

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

Тимошенко Валентина Викторовна

**Новые РНК-аптамеры и аптасенсоры для детекции аутоантител,
характерных для рассеянного склероза**

02.00.10 – биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель
к.х.н. Воробьева М.А.

Новосибирск 2020

Оглавление

Оглавление	2
Список используемых сокращений	5
Введение	7
1. Аптамеры к антителам (обзор литературы)	11
1.1. Отбор аптамеров к иммуноглобулинам при патологиях не аутоиммунного типа	12
1.1.1. Отбор аптамеров к IgE	12
1.1.2. Аптамеры к иммуноглобулинам класса M	15
1.1.3. Отбор аптамеров к IgG и их фрагментам	18
1.2. Отбор аптамеров к иммуноглобулинам, характерным для аутоиммунных заболеваний	27
1.3. Применение аптамеров, способных узнавать иммуноглобулины	35
1.3.1. Аффинные матрицы на основе аптамеров к иммуноглобулинам	35
1.3.2. Биоимиджинг с использованием аптамеров	36
1.4. Биосенсоры на основе аптамеров	37
1.4.1. Аптасенсоры к IgG	37
1.4.2. Биосенсоры для детекции IgE	38
1.4.2.1. Аптасенсоры для детекции IgE методом поверхностного плазмонного резонанса	40
1.4.2.2. Аптасенсоры для определения IgE с колориметрическим типом детекции	45
1.4.2.3. Аптасенсоры для определения IgE с люминесцентным типом детекции	50
Глава 2. Экспериментальная часть	63
2.1. Исходные материалы	63
2.2. Основные методы работы	65
2.3. Методики эксперимента	67
2.3.1. Твердофазный фосфитамидный синтез 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров	67
2.3.1.1. Приготовление растворов мономеров	67

2.3.1.2. Синтез 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров и их аналогов.....	67
2.3.1.3. Деблокирование олигонуклеотидов.....	68
2.3.2. Выделение ДНК-праймеров.....	68
2.3.3. Выделение оцДНК-матриц для синтеза индивидуальных аптамеров. Выделение 2'-F-РНК-аптамеров.....	69
2.3.4. Синтез дцДНК-матриц методом ПЦР высокой точности.....	69
2.3.5. Транскрипция <i>in vitro</i> и выделение 2'-F-пиримидинсодержащего РНК-транскрипта.....	70
2.3.6. Введение радиоактивной метки по 5'-концу 2'-модифицированного РНК-аптамера.....	71
2.3.6.1. Дефосфорилирование.....	71
2.3.6.2. Кинирование.....	71
2.3.7. Введение радиоактивной метки по 3'-концу 2'-модифицированного РНК-аптамера.....	71
2.3.8. Определение констант диссоциации комплексов 2'-F-модифицированных РНК с антителами.....	72
2.3.8.1. Определение K_D методом связывания на нитроцеллюлозных фильтрах.....	72
2.3.8.2. Определение K_D методом задержки в геле.....	73
2.3.9. Получение ОБМ-сефарозы.....	74
2.3.10. Выделение антител.....	74
2.3.10.1. Выделение антител для проведения исследований связывания с аптамерами.....	74
2.3.10.2. Выделение антител для проведения серийного биолюминесцентного микропланшетного анализа.....	75
2.3.11. <i>In vitro</i> селекция 2'-F-РНК-аптамеров.....	76
2.3.12. Синтез конъюгатов 2'-F-РНК-аптамеров с обелином.....	77
2.3.13. Синтез биотинилированных конъюгатов аптамеров.....	77
2.3.14. Тестирование конъюгатов 2'-F-РНК-аптамеров с обелином в качестве репортерных компонентов биолюминесцентного аптасенсора.....	77

2.3.15. Анализ образцов антител с использованием аптасенсора на основе пары аптамеров.....	78
2.3.16. Статистическая обработка данных	78
Глава 3. Создание 2'-F-РНК-аптамеров к анти-ОБМ аутоантителам, характерным для РС, и разработка биосенсоров на их основе (результаты и обсуждение)	80
3.1. Получение серии 2'-F-РНК-аптамеров	81
3.2. Связывание 2'-F-РНК-аптамеров с анти-ОБМ антителами из крови больных РС.....	86
3.3. Исследование селективности связывания аптамера П-9 с анти-ОБМ аутоантителами	88
3.4. Минимизация олигонуклеотидной последовательности аптамера П-9.....	89
3.5. Дополнительная <i>in vitro</i> селекция аптамеров на анти-ОБМ аутоантитела	94
3.6. Минимизация олигонуклеотидной последовательности аптамера 12-2	98
3.7. Создание биолюминесцентных аптасенсоров с использованием полученных 2'-F-РНК-аптамеров в качестве узнающих элементов	103
3.8. Создание аптасенсора на основе пары 2'-F-РНК-аптамеров к анти-ОБМ аутоантителам, характерным для РС.....	109
3.9. Оптимизация протокола использования аптасенсора на основе пары 2'-F-РНК-аптамеров для анализа клинических образцов.....	116
3.10. Анализ клинических образцов от больных РС и здоровых доноров с использованием биолюминесцентного аптасенсора на основе пары 2'-F- РНК-аптамеров.....	120
Заключение.....	124
Выводы.....	126
Публикации по теме диссертации	127
Список используемой литературы	129
Приложения	144

Список используемых сокращений

В работе использованы следующие сокращения:

2'-F-CTP – 2'-F-цитидинтрифосфат
2'-F-UTP – 2'-F-уридинтрифосфат
2'-F-РНК-аптамер – РНК-аптамер, содержащий 2'-F-пиримидиновые нуклеотиды
A₂₆₀ – оптическое поглощение раствора на длине волны 260 нм
ABTS – 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфо кислота)
АТФ – аденозинтрифосфат
AUC – площадь под кривой (Area Under Curve)
Био – биотин
ВР – бромфеноловый синий
СТАВ – гексадецилтриметилбромид аммония
СТР – цитидинтрифосфат
СЕМ-клетки – клеточная линия острого лимфобластного лейкоза человека
dNTP – дезоксирибонуклеозидтрифосфат
DTT – дитиотреит
EDSS – расширенная шкала степени инвалидизации
ELISA – иммуноферментный анализ (enzyme-linked immunosorbent assay)
EMSA – анализ электрофоретической подвижности (electrophoretic mobility shift assay)
Fab – антиген-связывающий фрагмент (fragment antigen binding)
Fc – фрагмент, способный к кристаллизации (fragment crystallizable)
FITC – изотиоцианат флуоресцеина
Gly – глицин
GTP – гуанозинтрифосфат
hIgG – IgG человека (human IgG)
IgA – иммуноглобулины класса А
IgE – иммуноглобулины класса Е
IgG – иммуноглобулины класса G
IgM – иммуноглобулины класса M
LIGS – лиганд-направленный отбор (ligand-guided selection)
MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
mIgM – мембраносвязанные антитела класса M
N-MeIm – N-метилимидазол
NPV – отрицательно-прогностическое значение
Obe – обелин
PEG – полиэтиленгликоль
PPV – положительно-прогностическое значение
SELEX– systematic evolution of ligands by exponential enrichment (систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении)
SAM – самособирающийся монослой (self-assembled monolayer)
sIgM – растворимая форма IgM
TMPG – 3,4,5-триметоксифенилглиоксаль
VSV – вирус везикулярного стоматита
UTP – уридинтрифосфат
ХС – ксиленцианол
АИЗ – аутоиммунное заболевание
АСМ – атомно-силовая микроскопия
АТ – антитела

АХР – ацетилхолиновый рецептор
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДХУ – дихлоруксусная кислота
дцДНК – двуцепочечная ДНК
е.а. – единица активности
КИС – клинически-изолированный синдром
МНЧ – магнитные наночастицы
МРТ – магнитно-резонансная томография
НК – нуклеиновая кислота
НЧЗ – наночастицы золота
ОБМ – основной белок миелина
о.е. – оптическая единица
оцДНК – одноцепочечная ДНК
ПААГ – полиакриламидный гель
ПДА – полидиациетилен
ПДМС – полидиметилсилоксан
ППР – поверхностный плазмонный резонанс
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РНК – рибонуклеиновая кислота
РС – рассеянный склероз
СКВ – системная красная волчанка
Трис – трис(оксиметил)аминометан
УФ – ультрафиолет
ФП – флуоресцентная поляризация
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

Введение

Аптамеры – синтетические молекулы ДНК и РНК, способные высокоспецифично узнавать определенные молекулы-мишени за счет образования уникальной пространственной структуры. Аптамеры находят широкое применение для детекции различных молекул-мишеней и ингибирования их функциональной активности [1], а также обладают большим потенциалом для использования в качестве основы чувствительных и специфических биосенсоров. К их уникальным преимуществам относятся возможность отбора аптамеров, практически для любой заданной мишени, возможность химического или химико-ферментативного синтеза в препаративных количествах, возможность введения химических модификаций, длительный срок хранения и устойчивость в широком диапазоне условий [2,3].

Создание НК-аптамеров к белковым мишеням, ассоциированным с развитием различных заболеваний человека, является одним из интенсивно развивающихся направлений современной биоорганической химии, молекулярной биологии и биомедицины [4,5]. Получение высокоаффинных НК-аптамеров, способных специфично связывать такие белки, открывает путь к созданию новых способов диагностики и терапии соответствующих патологий. В частности, в качестве белков-мишеней представляют значительный интерес специфические аутоантитела, характерные для аутоиммунных заболеваний (АИЗ). Этиология АИЗ в большинстве случаев не ясна. Общим их признаком является наличие аутоантител классов IgG, IgA и IgM, направленных против собственных молекул организма, при этом разные заболевания характеризуются наборами аутоантител различной специфичности, что позволяет рассматривать аутоантитела как потенциальные диагностические маркеры [6]. Следует отметить, что на сегодняшний день подходы к ранней диагностике АИЗ и контролю их течения развиты недостаточно.

Рассеянный склероз (РС) – хроническое аутоиммунное неизлечимое нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы, при котором поражается миелиновая оболочка нервных волокон. Заболевание дебютирует, как правило, в молодом возрасте и почти всегда приводит к инвалидизации [7], а причины его развития пока до конца не известны [8,9]. Течение болезни сложно прогнозируемо и может изменяться с большим разнообразием проявления симптомов. Ранняя диагностика и своевременное начало терапии позволяют существенно замедлить развитие заболевания и улучшить качество жизни пациентов. В то же время диагностика РС представляет собой сложную комплексную задачу и требует анализа совокупности клинических и лабораторных

данных, включающих МРТ [10] и анализ спинномозговой жидкости [11]. При этом 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 [12,13]. Относительно недавно было обнаружено, что для РС характерно наличие в организме специфических аутоантител-протеаз, разрушающих миелиновую оболочку нервных волокон за счет деградации основного белка миелина (ОБМ) [14,15]. В ряде работ предлагается рассматривать анти-ОБМ аутоантитела как потенциальные биомаркеры прогрессирования РС (см., например, обзор [16]).

