно соединенного с фотопротеином обелином. Оптимизированы концентрации компонентов сенсора и анализируемых антител, разработан протокол анализа, оценена чувствительность метода.

4. Разработанный биолюминесцентный микропланшетный сенсор позволяет достоверно различать образцы сывороток крови от больных РС и здоровых доноров и обеспечивает высокую чувствительность и специфичность анализа.

**Апробация и публикации результатов.** По материалам работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, получены 2 патента на изобретение РФ. Основные результаты работы были представлены на научных конференциях всероссийского и международного уровня: 38-м конгрессе FEBS (Санкт-Петербург, Россия, 2013), 1-м международном симпозиуме «Aptamers 2014» (Оксфорд, Великобритания, 2014), 15-м форуме молодых ученых FEBS (Берлин, Германия, 2015), 40-м конгрессе FEBS «The Biochemical Basis of Life» (Берлин, Германия, 2015), международной конференции, посвященной 90-летию академика Д. Г. Кнорре (Новосибирск, Россия, 2016), V съезде биохимиков России (Дагомыс, Россия, 2016), всероссийской конференции с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, Россия, 2019), 1-й международной конференции «Aptamers in Russia 2019» (Красноярск, Россия, 2019).

**Структура и объем диссертации.** Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 146 страницах, содержит 72 рисунка и 16 таблиц. Библиография включает 174 литературных источника.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Получение серии 2'-F-РНК-аптамеров и сравнительное исследование их связывания с анти-ОБМ антителами из крови больных РС

При селекции аптамеров, направленных на характерные для РС анти-ОБМ антитела (АТ), в качестве мишени для отбора была использована смесь анти-ОБМ АТ из крови пациентов с РС. Использование смеси антител повышает вероятность получения «универсальных» аптамеров, способных узнавать антитела различных пациентов. Все пиримидиновые нуклеотиды в составе РНК-библиотеки были заменены их 2'-F-модифицированными аналогами для повышения устойчивости РНК-аптамеров к нуклеазам. К моменту начала данной работы в ЛХРНК ИХБФМ СО РАН была получена обогащенная библиотека 2'-F-РНК-аптамеров после 10 раундов отбора (**RNA10**) на анти-ОБМ антитела из крови пациентов с РС, библиотека была переведена в дцДНК-форму, проведено клонирование полученного пула дцДНК и определены нуклеотидные последовательности для 43 клонов.

**Таблица 1.** Нуклеотидные последовательности выбранных 2'-F-РНК-аптамеров.

Аптамер	Последовательность, 5'→3'
<b>Группа №1</b>	
I-3	GGGAGGACGAUGCGGAGGGCAAUCCUCAGUCUCGGCGCU CUCGUUCGGGUGCUGCCCAGACGACUCGGCGGA
II-8	GGGAGGACGAUGCGGAGGGCAAUCCUCAGUCUCGGCGCU CUCGUUCGGGUGCUGCCCAGACGACUCGGCGGA
<b>Группа №2</b>	
II-3	GGGAGGACGAUGCGGUGUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUUGUUACCU CAGACGACUCGGCGGA
II-5	GGGAGGACGAUGCGGUGUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUUGUUACCU CAGACGACUCGGCGGA
II-9	GGGAGGACGAUGCGGUGUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUUGUUACCU CAGACGACUCGGCGGA
II-11	GGGAGGACGAUGCGGUGUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUUGUUA CCG CAGACGACUCGGCGGA
III-6	GGGAGGACGAUGCGGUGUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUUGUU ACC CG CAGACGACUCGGCGGA
III-7	GGGAGGACGAUGCGGUGUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUUGUU ACC CA CAGACGACUCGGCGGA

Подчеркиванием выделены константные участки аптамеров. Цветами выделены различия в нуклеотидных последовательностях.

Для дальнейшего исследования на основании анализа нуклеотидных последовательностей были сформированы две группы, в каждой из которых аптамеры содержали высокомолекулярные участки нуклеотидной последовательности в комбинаторной области (Таблица 1). Индивидуальные 2'-F-РНК-аптамеры были получены химико-ферментативным способом с использованием соответствующих химически синтезированных оцДНК-матриц.

Для сравнительной оценки сродства аптамеров к антителам-мишеням было проведено определение кажущихся равновесных констант диссоциации ( $K_D$ ) комплексов аптамер-АТ в условиях постоянной концентрации АТ (10 нМ) и повышающейся концентрации аптамера, с использованием метода удерживания НК-белковых комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах (Таблица 2).

2'-F-РНК		$K_D$ , нМ	$\Delta G_{298}$ , (ккал/моль)*
<b>RNA10</b>		220 ± 190	
Группа 1	<b>I-3</b>	6550 ± 4100	-38.15
	<b>II-8</b>	6300 ± 700	-38.05
Группа 2	<b>II-3</b>	820 ± 50	-22.24
	<b>II-5</b>	460 ± 60	-22.68
	<b>II-9</b>	<b>300 ± 50</b>	<b>-19.19</b>
	<b>II-11</b>	910 ± 290	-23.56
	<b>III-6</b>	5820 ± 320	-20.73
	<b>III-7</b>	1600 ± 430	-20.24

**Таблица 2.**

Константы диссоциации комплексов 2'-F-РНК-аптамеров с анти-ОБМ АТ больших РС.

\* Значения свободной энергии Гиббса  $\Delta G_{298}$  для образования вторичных структур аптамеров, полученные с использованием алгоритма mfold 2.3.

Максимальным сродством к анти-ОБМ антителам, сравнимым со сродством **RNA10**, обладал аптамер **II-9**. Интересно, что вторичная структура этого аптамера характеризуется наименьшим абсолютным значением  $\Delta G_{298}$ . Можно предположить, что аптамер **II-9** обладает более гибкой структурой, и возможность "подстройки" пространственной структуры при связывании с мишенью является причиной более аффинного связывания.

## 2. Исследование селективности связывания аптамера **II-9** с анти-ОБМ аутоантителами

С точки зрения потенциального диагностического применения важной характеристикой аптамеров является их селективность - способность предпочтительно связывать только аутоантитела-мишени, но не аналогичные антитела того же класса. Для оценки селективности аптамера **II-9** было исследовано его связывание с антителами из крови здоровых доноров. Здесь и далее связывание проводили в условиях постоянной низкой концентрации [ $^{32}$ P]-меченого аптамера и повышающейся концентрации белка, связывание исследовали методом нативного гель-электрофореза. Константы диссоциации комплексов аптамера **II-9** и обогащенной 2'-F-РНК-библиотеки **RNA10** с анти-ОБМ АТ и антителами (суммарными IgG) из крови здоровых доноров приведены в таблице 3.

Как видно из приведенных значений  $K_D$ , аптамер **II-9** демонстрирует более высокое сродство к анти-ОБМ антителам по сравнению с **RNA10** (снижение  $K_D$  в 2.6 раза). При этом в обоих случаях значения  $K_D$  для комплексов с аутоантителами-мишенями и с контрольными АТ различаются

примерно в 10 раз, что свидетельствует о выраженной селективности связывания с аутоантителами как **RNA10**, так и аптамера **П-9**.

2'-F-РНК	K <sub>D</sub> , нМ	
	Анти-ОБМ АТ	АТ здоровых доноров
<b>RNA10</b>	40±14	425±92
аптамер <b>П-9</b>	15±4	425±300

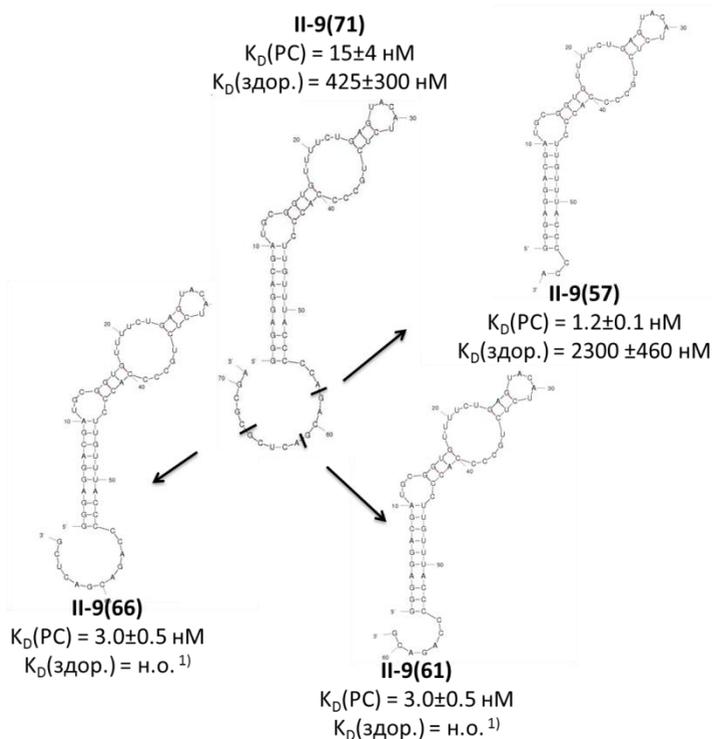
**Таблица 3.**

Константы диссоциации комплексов 2'-F-РНК-аптамера **П-9** и **RNA10** с анти-ОБМ АТ и АТ здоровых доноров.

### 3. Минимизация олигонуклеотидной последовательности аптамера **П-9**

Высокое сродство к антителам-мишеням и высокая селективность связывания определили выбор 2'-F-РНК-аптамера **П-9** в качестве наиболее перспективного кандидата для дальнейших исследований. Следующим этапом работы стала минимизация его нуклеотидной последовательности. Удаление из состава аптамера нуклеотидов, не участвующих в связывании с мишенью, снижает вероятность неспецифического связывания, а также образования альтернативных вторичных структур, может повысить сродство к мишени и делает химический синтез аптамера более быстрым и экономичным.

В составе предполагаемой вторичной структуры аптамера **П-9** 3'-концевой константный участок представлен одноцепочечным фрагментом (Рисунок 1). Поскольку основной вклад во взаимодействие с мишенью, как правило, вносят фрагменты с выраженной вторичной структурой, мы предположили, что удаление одноцепочечного участка не должно существенно влиять на сродство аптамера к аутоантителам-мишеням. Чтобы выявить оптимальный вариант минимизации, было проведено последовательное укорочение 3'-концевого фрагмента, при этом общая длина аптамера составила 66, 61 и 57 нуклеотидов, соответственно (Рисунок 1). Серия минимизированных аналогов **П-9(66)**, **П-9(61)** и **П-9(57)**, а также полноразмерный аптамер **П-9(71)** были синтезированы автоматическим твердофазным фосфитамидным методом. Их сродство к антителам-мишеням и селективность связывания были исследованы методом нативного геле-электрофореза.



**Рисунок 1.** Расчетные вторичные структуры аптамера **II-9** и его минимизированных аналогов (по версии mfold version 2.3, 25°C) и соответствующие значения  $K_D$  комплексов с анти-ОБМ АТ (PC) и АТ здоровых доноров (здор.).