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

Целью работы является 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-РНК¹ 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 и практическая значимость работы

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

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

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 фотопротеина 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 чувствительностью и специфичностью. Данные характеристики позволяют рассматривать полученный аптасенсор как потенциальный инструмент определения количества 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, получено 2 патента. 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).

Личный вклад автора

Основная часть экспериментальной работы и анализ полученных данных были проведены лично автором: химический синтез и выделение 2'-F-РНК-аптамеров, дополнительная *in vitro* селекция, анализ предположительных вторичных структур 2'-F-РНК-аптамеров, определение констант диссоциации комплексов аптамер-антитело, аффинное выделение антител из сывороток крови больных РС и здоровых доноров для проведения исследования связывания с 2'-F-РНК-аптамерами и для проведения серийного билюминесцентного микропланшетного анализа. Синтез ДНК-матриц и праймеров был проведен в ЛХРНК ИХБФМ СО РАН к.х.н. М.А. Воробьевой и к.х.н. М.И. Мещаниновой. Химико-ферментативный синтез серии 2'-F-РНК-аптамеров был проведен совместно с Поповецкой А. С. Эксперименты по синтезу конъюгатов аптамеров с фотопротеином обелином и по билюминесцентной детекции были проведены совместно с к.б.н. Красицкой В.В. в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН ФИЦ «Красноярский научный центр».

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.

1. Аптамеры к антителам (обзор литературы)

Антитела (или иммуноглобулины) являются важнейшими белками иммунной системы. Их основные функции – специфическое узнавание различных патогенов, взаимодействие с ними и последующая нейтрализация. Помимо основной защитной функции, антитела играют важную роль при развитии аутоиммунных заболеваний (АИЗ), что диктует необходимость получения соединений, способных специфично детектировать и ингибировать функциональную активность антител. Искусственно полученные антитела могут быть применены как в аналитических, так и в терапевтических целях, для этого необходимо применять системы их очистки и контроля качества. Молекулы, узнающие антитела определенного вида, могут быть использованы при создании аффинных матриц для выделения антител, анализа взаимодействий антиген-антитело, разработке подходов к ингибированию функциональной активности антител, а также для контроля качества препаратов на основе антител. В роли таких молекулярных узнающих элементов особый интерес представляют НК-аптамеры, обладающие рядом описанных нами выше уникальных свойств. В работе [17] впервые был получен РНК-аптамер к иммунной сыворотке, содержащей протеин-связывающие антитела, и продемонстрирована его способность не только специфично связываться с антителами, но и конкурировать за связывание с антигеном.

Основная схема селекции аптамеров *in vitro* (метод SELEX) включает в себя следующие стадии: инкубация комбинаторной НК-библиотеки с мишенью, отделение комплексов мишень-аптамер от несвязавшихся нуклеотидных последовательностей и амплификация связавшихся молекул. Чтобы свести к минимуму возможность неспецифического связывания аптамеров с другими белками, в цикле отбора часто используют стадию негативной селекции - инкубацию комбинаторной библиотеки НК со схожими с мишенью белками (рисунок 1.1).

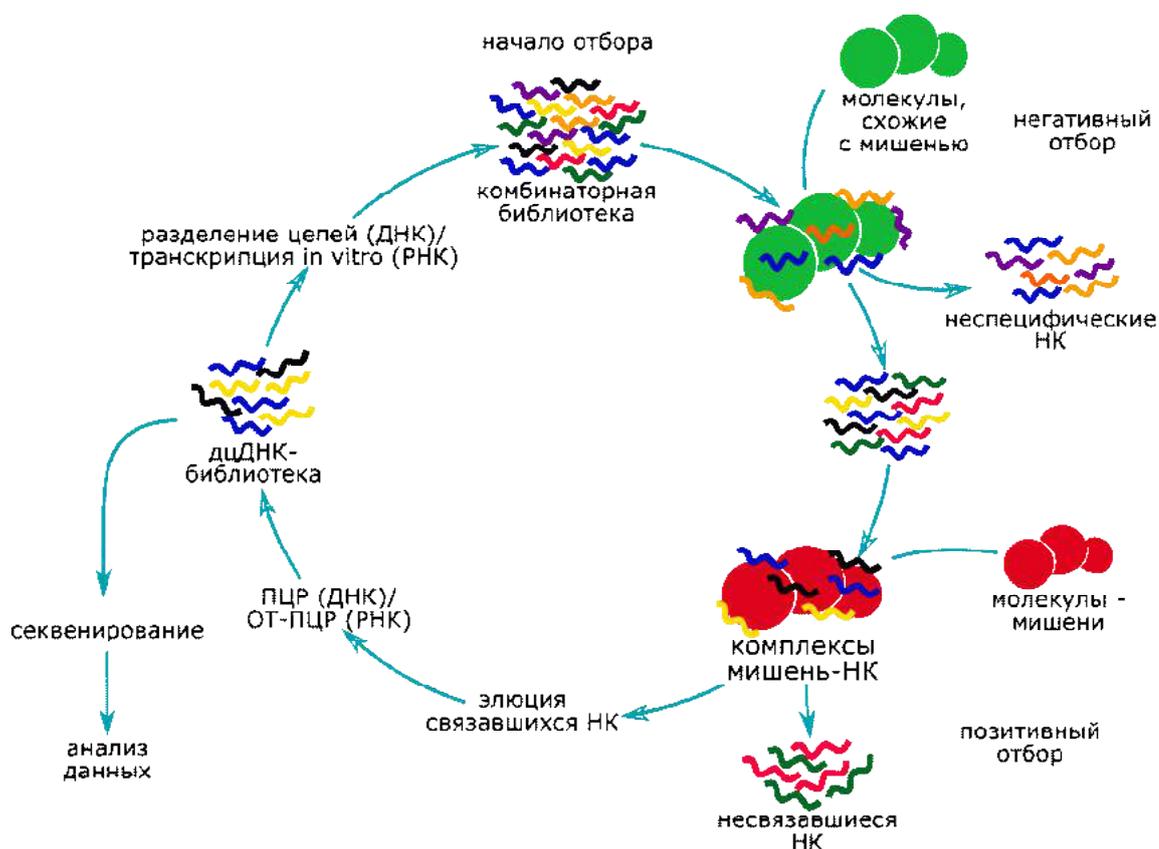


Рисунок 1.1. Схематическое изображение получения аптамеров методом SELEX.

В настоящее время известно широкое разнообразие схем селекции [18,19] и способов увеличения аффинности и специфичности получаемых аптамеров (например, введение в отбор стадии контрселекции) [20].

В данном обзоре собраны и проанализированы данные по селекции, дизайну и свойствам аптамеров к иммуноглобулинам различных типов, а также возможностям их использования для решения практических задач молекулярной биологии и биотехнологии.

1.1. Отбор аптамеров к иммуноглобулинам при патологиях не аутоиммунного типа

1.1.1. Отбор аптамеров к IgE

Важной с практической точки зрения иммунологической мишенью для селекции аптамеров являются иммуноглобулины класса E, которые играют важную роль в развитии аллергических реакций организма. Иммуноглобулины класса E — это класс иммуноглобулинов человека с молекулярной массой 200 кДа, которые состоят из двух тяжёлых и двух лёгких полипептидных цепей, сгруппированных в домены (рисунок 1.2), каждый из которых содержит приблизительно 110 аминокислот.

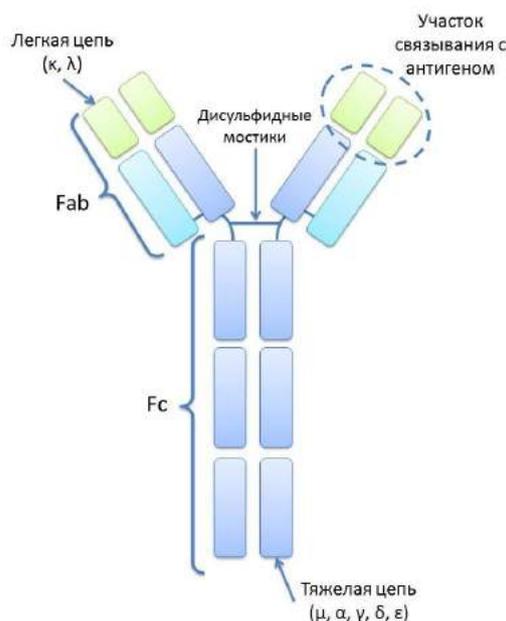


Рисунок 1.2. Схематическое изображение иммуноглобулина класса E.

В норме IgE присутствует в незначительных количествах в сыворотке крови и секретируемых жидкостях. Обычная концентрация IgE составляет 0.001% от всех иммуноглобулинов сыворотки крови. Уровень IgE значительно повышен при аллергиях или паразитарных инфекциях, поэтому уровни общего и специфического IgE используют в качестве диагностических показателей. Современная алергодиагностика для определения IgE использует тест-системы на основе антител (ИФА или иммуноблоттинг).

В работе [21] для селекции аптамеров к IgE-антителам человека были использованы три различные комбинаторные библиотеки: оцДНК-библиотека с 40-звенным рандомизированным участком и две РНК-библиотеки с длиной рандомизированного участка 40 или 60 нуклеотидов, в которых все пиримидиновые нуклеотиды были заменены их 2'-NH₂-аналогами для повышения устойчивости аптамеров в биологической среде (2'-NH₂-РНК-библиотеки). Для выделения комплексов аптамер-антитело в ходе селекции был использован метод фильтрования на нитроцеллюлозных фильтрах. В случае 2'-NH₂-РНК-библиотек было проведено 9 раундов селекции, в случае ДНК-библиотеки - 15 раундов. Значения равновесных констант диссоциации для комплексов 2'-NH₂-РНК-аптамеров с мишенью лежали в диапазоне 50-225 нМ, причем сродство аптамеров к антителам не коррелировало с длиной рандомизированного участка. Путем удаления части нуклеотидов с 3'- и 5'-концов аптамеров были получены две минимизированные последовательности **IGEL1.2** и **IGEL2.2** (35 и 25 нуклеотидов, соответственно) Они обладали даже несколько более высоким сродством к антителам-мишеням по сравнению с полноразмерными аналогами (для **IGEL1.2** - K_D = 30 нМ, для **IGEL2.2** – K_D = 35 нМ). На основании анализа нуклеотидного состава минимизированных

аптамеров и компьютерного моделирования их вторичной структуры авторы предположили, что наиболее вероятной пространственной структурой для **IGEL1.2** и **IGEL2.2** является G-квадруплекс (см., например, рисунок 1.3А). В случае ДНК-аптамеров большинство полученных после клонирования и секвенирования обогащенной библиотеки последовательностей содержали в рандомизированной области один и тот же 21-звенный консервативный мотив. В результате минимизации был получен 37-нуклеотидный аптамер **D17.4** (рисунок 1.3Б), сродство которого к антителам было таким же, как у исходных ДНК-аптамеров ($K_D = 10$ нМ).

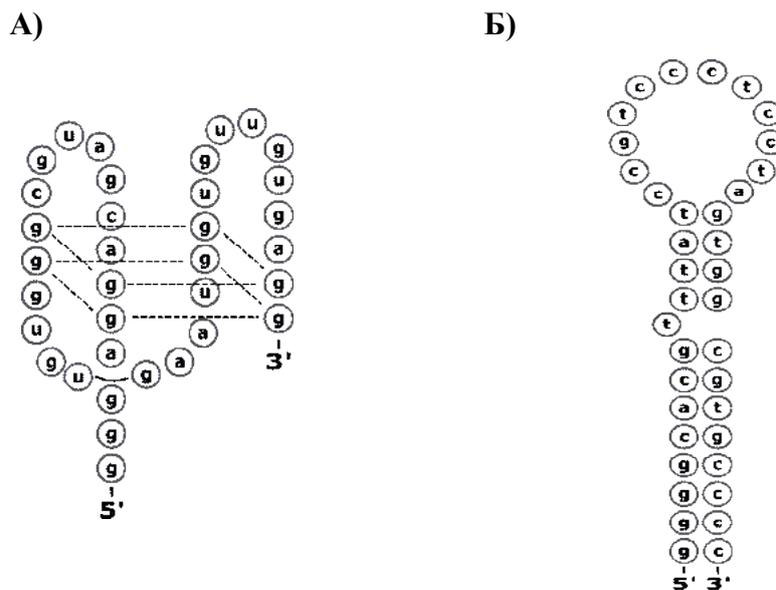


Рисунок 1.3. Предположительные вторичные структуры аптамеров к IgE [21].

А) 2'-NH₂-РНК-аптамер **IGEL 1.2**.

Б) ДНК-аптамер **D17.4**.

Было показано, что все полученные аптамеры высокоспецифичны по отношению к IgE человека и практически не связываются с IgE-антителами мыши и крысы, а также с IgG-антителами человека. Исследование их биологической активности проводили на клеточной линии базофильной лейкемии крысы SX-38, экспрессирующей α -, β - и γ -субъединицы Fc ϵ RI рецептора. Было показано, что 2'-аминосодержащий аптамер **IGEL1.2** и ДНК-аптамер **D17.4** способны блокировать взаимодействие IgE с его клеточным рецептором Fc ϵ RI. Это позволило авторам сделать вывод о перспективности использования полученных аптамеров в качестве основы для средств терапии IgE-опосредованных аллергических заболеваний. Кроме того, на основе аптамера **D17.4** в настоящее время создан широкий спектр аптасенсоров для детекции IgE (более подробно см. раздел «Применение аптамеров к иммуноглобулинам»).

Позднее константа диссоциации аптамера **D17.4** была измерена другими независимыми методами: капиллярным электрофорезом ($K_D = 8.6$ нМ) [22], градиентным

микропроточным электрофорезом ($K_D = 50$ нМ) [23], автоматическим микрочиповым электрофорезом ($K_D = 112$ нМ) [24], все полученные значения K_D были в наномолярном диапазоне. В работах [25,26] было показано, что добавление на 5'-конец аптамера **D17.4** олиготимидиновой последовательности приводит к дополнительному увеличению аффинности, однако этот эффект нельзя назвать ярко выраженным (снижение K_D с 50 до 15 нМ). Варьирование K_D в пределах одного порядка обусловлено различными особенностями методов измерения, поэтому при сравнении значений K_D важно учитывать, каким способом она были определены.

В работах [27,28] методами капиллярного либо микропроточного электрофореза были получены ДНК-аптамеры к IgE с другими нуклеотидными последовательностями. Для отбора была использована ДНК-библиотека с 40-звенным рандомизированным участком. Аффинность полученных аптамеров была определена электрофоретически и варьировала в диапазоне 20-60 нМ.

1.1.2. Аптамеры к иммуноглобулинам класса М

До 10% фракции иммуноглобулинов сыворотки крови составляют иммуноглобулины класса М – класс наиболее высокомолекулярных антител (970 кДа), появляющихся при первичном иммунном ответе В-лимфоцитов на ранее неизвестный антиген. IgM представляют собой пентамеры основной четырёхцепочечной субъединицы, содержащей две μ -цепи, каждая из субъединиц содержит по два антигенсвязывающих центра. В организме IgM представлены в двух формах: свободная (пентамерная) форма, циркулирующая в кровотоке (sIgM), и мономерная мембраносвязанная форма на поверхности В-клеток, которая выполняет функцию антигенраспознающего рецептора (mIgM).

Авторы работы [29] получили ДНК-аптамеры к IgM при селекции аптамеров, специфично связывающихся с Ramos-клетками – В-клеточной линией лимфомы. В процессе отбора была использована оцДНК-библиотека с 45-звенным рандомизированным участком, фланкированным двумя 20-звенными константными участками. После инкубации оцДНК-библиотеки с целыми клетками-мишенями клетки промывали и центрифугировали для отделения несвязавшихся олигонуклеотидов. Аффинные последовательности элюировали при нагревании и амплифицировали. После 20 раундов отбора, клонирования и секвенирования были отобраны 32 аптамерных последовательности для дальнейшего исследования. Связывание аптамеров с мишенями исследовали методом проточной цитометрии, в качестве контроля использовали две другие клеточные линии: СЕМ-клетки (клеточная линия острого лимфобластного лейкоза

человека) и клетки Toledo (клеточная линия диффузной крупноклеточной лимфомы человека). Аптамером, обладающим наибольшей аффинностью и специфичностью, оказался аптамер **TD05**, для которого константа диссоциации комплексов с Ramos-клетками составляла 74.7 нМ. При идентификации конкретной мишени аптамеров на клеточной поверхности оказалось, что это IgM-антитела, связанные с клеточной мембраной (mIgM) [30]. Было показано, что аптамер **TD05**, отобранный при температуре 4°C, не связывается с мишенью при физиологических условиях (37°C), а также не способен отличить IgM (sIgM) в растворе и IgM-антитела, связанные с мембраной клеток.

В результате последовательного укорочения двуцепочечного фрагмента в составе ДНК-аптамера и замены некоторых пиримидиновых нуклеотидов в его составе на их LNA-аналоги (от англ. locked nucleic acid – модифицированный нуклеотид, в котором 2'-О и 4'-С атомы рибозы соединены через метиленовый мостик) был получен более стабильный и нуклеазоустойчивый аптамер **TD05.1** (рисунок 1.4).

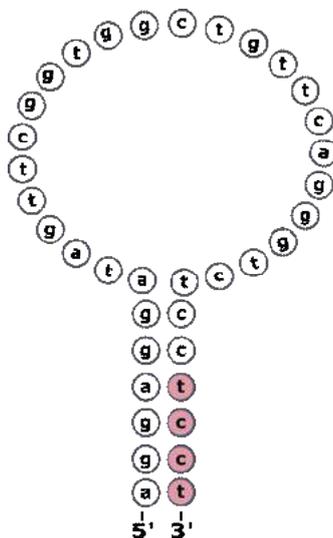


Рисунок 1.4. Вторичная структура аптамера смешанного типа **TD05.1**, специфичного к IgM. Закрашенными кругами обозначены LNA-модифицированные аналоги нуклеотидов, в остальных положениях дезоксирибонуклеотиды [30].

Три- и тетрамерные формы этого аптамера с олигоэтиленгликолевым линкером оптимизированной длины демонстрировали высокое сродство к mIgM при 37°C, при этом не узнавали секретлируемую форму IgM (sIgM) [31]. Специфичность три- и тетрамеров к В-клеткам была показана на клеточных линиях лимфомы и клинических образцах пациентов с лейкозией, что говорит о потенциальной возможности использования аптамера **TD05.1** для диагностирования соответствующих заболеваний.

На следующем этапе получения аптамеров к mIgM авторы работы [32] разработали новый метод LIGS (ligand-guided selection – лиганд-направленный отбор). Метод основан на использовании в ходе селекции вторичных лигандов-компетиторов для получения

более высокоаффинных аптамеров. С целью сохранить нативную форму mIgM отбор проводили при 4°C. В описываемом случае на стадии отделения специфических последовательностей в систему добавляли высокоаффинный вторичный лиганд – антитела к mIgM (анти- mIgM), которые вытесняли аптамеры, связывающиеся в тех же сайтах, что и антитела. Сначала проводили 13 раундов позитивного отбора на Ramos-клетки, затем частично обогащенную библиотеку разделяли на фракции. Первую фракцию амплифицировали, клонировали, секвенировали и получали последовательности, специфичные к клеткам-мишеням. Вторую фракцию инкубировали с клетками-мишенями, а затем в реакционную смесь добавляли избыток конкурирующих анти-mIgM антител (см. схему на рис. 1.5).

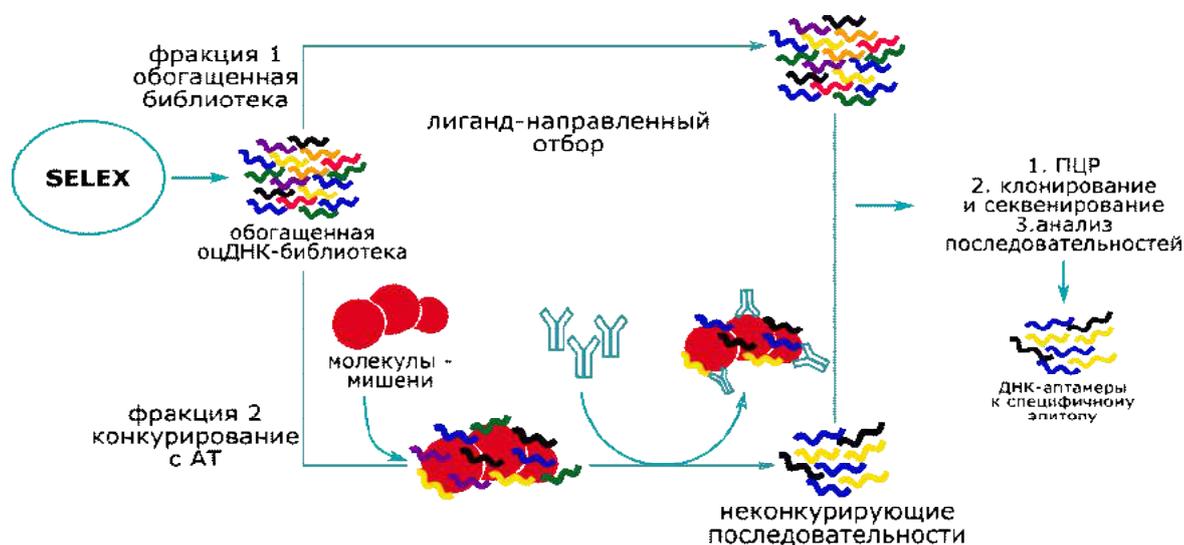


Рисунок 1.5. Схема отбора ДНК-аптамеров к mIgM методом лиганд-направленного отбора [32].