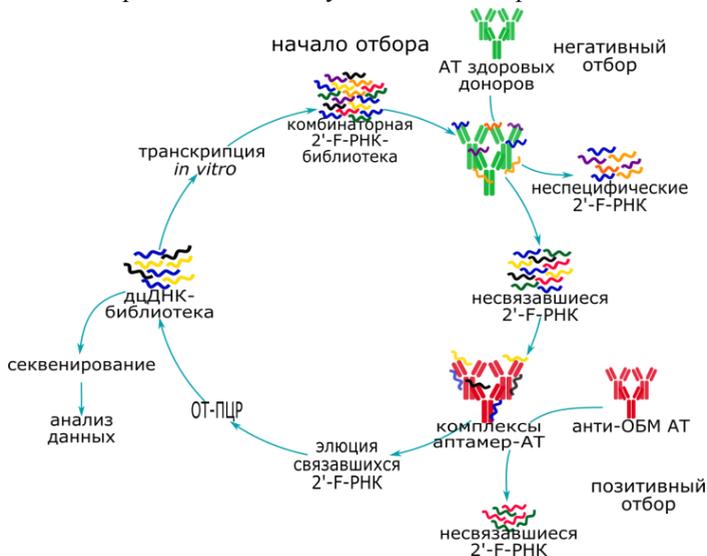
<sup>1)</sup> Значение  $K_D$  не определено в связи с низкой степенью образования комплексов аптамер-антитело.

Сравнивая значения  $K_D$ , можно заключить, что при укорочении аптамера **II-9** на 5-14 звеньев с 3'-конца стабильность комплексов с мишенью возрастает:  $K_D$  комплексов «укороченных» аптамеров с анти-ОБМ аутоантителами примерно на порядок ниже по сравнению с комплексами полноразмерного аптамера **II-9**. При этом  $K_D$  комплексов аптамера **II-9(57)** с АТ здоровых доноров на 3 порядка выше  $K_D$  образования комплексов с анти-ОБМ АТ, что говорит о значительном увеличении селективности связывания по сравнению с полноразмерным аптамером.

#### 4. Дополнительная *in vitro* селекция аптамеров на анти-ОБМ аутоантитела

При анализе реальных серологических образцов необходимо селективно детектировать аутоантитела-мишени в присутствии большого количества антител того же типа. Представляло интерес исследовать возможность

получения 2'-F-РНК-аптамеров, обладающих повышенной селективностью связывания анти-ОБМ антител. Для решения этой задачи была проведена дополнительная *in vitro* селекция с использованием ранее полученной обогащенной 2'-F-РНК-библиотеки **RNA10**. Чтобы исключить из библиотеки фракцию аптамеров, связывающихся с другими иммуноглобулинами крови, в цикл отбора была введена дополнительная стадия негативного отбора - инкубация 2'-F-РНК с суммарными антителами, выделенными из крови здоровых доноров (см. схему на рисунке 2). Далее следовала стадия позитивного отбора на анти-ОБМ аутоантитела из крови пациентов с РС.

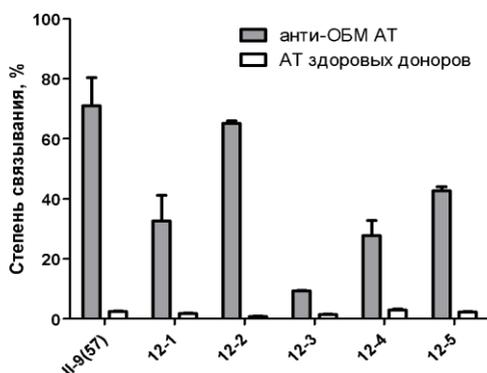


**Рисунок 2.** Общая схема *in vitro* селекции 2'-F-РНК-аптамеров на анти-ОБМ аутоантитела с контрселекцией на антитела здоровых доноров.

Было проведено два раунда отбора, и получена новая обогащенная 2'-F-РНК-библиотека (**RNA12**), которую затем методом ОТ-ПЦР переводили в дцДНК-форму для высокопроизводительного параллельного секвенирования. После анализа данных секвенирования в качестве кандидатов были выбраны пять наиболее часто встречающихся в библиотеке **RNA12** аптамеров **12-1**, **12-2**, **12-3**, **12-4**, **12-5** (серия **12**), последовательности их переменных участков (соответствующих фрагменту N40 исходной 2'-F-РНК-библиотеки) и частоты встречаемости приведены в таблице 4. Аптамеры серии **12** были синтезированы методом автоматического твердофазного фосфитамидного синтеза.

**Таблица 4.** Нуклеотидные последовательности рандомизированных участков 2'-F-РНК-аптамеров после дополнительных раундов отбора

Аптамер	Последовательность, 5'→3'	Встречаемость, %
12-1	CCCAUCGAAUUUCGCUACAUGCCCUUCUUCGGUGCCCCGCA	3.8
12-2	UCAAUUACCUGAGAGCAGGAGUACAAUCUUUGGCCGCGUG	1.6
12-3	UUGAGCUCGAUGCCACGGCUCGUCGUCUUUCCGCGUGCCC	1.2
12-4	AGGGCAAUCCUCAGUCUCGCGCUCUCGUUCGGGUGCUGCC	0.6
12-5	CCUUUCUCAAUGCGCCCGUACAGCGCCAUCGAUCCGCCG	0.5



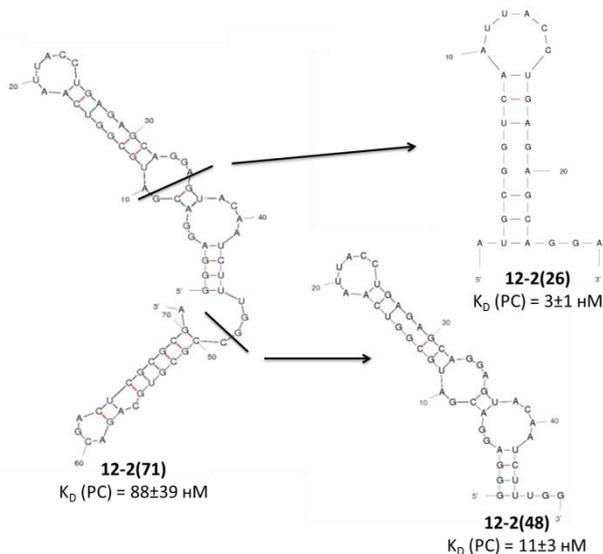
**Рисунок 3.** Степень связывания 2'-F-РНК-аптамеров серии 12 с анти-ОБМ антителами (100 нМ) и антителами здоровых доноров (100 нМ).