Последовательности, связывающиеся с мишенями в присутствии анти-mIgM антител, амплифицировали, клонировали, секвенировали, затем анализировали степень обогащения библиотеки. В этом случае также было проведено 13 раундов отбора. После секвенирования и анализа полученных данных для дальнейшего определения аффинности и специфичности было отобрано 33 аптамера, в качестве контроля специфичности связывания использовали клетки Jurkat.E6 (Т-лимфоциты). Связывание аптамеров с клетками-мишенями определяли методом проточной цитометрии, был идентифицирован аптамер **R1**, который обладал наибольшей специфичностью к клеткам-мишеням и блокировал связывание mIgM с их антигенами.

Дальнейший дизайн аптамера **R1** был направлен на увеличение его аффинности и минимизацию нуклеотидной последовательности [33]. При последовательном укорочении аптамера **R1** ($K_D = 315$ нМ) после удаления 5'-концевого константного участка и 17 нуклеотидов с 3'-конца был получен аптамер **R1.2** с повышенной аффинностью 36 нМ

(при 4°C). При физиологической температуре (37°C) константа диссоциации составила 66 нМ, специфичность аптамера при этом сохранялась. Дальнейшее удаление семи нуклеотидов с 3'-конца понизило аффинность аптамера **R1.3** по сравнению с предыдущим вариантом ($K_D = 134$ нМ), из чего можно заключить, что данные нуклеотиды необходимы для стабилизации комплекса аптамера с мишенью. Интересно, что аптамер **R1.2** проявлял сродство как к мембраносвязанной, так и к секретируемой форме IgM.

1.1.3. Отбор аптамеров к IgG и их фрагментам

Иммуноглобулины класса G (IgG) - основные иммуноглобулины крови, составляющие до 75% антител плазмы крови человека. Молекула IgG (150 кДа) состоит из четырех полипептидных цепей: две идентичные тяжелые цепи (H-цепи) массой около 50 кДа и две легкие цепи (L-цепи) массой около 25 кДа. Полипептидные цепи соединены друг с другом через дисульфидные связи (рисунок 1.6). Всего различают пять типов тяжёлых цепей (α -, γ -, δ -, ϵ - и μ -цепи) и два типа лёгких цепей (κ -цепь и λ -цепь). Каждая L-цепь совместно с N-концевой частью H-цепи образуют антиген-связывающий фрагмент – Fab-фрагмент (antigen binding fragment), C-концевые половины обеих H-цепей образуют Fc-фрагмент, который выполняет функции связывания с клеточной поверхностью, взаимодействия с системой комплемента и участвует в переносе антител клетками

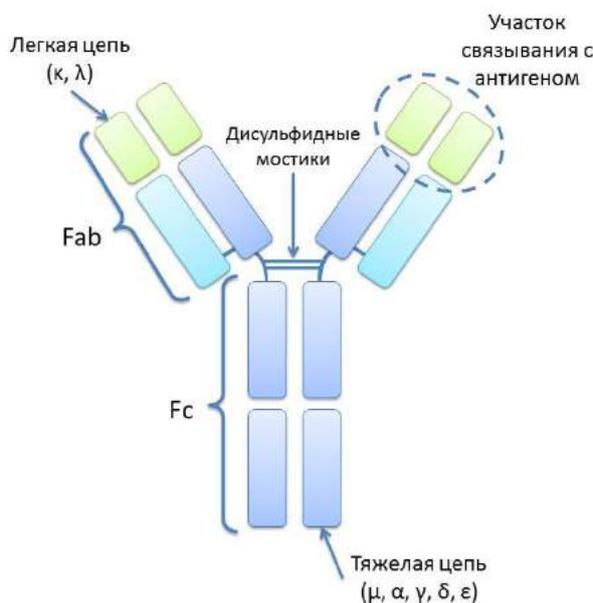


Рисунок 1.6. Схематическое изображение иммуноглобулина класса G.

Иммуноглобулины класса G играют основополагающую роль в гуморальном иммунитете при инфекционных заболеваниях, проникают через плаценту и формируют антиинфекционный иммунитет у новорожденных, способны нейтрализовать бактериальные экзотоксины, связывать белки системы комплемента. В биотехнологии IgG

нашли широкое применение в молекулярно-биологических исследованиях, в производстве терапевтических препаратов на основе моноклональных антител, а также при создании специфичных систем детекции различных биомолекул.

В работе [34] описано получение РНК-аптамеров к IgG кролика с целью последующего их использования для выделения данных антител, а также в качестве компонентов аналитических систем, содержащих эти антитела. При отборе была использована комбинаторная РНК-библиотека с 30-звенным переменным участком. Для отделения комплексов аптамер-антитело от несвязавшихся последовательностей был использован метод фильтрования на нитроцеллюлозных фильтрах. После 10 раундов селекции было проведено клонирование и секвенирование обогащенной библиотеки. Сродство индивидуальных РНК-аптамеров к антителам-мишеням оценивали методом ППР. Наиболее высокая аффинность ($K_D=15$ пМ) была показана для аптамера **R18**, вторичная структура которого представлена на рисунке 1.7.

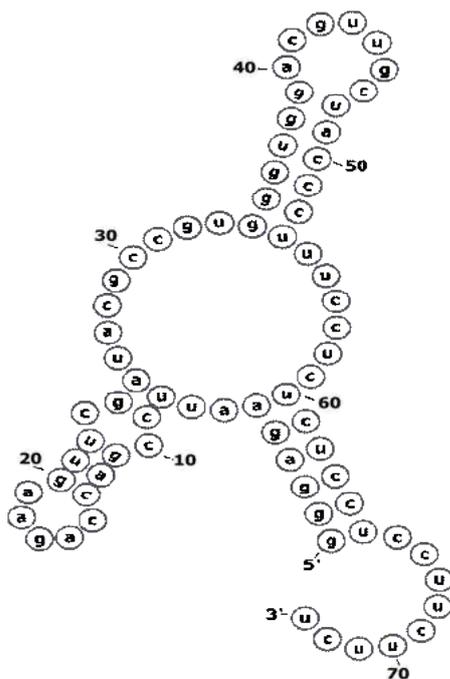
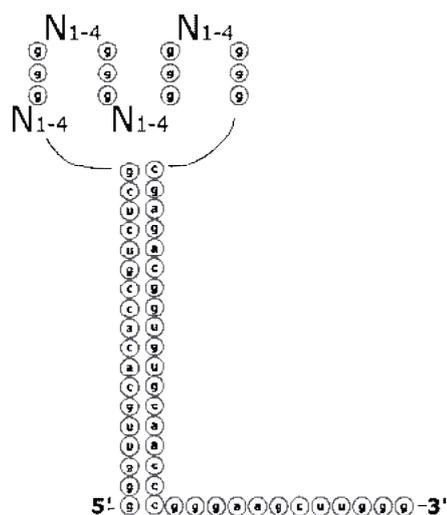


Рисунок 1.7. Предполагаемая вторичная структура РНК-аптамера **R18** к IgG кролика [34].

При изменении нуклеотидной последовательности аптамера или укорочении ее в любом из участков эффективность связывания значительно снижалась; на основании этого авторы заключили, что вся молекула аптамера **R18** целиком участвует во взаимодействии с иммуноглобулином. При этом аптамер опознавал только нативную форму антитела и не связывался с денатурированными антителами. Связывание было селективным по отношению к IgG кролика, т.к. не наблюдалось взаимодействие с IgG мыши или козы.

В работе [35] для получения аптамеров к моноклональным мышинным антиферритиновым антителам Н107 были использованы РНК-библиотеки, которые заранее содержали определенные последовательности в рандомизированной области. Авторы работы предположили, что такой дизайн библиотеки в будущем может облегчить анализ вторичных структур РНК-аптамеров, отобранных из этих библиотек, за счет формирования предсказуемых элементов пространственной структуры. Для проверки этого предположения авторами работы были сконструированы две библиотеки с различными структурными элементами. Одна из библиотек содержала G-богатые участки для образования G-квадруплексов, чередующиеся с короткими (1-4 нуклеотида) рандомизированными участками (библиотека **GQCL**); при этом праймер-связывающие домены образовывали комплементарный комплекс (рисунок 1.8А). Вторая РНК-библиотека (**SSL**) содержала 30-нуклеотидный рандомизированный участок, фланкированный двумя праймер-связывающими доменами, каждый из которых образовывал стабильную шпильку (рисунок 1.8Б). В обоих случаях на 3'-конец библиотеки была введена дополнительная одноцепочечная 11-нуклеотидная последовательность для эффективной гибридизации с праймером перед реакцией обратной транскрипции. В ходе селекции РНК-библиотеки инкубировали с антителами, иммобилизованными на магнитных частицах. Чтобы избежать отбора аптамеров к константной области антител, на каждом раунде проводили контрселекцию на неродственные антитела того же вида.

А)



Б)

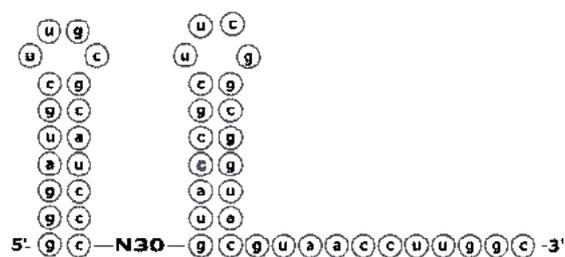


Рисунок 1.8. Дизайн комбинаторных библиотек к антиферритиновым антителам [35].