После скрининга сродства и селективности связывания аптамеров серии 12 с анти-ОБМ АТ от больных РС и АТ здоровых доноров (рисунок 3) было показано, что в серии 12 максимальное различие

между связыванием с антителами-мишенями и антителами здоровых доноров характерно для аптамера 12-2.

### 5. Минимизация олигонуклеотидной последовательности аптамера 12-2

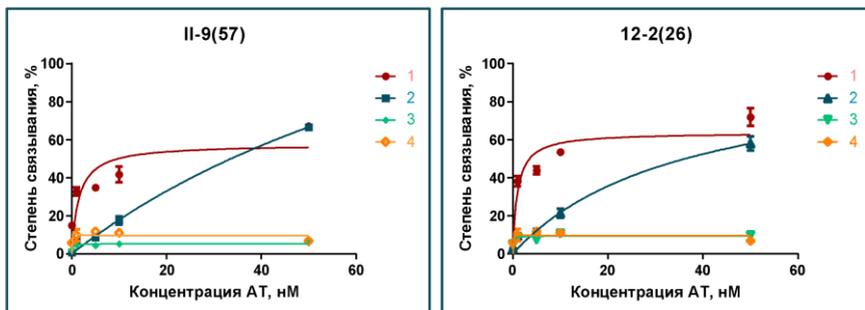
Была исследована возможность удаления из последовательности аптамера 12-2 нуклеотидов, не влияющих на взаимодействие с мишенью. Его предполагаемая вторичная структура состоит из двух РНК-шпилек, соединенных 4-нуклеотидным одноцепочечным фрагментом (рисунок 4). При минимизации нуклеотидной последовательности аптамера 12-2 были рассмотрены два варианта укорочения: удаление 3'-концевой шпильки, которое дает 48-звенный аптамер 12-2(48) и более радикальное укорочение до 26-звенного шпилечного фрагмента с получением аптамера 12-2(26). Методом автоматического твердофазного фосфитамидного синтеза была получена серия аптамеров 12-2: 12-2(71), 12-2(48), 12-2(26).



**Рисунок 4.** Расчетные вторичные структуры 2'-Ф-РНК-аптамера **12-2** и его минимизированных аналогов при 25°C по версии mfold version 2.3. и значения  $K_D$  комплексов с анти-ОБМ АТ.

Оказалось, что при удалении 3'-концевых фрагментов стабильность комплекса аптамер-антитело увеличивается:  $K_D$  комплексов укороченных аптамеров с антителами-мишенями оказались приблизительно на порядок ниже, чем в случае полноразмерного аптамера **12-2(71)**. Для дальнейших исследований был выбран минимизированный аналог с наименьшей длиной нуклеотидной последовательности – аптамер **12-2(26)**.

Была проведена сравнительная оценка селективности связывания аптамеров **П-9(57)** и **12-2(26)** с антителами-мишенями с использованием аффинно очищенных анти-ОБМ антител от пациентов с РС, а также суммарных IgG из крови пациентов с РС, здоровых доноров и больных другим АИЗ – системной красной волчанкой (СКВ). Поскольку в крови больных СКВ также могут присутствовать анти-ОБМ АТ (*Bezuglova, A. et.al. J. Mol. Recognit., 2011, 24, 960-974*), представляло интерес сравнить способность полученных аптамеров связывать препараты АТ от больных РС и СКВ. Полученные кривые связывания (рисунок 5) свидетельствуют о том, что аптамеры **П-9(57)** и **12-2(26)** способны эффективно связываться с анти-ОБМ аутоантителами от больных РС не только в аффинно выделенных на ОБМ-сефарозе препаратах, но и в суммарном пуле АТ пациентов с РС. Степень связывания с суммарными АТ здоровых доноров и АТ больных СКВ при этом не превышала 10%, что указывает на селективность связывания именно анти-ОБМ антител, характерных для РС.



**Рисунок 5.** Кривые связывания аптамеров **II-9(57)** и **12-2(26)** с 1) аффинно-очищенными анти-ОБМ АТ из крови больных РС, 2) суммарными АТ больных РС, 3) суммарными АТ здоровых доноров, 4) суммарными АТ больных СКВ.

Полученные нами 2'-F-РНК-аптамеры **II-9(57)** и **12-2(26)** обладают высоким сродством к анти-ОБМ АТ, характерным для РС, и способны селективно узнавать антигены-мишени. Эти характеристики позволяют рассматривать их в качестве узнающих элементов при создании биосенсоров для детекции ассоциированных с РС анти-ОБМ антител.

## **6. Создание биолюминесцентных аптасенсоров на основе полученных 2'-F-РНК-аптамеров**

На следующих этапах работы мы исследовали возможность использования полученных 2'-F-РНК-аптамеров **II-9(57)** и **12-2(26)** при создании аптасенсоров для детекции анти-ОБМ аутоантител, характерных для РС. Для этого был выбран вариант образования комплексов сэндвич-типа на поверхности микроплашета с последующей оптической детекцией. В рамках совместной работы ЛХРНК ИХБФМ СО РАН и лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН была предложена стратегия конструирования биолюминесцентных аптасенсоров с фотопротеином обелином в качестве репортерной группы.