А) Вторичная структура комбинаторной РНК-библиотеки I, содержащей G-квадруплексы
 Б) Вторичная структура комбинаторной РНК-библиотеки II, имеющей в своем составе две стабильные шпильки

Было проведено 4 раунда отбора для РНК-библиотеки **GQCL** и 5 раундов для библиотеки **SSL**. После клонирования, секвенирования, сравнения различных вариантов предположительных вторичных структур для выявления возможных общих мотивов и минимизации нуклеотидных последовательностей были получены аптамеры **GQCL-4.7** (рисунок 1.9А) и **SSL-2.5** (рисунок 1.9Б).

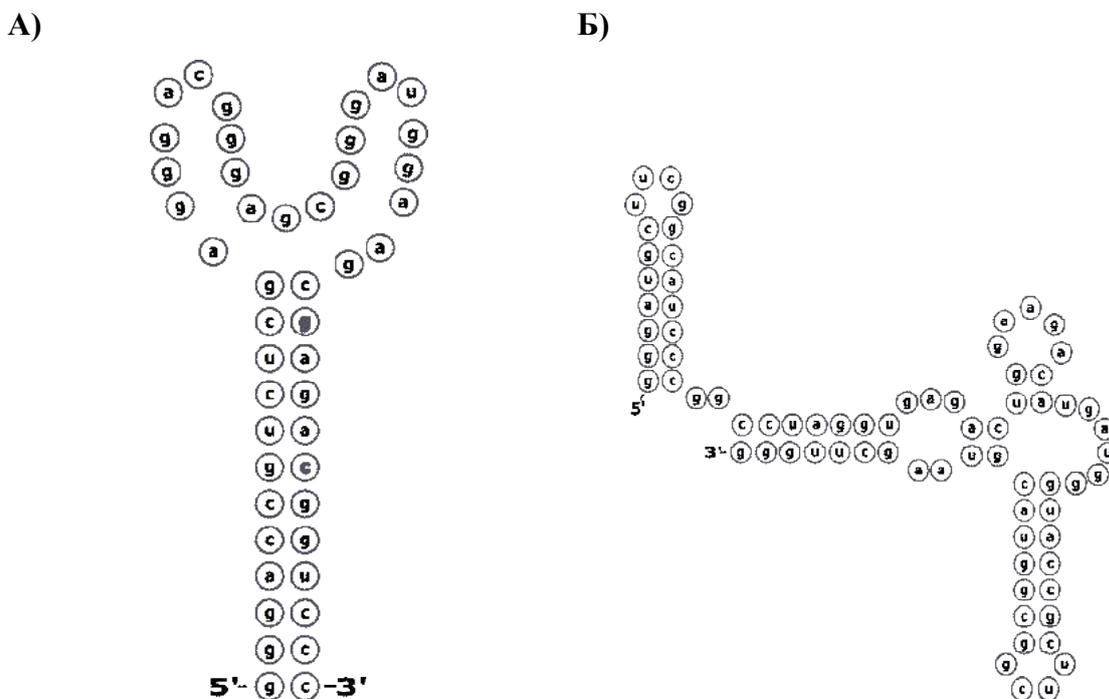


Рисунок 1.9. Вторичные структуры аптамеров, полученных к антиферритиновым антителам [35].

А) РНК-аптамер, полученный из библиотеки **GQCL**.

Б) РНК-аптамер, полученный из библиотеки **SSL**.

Сродство к антиферритиновым антителам у квадруплекс-содержащего аптамера **GQCL-4.7** ($K_D = 1.6$ мкМ), было значительно ниже, чем у аптамера **SSL-2.5** ($K_D = 0.064$ мкМ), который был получен из библиотеки, содержащей предформированные РНК-шпильки. Было также показано, что оба аптамера конкурируют с ферритином за связывание с антителами, т.е., связываются либо в том же сайте, что и ферритин, либо в непосредственной близости от этого сайта.

В работе [36] описано получение ДНК-аптамера, способного связываться с М2 антителами (мышинные антитела класса G), узнающими Flag-эпитоп в составе белков. Интересно, что изначально авторы не ставили задачи получения аптамера к антителам; целью работы был отбор аптамеров к самому Flag-эпитопу. В процессе отбора была использована ДНК-библиотека с рандомизированным участком в 35 нуклеотидов, которую инкубировали с Flag-белком, а затем полученные нуклеопротеиновые комплексы осаждали анти-Flag М2 антителами. Клонирование и секвенирование провели после 6

раундов селекции. Неожиданно оказалось, что полученные аптамеры связываются не с FLAG-белком, а с антителами к этому белку. Полученные аптамеры содержали два мотива (ССТТА и TGTCTWCC, где W = A/T), разделенных 2-3 нуклеотидами, причем удаление любого из мотивов нарушало связывание аптамера с мишенью. Была создана серия аптамеров, содержащих оба вышеприведенных мотива либо один из них. Результат исследования их аффинности методом задержки в геле показал, что M2-антитело с наибольшим сродством связывается только с аптамером, содержащим оба мотива в определенной последовательности ($K_D = 80$ нМ), причем этот аптамер не узнает другие аналогичные антитела. При этом аптамер связывается непосредственно с антигенсвязывающей частью M2 антитела, конкурируя за связывание с белком, и может вытеснять белок из комплекса с антителом.

В ряде работ по селекции аптамеров к IgG решалась задача получения аптамеров, способных связываться с конкретными фрагментами данных антител. Так, в работе [37] описано получение аптамеров, способных связываться с константным фрагментом IgG мыши. Для получения такого аптамера использовали 60-звенную РНК-библиотеку, содержащую 30-нуклеотидный рандомизированный участок, и мышьиные IgG различных подклассов (1, 2a и 3 подклассы). На первом раунде отбора после инкубации с антителами-мишенями разделение связавшихся и несвязавшихся последовательностей проводили методом электрофореза в агарозном геле. Начиная со второго раунда отбора, комплексы отделяли методом фильтрования на нитроцеллюлозных фильтрах. Для получения более «универсального» аптамера в качестве мишени авторами работы на разных раундах использовались различные типы и подклассы моноклональных IgG или их смесь. Связывание аптамера с мишенями анализировали ППР. После 7 раундов отбора было определено, что клон **MIG-1** обладает наибольшей аффинностью ($K_D = 3.6$ нМ) и способен определять различные подклассы IgG (1, 2a и 3 подклассы), что нашло применение в вестерн-блот анализе.

Аналогичная методика отбора была применена для получения универсальных ДНК-аптамеров, связывающих Fc-фрагменты основных подклассов мышьиных IgG. Авторы работы [38] использовали метод замещения мишени: для каждого раунда отбора в качестве мишени использовали различные подклассы IgG (гемоглобин-связывающие IgG, Fc-фрагменты IgG, IgG1, IgG2a). Этим способом был получен аптамер, связывающий Fc-фрагменты различных подклассов IgG мыши.

В работе [39] описан отбор 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров к константному Fc-фрагменту IgG человека с целью дальнейшего их использования для аффинного выделения моноклональных человеческих антител. 2'-F-РНК-библиотеку

инкубировали с белком-мишенью, иммобилизованным на Ni-содержащей смоле, затем элюировали комплексы аптамер-антитело 100 мМ имидазолом. Большинство полученных после 10 раундов селекции последовательностей содержали консенсусные фрагменты 5'-GGUGCU-3' и 5'-AAC-3'. В ходе последовательного удаления нуклеотидных звеньев, не влияющих на аффинность и специфичность связывания, был получен 23-звенный аптамер **Apt8**. Было показано, что данный аптамер обладает высокой селективностью: узнает только Fc-фрагмент IgG человека и не связывается с аналогичными белками животных. ЯМР-исследование образования комплекса аптамер-мишень показало, что с каждой молекулой белка связываются две молекулы аптамера. Для повышения устойчивости аптамера и увеличения экономичности синтеза аптамеров, часть пуриновых нуклеотидов была заменена их дезоксирибо-аналогами, а на 5'-конец аптамера была введена NH₂-группа для защиты от экзонуклеаз. Полученный в результате химерный аптамер **Apt8-2** (рисунок 1.10) сохранял высокое сродство к Fc-фрагменту IgG, при этом время его полужизни в сыворотке составило 4 часа.

В работе [40] было показано, что аптамер **Apt8-2** принимает характерную структуру, пространственно комплементарную Fc-фрагменту IgG человека. Наиболее важным в формировании комплекса аптамер-антитело является взаимодействие между G7 в нуклеотидной последовательности аптамера и Тур373 в аминокислотной последовательности Fc-фрагмента IgG. Авторы предполагают, что именно взаимодействие аптамера с определенным аминокислотным остатком, характерным для Fc-фрагмента, обуславливает высокую селективность связывания. Полученные в данной работе аптамеры и способ их использования для аффинного выделения антител запатентованы (см. [41]).

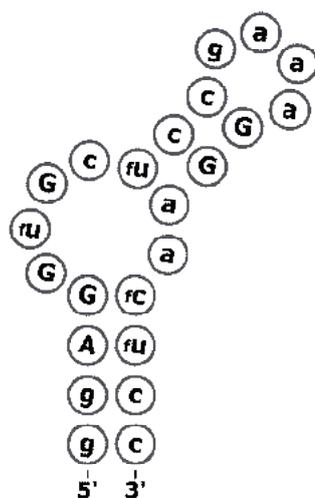


Рисунок 1.10. Аптамер **Apt8-2** смешанного типа к Fc-фрагменту IgG человека. Заглавными буквами обозначены рибонуклеотиды, строчными – дезоксирибонуклеотиды, f – 2'-F-модифицированные нуклеотиды [39].

Для увеличения стабильности исходного 23-звенного химерного аптамера **Apt8-2** авторами работы [42] были разработаны 4 различных варианта дополнительной модификации этого аптамера с заменой рибонуклеотидов в определенных положениях олигонуклеотидной цепи их 2'-О-метил, 2'-F- или дезоксирибо-аналогами, а также заменой одной из фосфодиэфирных групп тиофосфатной (рисунок 1.11).

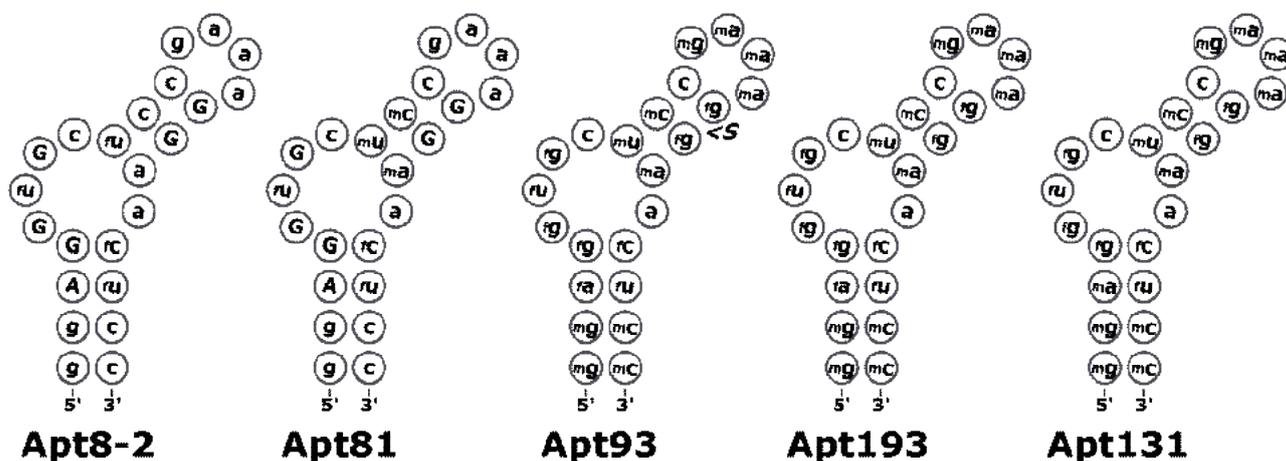


Рисунок 1.11. Предположительные вторичные структуры модифицированных аптамеров к Fc-фрагменту IgG. Заглавные буквы – РНК, строчные буквы – ДНК, f - 2'-F-модификация; m - 2'-ОМе-модификация, S – фосфоротиоатная связь [42].

Было показано, что аптамер **Apt131**, содержащий двенадцать 2'-ОМе-модифицированных нуклеотидов, восемь 2'-F-модифицированных нуклеотидов и три дезоксинуклеотида по совокупности характеристик эффективности, стабильности и экономичности синтеза наиболее оптимален для создания аффинного сорбента. Авторами работы было также продемонстрировано преимущество использования РНК-аптамера к Fc-фрагментам IgG человека для выделения антител по сравнению с обычно используемым для этих целей белком А. Для связывания аптамера с антителами-мишенями необходимо наличие двухвалентных катионов. Это позволяет разрушать комплексы аптамер-антитело добавлением хелатирующих агентов, например ЭДТА, при нейтральных рН. Такие щадящие условия элюции способствуют сохранению нативной конформации и функциональной активности антител и позволяют исключить риск их агрегации, возникающий при элюции в кислотной среде после выделения на белок А-модифицированных сорбентах.

При отборе аптамеров, способных специфично связываться с конкретными антителами, в качестве мишеней можно использовать и переменные Fab-фрагменты антител. В работе [43] была поставлена задача блокирования вирус-нейтрализующих антител, которые затрудняют терапию злокачественных заболеваний онколитическими вирусами. Авторами [43] был проведен отбор ДНК-аптамеров к Fab-фрагментам

поликлональных антител кролика, нейтрализующих вирус везикулярного стоматита (VSV). При отборе аптамеров, кроме позитивной селекции на иммобилизованный на магнитных частицах белок-мишень, была также использована негативная селекция на свободные магнитные частицы и магнитные частицы с неспецифичными антителами (рисунок 1.12).

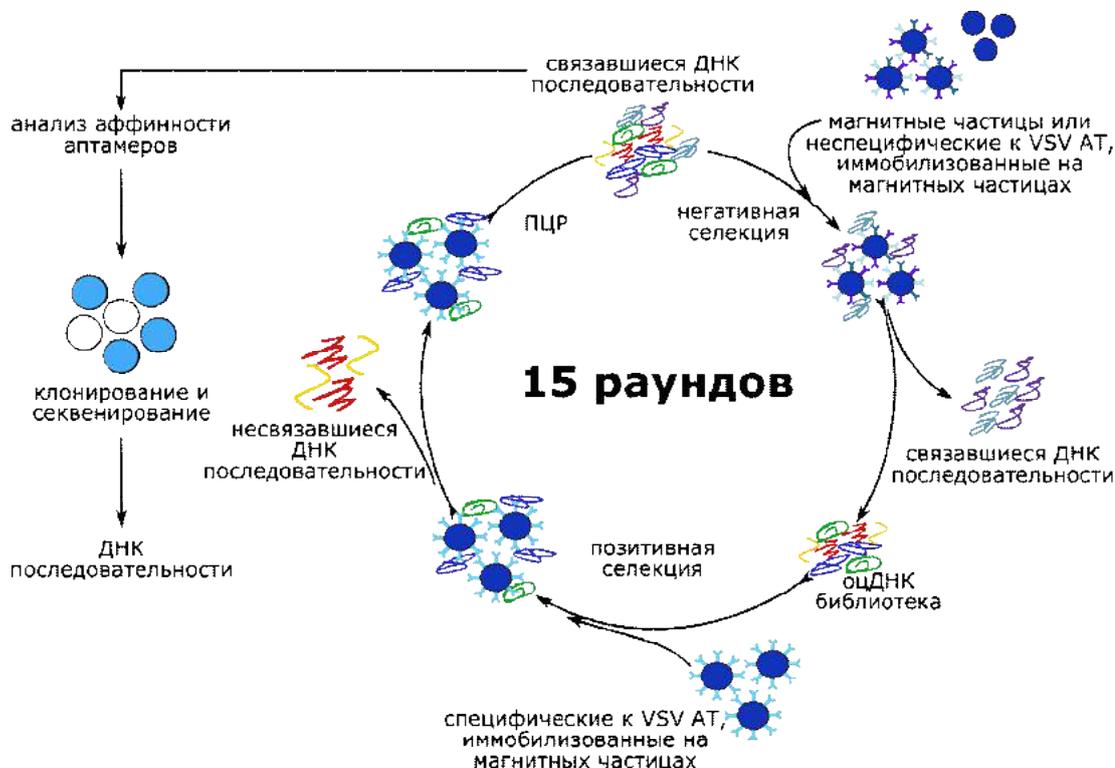


Рисунок 1.12. Схема отбора ДНК-аптамеров к вирус-нейтрализующим антителам [43].

Максимальное подавление связывания антител с вирусом наблюдалось для обогащенной ДНК-библиотеки после 11 раунда селекции. После клонирования и секвенирования этой библиотеки были получены ДНК-аптамеры C5L, C3S и C5S, способные на 70% ингибировать связывание антител с вирусом, а также на 50% восстанавливать онколитическую активность вируса в культуре клеток в присутствии нейтрализующих антител. При дальнейших исследованиях было показано, что димерные и тетрамерные аптамеры более стабильны в сыворотке, чем их мономерный аналог [44].

В таблице 1.1 суммированы данные по известным на сегодняшний день анти-IgG аптамерам и аптамерам, отобранным к фрагментам антител.

Таблица 1.1. Аптамеры к иммуноглобулинам класса G и их фрагментам.

Мишень	Тип библиотеки, N	Способ отбора	Возможное применение	K_D , ссылка
Различные подклассы IgG мыши	РНК, 30	7 раундов позитивного отбора	Использование в вестерн-блот анализе	MIG-1 $K_D = 3.6$ нМ [37]
Fc-фрагменты IgG мыши	ДНК, 25	8 раундов отбора с использованием различных типов IgG в качестве мишени	Использование вместо вторичных компонентов в ИФА или для аффинного выделения антител	[38]
Константный Fc-фрагмент IgG человека	2'-F-РНК, 71 – 74	10 раундов селекции	Использование аптамеров для создания систем выделения и очистки IgG человека	Apt8-2 [39,41]
Fab-фрагменты поликлональных антител кролика, нейтрализующих вирус везикулярного стоматита (VSV)	ДНК, 40	С 1 по 5 раунды – позитивный отбор; с 6 по 10 раунды – негативный отбор с не-VSV антителами; С 11 по 15 раунды – негативный отбор на неспецифические антитела	Защита онколитических вирусов, направленных против клеток опухолей, от нейтрализующих их антител	[43]
Антитела (IgG) кролика	РНК, 30	10 раундов позитивного отбора	Для аффинного выделения или в качестве компонента систем детекции, основанных на использовании IgG кролика.	R18 $K_D = 15$ пМ [34]
Моноклональные мышинные анти-ферритиновые антитела H107	G-богатая РНК-библиотека GQCL , РНК-библиотека SSL с 30-ти звенным рандомизированным участком	4 и 5 раундов позитивного отбора, соответственно, с контрселекцией на неродственные антитела того же вида	Полученные аптамеры конкурируют с ферритином за связывание с АТ, что может использоваться в качестве «защиты» ферритина от аутоантител	$K_{D(GQCL)} = 1.6$ мкМ $K_{D(SSL)} = 64$ нМ [35]
Anti-flag модельные M2 антитела (антитела класса G)	ДНК, 35	6 раундов позитивного отбора	Перспектива разработки новых терапевтических путей для лечения пациентов с СКВ, ревматоидным артритом и др. аутоиммунными заболеваниями	80нМ [36]

1.2. Отбор аптамеров к иммуноглобулинам, характерным для аутоиммунных заболеваний

С учетом тематики данной диссертационной работы мы выделили в отдельный раздел аптамеры к IgG-антителам, характерным для патологий аутоиммунного типа. В норме иммунная система человека не распознает собственные ткани организма как антигены. При аутоиммунных процессах в силу различных патологических изменений может наступить «сбой», при котором иммунная система нарабатывает антитела против здоровых тканей организма, что приводит к повреждению нормальных тканей и к развитию аутоиммунного воспаления. Каждое аутоиммунное заболевание характеризуется наличием определенного спектра антител, выступающих в роли медиаторов аутоиммунных процессов организма [45]. Разработка способов детекции аутоантител в сыворотке крови или спинномозговой жидкости при помощи НК-аптамеров открывает путь к созданию новых средств ранней высокоспецифичной диагностики и мониторинга терапии аутоиммунных заболеваний: системной красной волчанки, ревматоидного артрита и др. [46]. На сегодняшний день получен ряд аптамеров к характерным для АИЗ аутоантителам.