Обелин –  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемый фотопротеин гидроидного полипа *Obelia longissima*, представляет собой устойчивый фермент-субстратный комплекс, состоящий из апопротеина и нековалентно связанного с ним предокисленного субстрата 2-гидропероксицелентеразина. Присоединение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к декарбоксилированию субстрата с выделением энергии в виде кванта света ( $\lambda_{\text{max}} = 485 \text{ нм}$ ). Высокий квантовый выход и практически полное отсутствие фонового сигнала обеспечивают высокую чувствительность детекции. Обелин сохраняет свою активность после введения химических и генетических модификаций, что позволяет получать на его основе репортерные молекулы, хорошо зарекомендовавшие себя в молекулярном анализе (*Frank, L.A. Sensors (Basel), 2010, 10(12), 11287-300*). К

моменту начала данной работы в литературе не было описано биоломинесцентных сенсоров на основе аптамеров, в которых в качестве метки использован обелин.

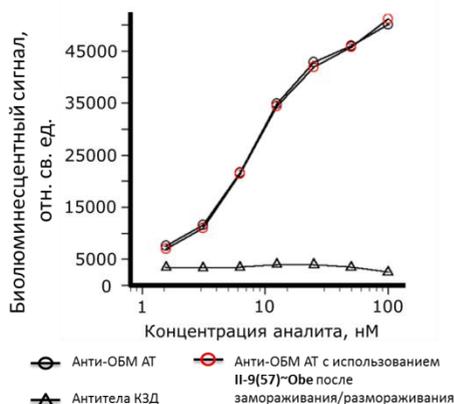
Для получения ковалентных конъюгатов аптамер-обелин были химически синтезированы производные аптамеров **II-9(57)** и **12-2(26)** с алифатической аминогруппой на 3'-конце. Эти производные были использованы в реакции с мутантным вариантом обелина, содержащим уникальную SH-группу, доступную для химического конъюгирования. Для синтеза ковалентных конъюгатов аптамер-обелин был использован бифункциональный реагент сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат.

При исследовании возможности использования конъюгатов с обелином в качестве репортерных компонентов была использована система детекции, в которой анти-ОБМ АТ иммобилизовали в лунках микропланшета с помощью моноклональных АТ к Fc-фрагментам IgG человека (рисунк 6). После инкубации и отмывки несвязавшихся антител в лунки добавляли растворы конъюгатов аптамеров с обелином, инкубировали в течение 40 минут и промывали. Сигнал, получаемый от образцов, измеряли на планшетном люминометре сразу после добавления  $\text{CaCl}_2$ .



**Рисунок 6.** Схема биоломинесцентной детекции анти-ОБМ антител в микропланшетном формате с использованием сэндвич-пары антитело/аптамер.

Конъюгат **II-9(57)~Obe** в качестве репортерного компонента обеспечивал высокую чувствительность и селективность детекции: сигнал, полученный от анти-ОБМ АТ, увеличивался при увеличении концентрации мишени, в то время как величина сигнала от контрольных АТ здоровых доноров была примерно на порядок ниже и практически не зависела от концентрации мишени (рисунк 7). При концентрации антител-мишеней 1.6 нМ биоломинесцентный сигнал выше контрольного в 2.2 раза; эту концентрацию можно рассматривать в качестве чувствительности детекции в данной системе. Конъюгат **II-9(57)~Obe** сохранял свою функциональную активность даже при замораживании/размораживании и хранении при 8°C в течение трех недель.



**Рисунок 7.** Анализ связывания анти-ОБМ АТ и АТ здоровых доноров с использованием конъюгата **II-9(57)~Обе\***. Отн. св. ед. – относительные световые единицы.

При использовании в качестве репортерного компонента конъюгата **12-2(26)~Обе** значения биоломинесцентного сигнала от целевых и контрольных АТ значительно не различались, при этом мы не наблюдали выраженной концентрационной зависимости сигналов. Можно

сделать вывод, что в качестве репортерного компонента для биоломинесцентной детекции анти-ОБМ антител может быть использован только конъюгат **II-9(57)~Обе**.

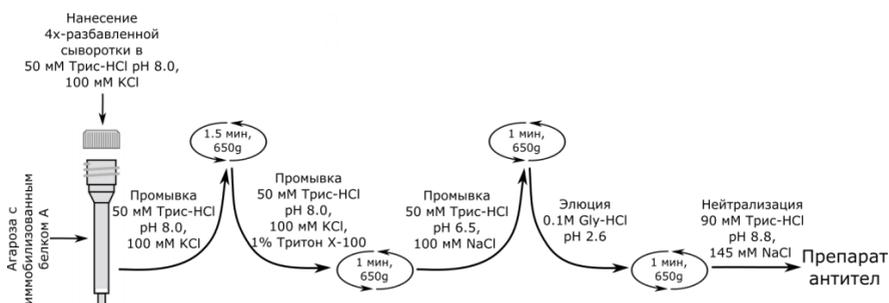
## 7. Создание аптасенсора на основе пары 2'-F-РНК-аптамеров к анти-ОБМ аутоантителам, характерным для РС

На следующем этапе работы мы исследовали возможность создания аптасенсора сэндвич-типа, содержащего аптамер как в качестве улавливающего, так и в качестве репортерного компонентов. Использование аптамера в качестве улавливающего аналит компонента при анализе образцов из сыворотки крови позволяет «обогащать» анализируемые пробы целевыми антителами. Исключение из конструкции сенсора антител делает его более стабильным, менее чувствительным к условиям транспортировки и хранения, а также обеспечивает более высокую степень воспроизводимости результатов. На данный момент в литературе описаны лишь единичные примеры аптасенсоров на основе пары аптамеров, аналогичных распространенным сенсорам для ИФА-диагностики на основе антител (*Seo, H.B. et.al. J. Biol. Eng., 2017, 11, 11*).