Авторами работы [47] был получен РНК-аптамер к моноклональным антителам мышцы МА20, направленным на главный эпитоп инсулинового рецептора человека. Для отбора была использована комбинаторная РНК-библиотека с 40-звенной рандомизированной областью. На первом раунде отбора была использована контрселекция на суммарные нормальные IgG мыши для удаления неспецифических последовательностей, затем проводили 11 раундов положительного отбора. Для отделения комплексов аптамер-мишень от несвязавшихся олигонуклеотидов в реакционную смесь добавляли козьи анти-мышинные антитела, иммобилизованные на поверхности магнитных частиц, и проводили магнитную сепарацию. После селекции и секвенирования было получено 11 РНК-аптамеров, содержащих 21-звенный консенсусный участок. Интересно, что большинство полученных индивидуальных РНК были короче (на 5 – 17 нт), чем исходная комбинаторная библиотека (89 нт) из-за делеций в рандомизированном участке, возникших, по предположению авторов, на этапах ОТ-ПЦР. Максимальным сродством к мишеням обладал аптамер **RNA9** (рисунок 1.13) ($K_D = 2$ нМ). Было показано, что этот аптамер способен блокировать взаимодействие между антителом и рецептором и, таким образом, может служить «ловушкой» для нейтрализации патогенных антител.

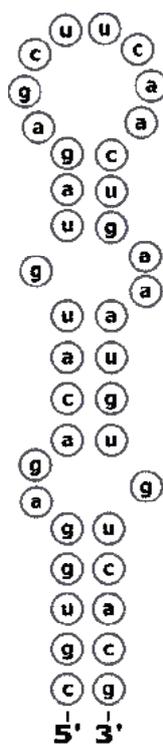


Рисунок 1.13. Предположительная вторичная структура РНК-аптамера **RNA9**, специфичного к моноклональным антителам мыши MA20 [47].

К этому же виду антител был отобран устойчивый к нуклеазам 2'-NH₂-РНК-аптамер [48]. Для отбора использовали комбинаторную библиотеку с 2'-NH₂-модифицированными пиримидиновыми нуклеотидами. Аналогично предыдущей работе, на первом раунде отбора была проведена стадия контрсеlections на нормальные IgG мыши, затем последовали 12 раундов позитивной селекции на MA20-антитела. После амплификации, клонирования и секвенирования 18 различных клонов было показано, что все полученные РНК на 6 нуклеотидов короче исходной библиотеки и отличаются по нуклеотидным последовательностям от аптамеров, полученных в предыдущем отборе. Для дальнейшего исследования был выбран наиболее часто встречающийся аптамер **RNA№1** (рисунок 1.14), который обладал высокой аффинностью ($K_D = 30$ нМ) и селективностью по отношению к MA20-антителам. Было показано, что аптамер **RNA№1** способен связывать аутоантитела пациентов с острой инсулинорезистентностью и защищать лимфоциты человека от большей части этих патогенных аутоантител, что перспективно с точки зрения разработки терапевтических средств.

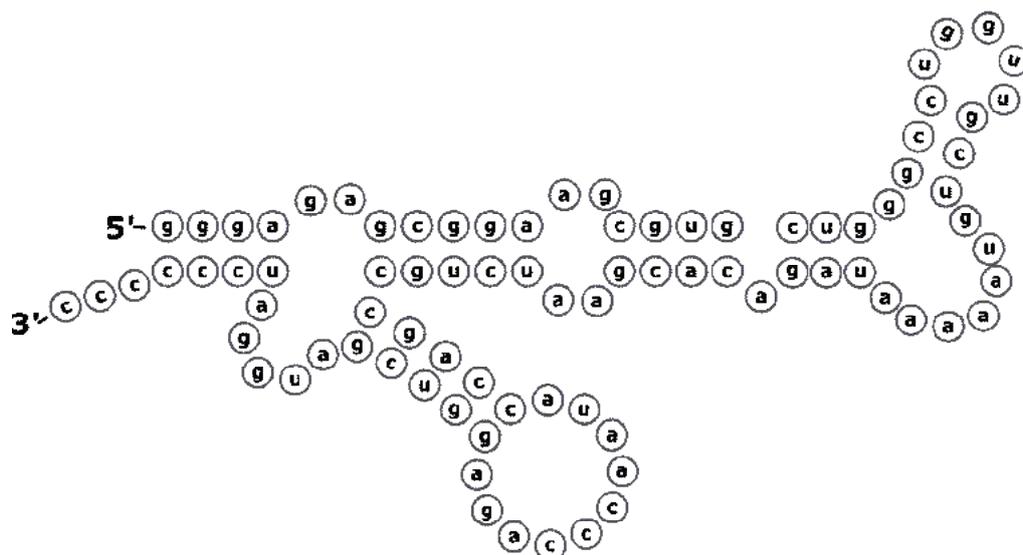


Рисунок 1.14. Предположительная вторичная структура 2'-NH₂-РНК-аптамера **RNA№1**, специфичного к моноклональным антителам мыши MA20 [48].

При различных аутоиммунных патологиях аутоантитела нарабатываются против ядерных антигенов, включая рибонуклеопротеины, нуклеосомы, хроматин, полинуклеотиды. Для блокирования действия таких антител можно использовать аптамеры, которые будут «заменять» НК – мишень во взаимодействии с антителом. Так, для системной красной волчанки характерен высокий уровень анти-ДНК антител в крови пациентов. Известно, что патогенные анти-ДНК аутоантитела при СКВ принадлежат классу IgG и предпочтительнее связываются с нативной формой дцДНК, чем с оцДНК [49]. Для создания «ловушки», селективно узнающей антигенный эпитоп антитела, авторами работы [50] предложено использовать РНК-аптамеры. Отбор проводили в течение 22 циклов. Для оценки констант диссоциации индивидуальных аптамеров, исходной и обогащенной библиотек использовали метод ППР. Аптамер с наилучшей степенью связывания обладал сродством к анти-ДНК антителам значительно превышающим сродство естественной мишени антител (ДНК) ($K_D = 2$ нМ и 40 мкМ, соответственно). Кроме того, была показана его высокая селективность к патогенным антителам (по сравнению с нормальными антителами мыши) и способность ингибировать связывание антитела с ДНК. Такие аптамеры в перспективе могут быть использованы для детекции и/или нейтрализации анти-ДНК антител, характерных для системной красной волчанке.

В работе [51] был осуществлен отбор ДНК-аптамеров на моноклональные антитела **C595** (IgG3) к белку муцину-1 человека. Для селекции антитела предварительно сорбировали на стенках ПЦР-пробирки. После 10 раундов селекции из комбинаторной ДНК-библиотеки с рандомизированным 25-нуклеотидным участком, клонирования и

секвенирования большая часть клонов содержала одну и ту же 25-нуклеотидную последовательность в варибельной области. Было показано, что минимизированный аптамер, содержащий только эту последовательность (рисунок 1.15), обладает значительно большим сродством к антителу-мишени ($K_D = 50$ нМ), чем полноразмерный 72-звенный аптамер ($K_D = 670$ нМ), и связывается с антителом в том же сайте, что и природный антиген (пептидный фрагмент муцина-1).

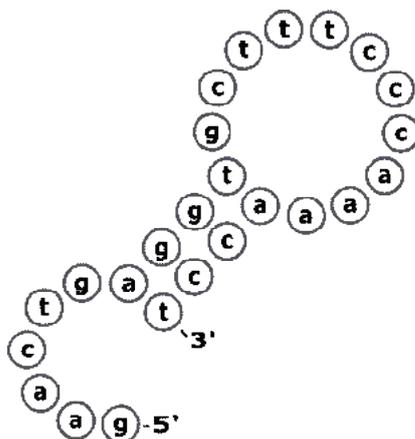


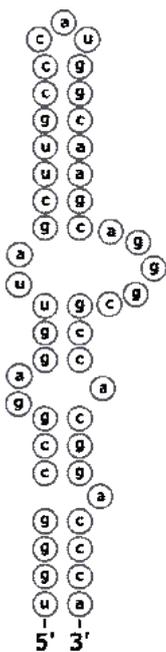
Рисунок 1.15. Минимизированный вариант полученного ДНК-аптамера, специфичного к моноклональным антителам **C595** (IgG3), атакующим белок муцин-1 человека [51].

Мишенями для аутоиммунной атаки могут выступать самые различные биомолекулы. Так, при миастении - аутоиммунном нервно-мышечном заболевании - в организме образуются аутоантитела против ацетилхолиновых рецепторов (АХР), расположенных в постсинаптических мембранах мышечных клеток. В работе [52] было предложено в качестве «ловушек» для нейтрализации патогенных аутоантител использовать РНК-аптамеры. Мишенью для отбора были моноклональные крысиные антитела mAb198, способные опознавать главный иммуногенный участок альфа-субъединицы АХР. Все пиримидиновые нуклеотиды в составе РНК-библиотеки были заменены их 2'-NH₂-аналогами, длина рандомизированного участка составляла 40 нуклеотидов. Чтобы избежать отбора аптамеров к константным фрагментам антител, каждый раунд селекции включал в себя негативный отбор на нормальные крысиные IgG-антитела. Для отделения комплексов аптамер-антитело была использована иммунопреципитация. После 12 раундов отбора, клонирования и секвенирования были получены 20 аптамеров, 12 из которых неспецифично связывались с магнитными частицами, используемыми при иммунопреципитации, а оставшиеся 8 представляли собой одну и ту же последовательность РНК. Полученный 2'-NH₂-РНК-аптамер специфично связывался с антителами-мишенями mAb198 с достаточно высоким сродством ($K_D = 60$ нМ). Было показано, что данный аптамер способен ингибировать связывание антител-

мишеней с главным иммуногенным участком АХР и конкурирует с ними за один и тот же сайт связывания. Использование 2'-аминогрупп для защиты пиримидиновых нуклеотидов сделало аптамер исключительно устойчивым к нуклеазам сыворотки (время полужизни в 10% и 100% сыворотке увеличивалось в 10000 раз). На культуре лимфобластных клеток IM-9 человека была продемонстрирована способность 2'-NH₂-РНК-аптамера ингибировать связывание антител с АХР и, таким образом, защищать клетки от действия патогенных антител. В результате минимизации структуры 89-звенного аптамера был получен «укороченный» 66-звенный его вариант (рисунок 1.16А), обладающий таким же сродством к антителам-мишеням.

Дальнейшим развитием этой работы стало получение 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров к анти-АХР антителам mAb198 [53]. Полученный после 10 раундов отбора 2'-F-РНК-аптамер (рисунок 1.16Б) обладал несколько более высоким сродством к антителам-мишеням (K_D = 25 нМ) и более эффективно защищал клетки от действия патогенных антител, выступая в качестве «ловушки».