Принципиальная схема оптического микропланшетного сенсора на основе пары аптамеров подразумевает иммобилизацию одного из них в лунках планшета, внесение аналита, отмычку несвязавшихся молекул и добавление аптамера, несущего метку для оптической детекции. Иммобилизацию аптамеров в лунках планшета осуществляли за счет биотин-стрептавидиновых взаимодействий. Предварительно были получены конъюгаты аптамеров с биотином - **II-9(57)~bio** и **12-2(26)~bio**.

Поскольку дальнейшее развитие данного исследования подразумевало анализ большого количества образцов сывороток крови, а

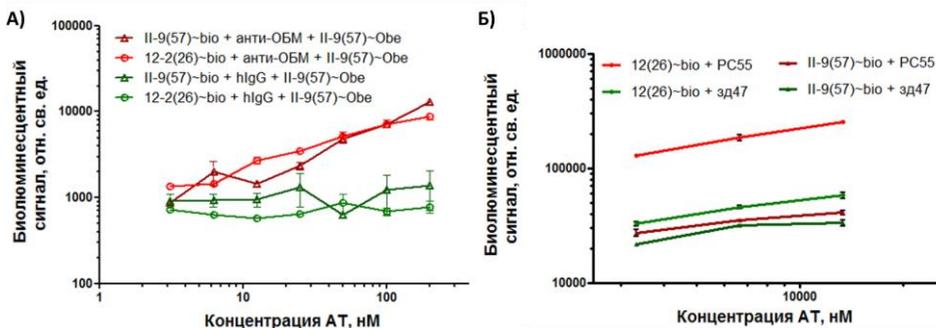
хроматографическая очистка антител на колонках является достаточно времязатратной, мы предложили упрощенный протокол выделения антител на спин-колонках с белком А. Он включает в себя нанесение образца сыворотки, 4х-кратно разбавленного буфером, промывку спин-колонки от неспецифического связывания других компонентов сыворотки крови, элюцию целевых антител и нейтрализацию полученного раствора (рисунок 8). Пробоподготовка по данному протоколу позволяет избежать влияния других компонентов сыворотки, стандартизировать рН и солевой состав индивидуальных образцов.



**Рисунок 8.** Схема протокола выделения антител на спин-колонках с использованием белка А, иммобилизованного на агарозе.

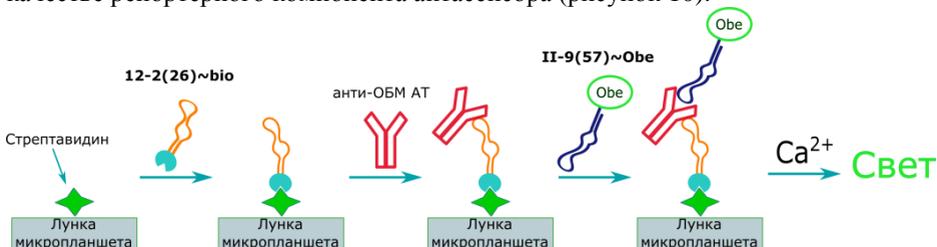
При выборе оптимальной конструкции биолюминесцентного сенсора на основе пары аптамеров были проанализированы анти-ОБМ АТ больных РС и коммерчески доступные IgG-антитела человека (hIgG). Кривые зависимости биолюминесцентного сигнала от концентрации АТ, полученные при использовании конъюгатов **II-9(57)~bio** и **12-2(26)~bio** в качестве улавливающих компонентов, приведены на рисунке 9А. В качестве репортерного компонента сенсора был использован конъюгат **II-9(57)~Obe**.

При иммобилизации на поверхности микропланшета каждого из аптамеров величина биолюминесцентного сигнала значительно возрастает с увеличением концентрации целевых антител-мишеней и практически не изменяется с увеличением концентрации контрольных АТ. Чтобы проверить, соблюдается ли эта закономерность для образцов более сложного состава, вышеописанным способом были проанализированы по одному образцу суммарных IgG-антител: от больного РС и от здорового донора. Полученные данные представлены на рисунке 9Б. При использовании в качестве улавливающего компонента аптамера **12-2(26)** была зафиксирована максимальная величина биолюминесцентного сигнала, а также значительное различие сигналов от целевых и контрольных АТ.



**Рисунок 9.** Зависимость величин биоломисцентных сигналов от концентрации аналита при использовании биотиновых конъюгатов аптамеров **II-9(57)-bio** и **12-2(26)-bio** в качестве «улавливающих» компонентов. **А)** Детекция анти-ОБМ АТ и суммарных АТ здоровых доноров. **Б)** Детекция суммарных АТ из крови пациента с РС (РС) и из крови здорового донора (зд). Репортерный компонент – конъюгат **II-9(57)-Obe**. Отн. св. ед. – относительные световые единицы.

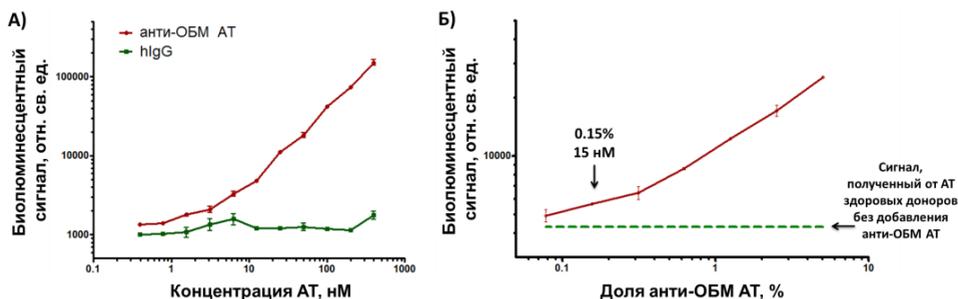
Оптимальная конструкция биоломисцентного аптасенсора на основе пары аптамеров включала в себя аптамер **12-2(26)**, иммобилизованный в лунке микропланшета, и конъюгат **II-9(57)** с фотопротеином обелином в качестве репортерного компонента аптасенсора (рисунок 10).



**Рисунок 10.** Схематическое изображение аптасенсора на основе пары аптамеров к анти-ОБМ АТ с использованием фотопротеина обелина в качестве репортерной группы.

Для дальнейшей оптимизации условий анализа в качестве аналита мы использовали смесь аффинно-очищенных анти-ОБМ антитела, выделенных из сывороток шести пациентов с РС. Это позволило исключить на этапе оптимизации случайные факторы, связанные с индивидуальными особенностями антител от каждого конкретного донора. В качестве контроля использовали суммарные антитела здоровых людей (hIgG). Как видно из данных биоломисцентного анализа (рисунок 11А), величина сигнала от анти-ОБМ АТ увеличивается с ростом концентрации аналита, а величина сигналов от контрольных АТ примерно одинаково низка и не имеет четко выраженной зависимости от концентрации.

Мы исследовали также способность созданного аптасенсора детектировать целевые АТ в присутствии большого избытка АТ того же типа. Для этого был использован модельный раствор, содержащий АТ здоровых доноров (hIgG), допированные различными количествами анти-ОБМ АТ (0 – 5%), общая концентрация антител во всех случаях составляла 1.5 мг/мл. Из полученных данных (рисунок 11Б) было определено, что сенсор на основе пары аптамеров способен детектировать до 0.15% (15 нМ) анти-ОБМ АТ в смеси с другими антителами. Это значение можно рассматривать как предел обнаружения метода.



**Рисунок 11.** Зависимость величин биолюминесцентных сигналов от общей концентрации антител (А) и от доли анти-ОБМ АТ в смеси с контрольными АТ здоровых доноров (Б). Отн. св. ед. – относительные световые единицы

## 8. Оптимизация протокола использования аптасенсора на основе пары 2'-F-РНК-аптамеров для анализа клинических образцов

Для получения наиболее селективного биолюминесцентного сигнала с использованием созданного сенсора на основе пары 2'-F-РНК-аптамеров необходимо было оптимизировать концентрации каждого из основных компонентов системы, а именно конъюгатов аптамеров **12-2(26)~bio**, **II-9(57)~Obe** и суммарных IgG-антител, вносимых в анализ.

При выборе оптимальной концентрации конъюгата **12-2(26)~bio** для иммобилизации из раствора на поверхность модифицированной стрептавидином лунки были протестированы различные концентрации конъюгата (25 – 100 нМ). Было показано, что использование 75 нМ раствора **12-2(26)~bio** обеспечивает наибольшее различие сигналов от суммарных антител больных РС и суммарных антител здоровых доноров.

Для определения оптимальной концентрации антител в анализируемых пробах была исследована серия образцов с различными концентрациями суммарных АТ от больных РС. Максимальное соотношение специфического и неспецифического сигналов достигалось при концентрации 11.5 мкМ (1.5 мг/мл). Для определения оптимальной концентрации репортерного компонента была проведена серия анализов с использованием различных

концентраций конъюгата **П-9(57)~Обе** (0.0125 – 0.2 нМ). Повышение концентрации репортерного компонента более 0.025 нМ не оказывало значительного влияния на соотношение сигналов от образцов от больных РС и здоровых доноров, поэтому в дальнейших экспериментах использовали 0.025 нМ конъюгат **П-9(57)~Обе**.

## **9. Анализ клинических образцов от больных РС и здоровых доноров с использованием биолюминесцентного аптасенсора на основе пары 2'-F-РНК-аптамеров**

На заключительном этапе работы мы провели тестирование созданного биолюминесцентного аптасенсора на выборке индивидуальных препаратов сывороток крови от больных РС, здоровых доноров и пациентов с другими неврологическими патологиями. Исследование было проведено в сотрудничестве с кафедрой неврологии КрасГМУ им. проф. Войно-Ясенецкого.

**Таблица 5.** Состав пациентов с различным типом течения РС, участвующих в эксперименте

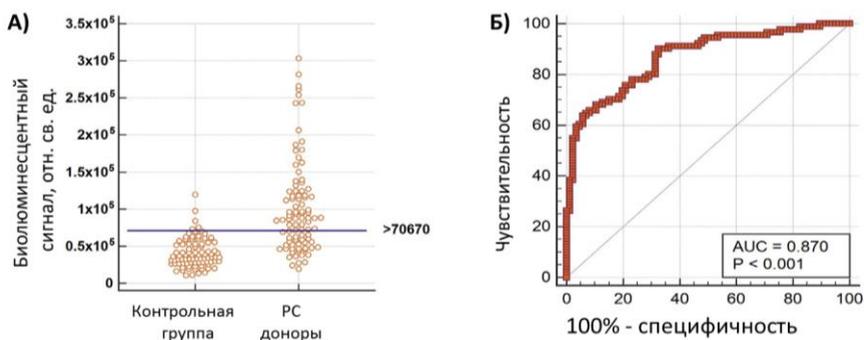
<b>Тип течения РС</b>	<b>Количество пациентов</b>
Ремиттирующий-рецидивирующий	74 (81.3 %)
Первично-прогрессирующий	6 (6.6 %)
Вторично-прогрессирующий	10 (11 %)
Прогрессирующий с обострениями	1 (1.1 %)

Всего были исследованы 178 образцов: 91 образец сывороток крови пациентов с клинически подтверждённым диагнозом РС согласно критериям Макдональда (в возрасте 19 – 62 лет, средний возраст 36 лет), 81 образец сывороток крови здоровых доноров, один образец сыворотки крови пациента с клинически-изолированным синдромом (КИС), 5 образцов сывороток крови пациентов с инсультом в качестве контроля (в возрасте 19 – 68 лет, средний возраст 27 лет). Группы содержали эквивалентное количество мужчин и женщин (63.7% и 62.8 % женщин в группе больных РС и контрольной группе, соответственно). Состав пациентов с различным типом течения РС приведен в таблице 5. Средний уровень прогрессирования заболевания по расширенной шкале степени инвалидизации (EDSS) – 2.5. Средняя продолжительность болезни – 6 лет.

Пробоподготовку образцов сывороток производили единообразно по описанному выше протоколу (рисунок 8). Результаты, полученные при анализе всех серологических образцов, представлены на рисунке 12А: каждое значение сигнала от индивидуальной пробы изображено в виде точки на графике, сигналы от пациентов с РС и от контрольной группы сгруппированы отдельно. Показано, что биолюминесцентные сигналы от образцов больных статистически достоверно выше сигналов от контрольной

группы, в то время как сигналы, полученные от образцов сывороток крови больных с инсультом и КИС, достоверно не отличались от сигналов контрольной группы.

Для оценки результатов анализа была построена ROC-кривая (Receiver Operator Characteristic) (рисунок 12Б), которая показывает зависимость количества истинно-положительных сигналов от количества ложноотрицательных. При оптимальном значении порогового классификатора чувствительность метода составила 63%, специфичность – 94.2%. Численный показатель площади под кривой составил 0.87, что указывает на очень хорошее различие между двумя группами. Положительно-прогностическое значение в 52% указывает на долю пациентов с подтвержденным диагнозом РС и положительным результатом анализа. Отрицательно-прогностическое значение в 96.3% соответствует доле пациентов, которые не имеют заболевания, и с отрицательным результатом анализа. Отношение правдоподобия – 10.96 позволяет считать анализ диагностически значимым.



**Рисунок 12.** А) Величины биолуминесцентных сигналов от препаратов суммарных антител из клинических образцов от больных РС и контрольной группы. Б) ROC-кривая, оценивающая разработанный метод.

Использование созданного аптасенсора может с высокой долей вероятности исключить диагноз РС у пациентов с отрицательным значением сигнала, что может быть использовано при дифференциальной постановке диагноза. Данные характеристики позволяют говорить о перспективности использования созданного аптасенсора для количественной оценки уровня анти-ОБМ антител в крови пациентов с РС и установления диагностической и прогностической значимости этого маркера.

## Выводы

1. Получены и исследованы две серии 2'-F-РНК-аптамеров к анти-ОБМ аутоантителам из крови больных рассеянным склерозом. Выявлены два аптамера, обладающих высокой аффинностью и высокой селективностью связывания анти-ОБМ аутоантител в сравнении с контрольными антителами здоровых доноров.
2. Проведена оптимизация нуклеотидной последовательности полученных 71-звенных 2'-F-РНК-аптамеров, в результате которой один из них укорочен до 57, а второй – до 26 нуклеотидов. Показано, что укороченные аптамеры сохраняют высокую аффинность и селективность связывания аутоантител-мишеней и способны распознавать их среди большого избытка аналогичных антител из сыворотки крови.
3. Впервые показана возможность использования 2'-F-РНК-аптамеров в качестве узнающих элементов для биолюминесцентных микропланшетных аптасенсоров с фотопротеином обелином в качестве репортерной группы. Предложена стратегия конструирования аптасенсоров на основе пары аптамеров. Установлено, что 26-звенный аптамер **12-2(26)** в составе биотинилированного конъюгата оптимален в качестве иммобилизованного на поверхности первичного компонента сенсора, а 57-звенный аптамер **II-9(57)**, ковалентно соединенный с обелином, – в качестве вторичного компонента. Определены оптимальные концентрации компонентов сенсора и анализируемых анти-ОБМ аутоантител, предложен протокол анализа, оценен предел обнаружения метода (15 нМ).
4. Биолюминесцентный микропланшетный сенсор на основе пары аптамеров протестирован на большой выборке образцов сывороток крови от пациентов с РС, пациентов с другими патологиями неврологического профиля и здоровых доноров. Разработан протокол пробоподготовки серологических образцов для проведения анализа. Использование полученного биолюминесцентного аптасенсора может с высокой долей вероятности исключить диагноз РС у пациентов с отрицательным значением сигнала (отрицательно-прогностическое значение – 96.3%).

## **Публикации по теме диссертации**

### Статьи:

1. Vorobjeva M., Krasitskaya V., Fokina A., Timoshenko V., Nevinsky G., Venyaminova A., Frank L. RNA aptamer against autoantibodies associated with multiple sclerosis and bioluminescent detection probe on its basis. Analytical Chemistry. 2014. V. 86. N 5. P.2590-2594.
2. Vorobyeva M., Timoshenko V., Vorobjev P., Venyaminova A. Aptamers against immunologic targets: diagnostic and therapeutic prospects. Nucleic Acid Ther. 2016. V. 26. N 1. P. 52 – 65
3. Krasitskaya V., Chaukina V., Abroskina M., Vorobyeva M., Piminskaya A., Kabilov M., Prokopenko S., Nevinsky G., Venyaminova A., Frank L. Bioluminescent aptamer-based sandwich-type assay of anti-myelin basic protein autoantibodies associated with multiple sclerosis. Analytica Chimica Acta. 2019. V. 1064. P. 112 – 118.

### Патенты:

1. Фокина А.А., Воробьева М.А., Поповецкая А.С., Тимошенко В.В., Невинский Г.А., Веньямина А.Г. РНК-аптамер, обладающий способностью узнавать характерные для рассеянного склероза аутоантитела. Патент РФ № 2549704, 2015 г.
2. Чаукина В. В., Воробьева М.А., Невинский Г.А., Веньямина А.Г. РНК-аптамер, обладающий способностью узнавать аутоантитела, характерные для рассеянного склероза. Патент РФ № 2644229, 2017 г.