А)



Б)

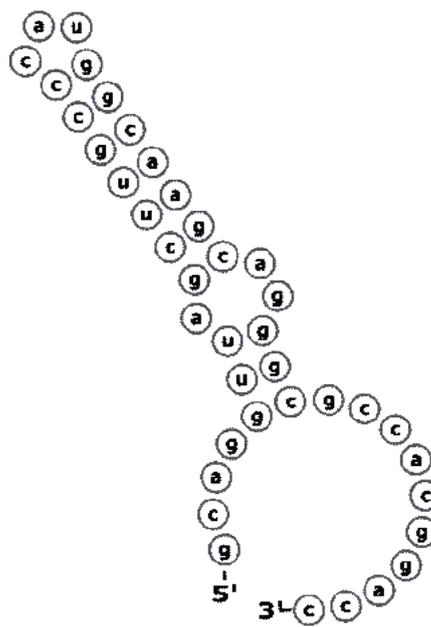


Рисунок 1.16. Предположительные вторичные структуры:

А) укороченного варианта 2'-NH₂-РНК-аптамера, специфичного к анти-АХР антителам mAb198 [52];

Б) 2'-F-РНК-аптамера к антителам mAb198 [53] (получено с использованием алгоритма ViennaRNA Web Services).

Данный аптамер был также способен высокоаффинно связываться с человеческими анти-АХР аутоантителами из сыворотки больных миастенией и не связывался с антителами из сыворотки здоровых людей. Была продемонстрирована способность 2'-F-

РНК-аптамера защищать клетки от воздействия анти-АХР аутоантител из различных образцов сыворотки, взятых у нескольких пациентов. По мнению авторов, это указывает на универсальность полученного аптамера и дает возможность создания на его основе терапевтических препаратов для лечения миастении. Для получения аптамеров, обладающих ещё более высоким сродством к анти-АХР аутоантителам, была использована 2'-NH₂-модифицированная РНК-библиотека с 20-нуклеотидным рандомизированным участком; в ходе селекции концентрацию антитела-мишени понижали от раунда к раунду, тогда как в предыдущих вариантах отбора она оставалась неизменной [54]. Наиболее высокой аффинностью среди полученных в результате аптамеров обладал аптамер **ExSERNA 5** (рисунок 1.17) ($K_D = 6$ нМ); таким образом, сродство 2'-NH₂-РНК-аптамера к РНК удалось улучшить на порядок, при этом полученный аптамер также обладал высокой специфичностью и способностью нейтрализовать патогенные аутоантитела.

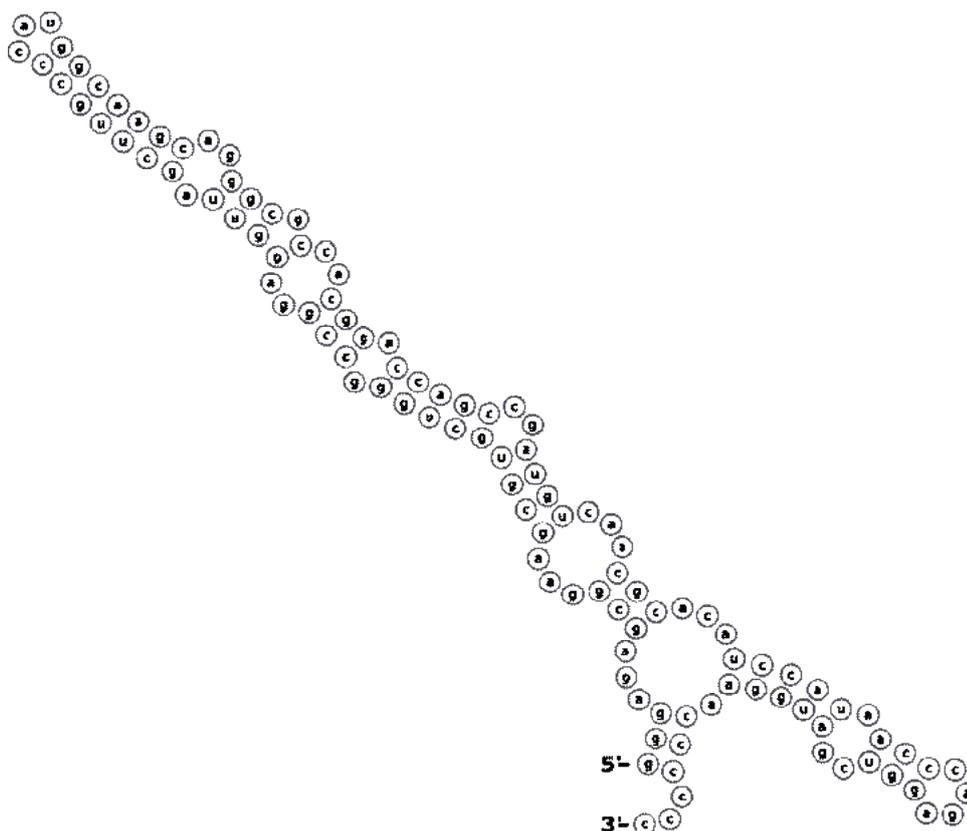


Рисунок 1.17. Предположительная вторичная структура 2'-NH₂-РНК-аптамера **ExSERNA5** к анти-АХР аутоантителам [54].

Несмотря на очевидные преимущества полученного аптамера, длина его последовательности составляла более 110 нуклеотидов. Для укорочения аптамера, полученного в работе [53], был проведен анализ его вторичной структуры. Для определения участка, отвечающего за связывание с мишенью, анти-АХР антитела

инкубировали с радиоактивно меченым аптамером в присутствии избытка α -субъединицы АХР. Было показано, что аптамер **ExSERNA 5** связывается с mAb198 антителами рядом или в месте связывания антител с нативным лигандом [55]. В результате минимизации нуклеотидной последовательности был получен 46-звенный аптамер, сохранивший высокую аффинность и специфичность связывания. Его аналог, содержащий остаток PEG на 5'-конце, уменьшал клинические симптомы миастении у лабораторных животных. Таким же способом был оптимизирован и 89-звенный 2'-NH₂-РНК-аптамер. В результате был получен его 47-звенный укороченный вариант, последовательность которого практически полностью совпадала с описанным выше 2'-F-модифицированным аналогом. Данный аптамер также был способен защищать клетки от анти-АХР антител [56].

Аутоантитела, направленные против β 1-адренорецептора, предположительно являются модуляторами патогенеза различных видов кардиомиопатии. Было предложено использовать в лечении этого заболевания аптамеры, нейтрализующие данные антитела [57]. ДНК-аптамер получали методом MonoLEX из комбинаторной библиотеки (длина рандомизированного участка - 21 нуклеотид). В отличие от SELEX, метод MonoLEX включает в себя всего один раунд селекции. Для исключения последовательностей со сродством к константным фрагментам IgG библиотеку первоначально инкубировали со смесью человеческих и козьих IgG, не имеющих сродства к β 1-адренорецептору. После стадии негативной селекции библиотеку хроматографировали на колонке с иммобилизованными антителами-мишенями, механически выделяли зону сорбента, содержащую связавшиеся аптамеры, в денатурирующих условиях элюировали высокоаффинные последовательности и проводили их клонирование и секвенирование, получив серию индивидуальных аптамеров. Аптамер с наилучшим сродством из данной серии обладал высокой селективностью и не взаимодействовал со схожими антителами – β 2 и M2. Было показано, что данный аптамер устойчив при хранении и не теряет сродства к мишеням после многократной денатурации-ренатурации и инкубирования в сыворотке крови. Эти характеристики в сочетании со способностью полученного аптамера ингибировать цитотоксическое, апоптотическое и хронотропное действие β 1-аутоантител указывают на перспективность его использования при создании препаратов для лечения аутоиммунной кардиомиопатии [58].

В таблице 1.2 суммированы данные по аптамерам к антителам, характерным для аутоиммунных заболеваний.

Таблица 1.2. Аптамеры к иммуноглобулинам, характерным для аутоиммунных заболеваний

Мишень	Тип библиотеки, N	Способ отбора	Возможное применение	K _D , ссылка
Моноклональные АТ мыши МА20, специфичные к главному эпитопу инсулинового рецептора человека	РНК, 40	1й раунд – контрselection на нормальные IgG мыши, 8 раундов положительного отбора, 3 раунда положительного отбора с повышенным давлением селекции	Использование в качестве «ловушки» для блокирования взаимодействия между АТ и рецептором	RNA9 2 нМ [47]
	2'-NH ₂ -РНК, 40	1й раунд – контрselection на нормальные IgG мыши, затем 12 раундов позитивного отбора		RNA№1 30 нМ [48]
Анти-ДНК антитела (IgG), характерные для СКВ		22 раунда позитивного отбора	Использование в качестве ингибитора взаимодействия антител с ДНК	2 нМ [50]
Моноклональные антитела С595 (IgG3) к белку муцину-1 человека	ДНК, 25	10 раундов позитивного отбора	Для выявления анти-идиотипических детерминант, специфичных при опухолях	50 нМ [51]
Моноклональные крысиные антитела mAb198, способные опознавать главный иммуногенный участок межклеточного домена АХР	2'-F-РНК, 40	10 раундов позитивного отбора	Аптамер может служить в качестве «ловушки» для антител, блокируя тем самым их действие на ацетилхолиновые рецепторы при миастении	25 нМ [53]
	2'-NH ₂ -РНК, 40	12 раундов позитивного отбора с негативным отбором на нормальные крысиные антитела	Защита клеток от воздействия анти-АХР, возможность создания терапевтических средств для больных миастенией	60 нМ [52]
	2'-NH ₂ -РНК, 20	Селекция с понижением концентрации антител-мишеней от раунда к раунду		ExSeRNA5 6 нМ [54]
Антитела, атакующие β1 – адренорецепторы (β1-АТ)	ДНК, 21	Технология MonoLex	Использование аптамера для нейтрализации β1-АТ и регуляции их функций <i>in vitro</i>	[57,58]

Можно заключить, что в настоящее время создан ряд аптамеров различных типов (ДНК, РНК, 2'-модифицированные РНК, химерные), способных как специфично узнавать конкретные антигена, так и связываться с константными участками любых антител одного класса. Надо отметить, что антиген-мишеней, для которых получены узнающие их аптамеры, пока немного, однако интерес исследователей к этому направлению, а также широкие возможности применения аптамеров, узнающих антигена, позволяют надеяться на появление большего разнообразия таких аптамеров.

1.3. Применение аптамеров, способных узнавать иммуноглобулины

1.3.1. Аффинные матрицы на основе аптамеров к иммуноглобулинам

Аптамеры к антителам, получение которых описано в предыдущих разделах обзора, нашли применение для решения различных задач биомедицины и биотехнологии. Так, РНК-аптамер **Apt8-2** к Fc-фрагментам IgG человека был успешно использован для аффинного выделения антител [39,41]. Также анти-IgG аптамер был использован для конъюгирования с антителом; конъюгаты НК-антитело могут быть использованы в различных биотехнологических областях, таких как визуализация в клетках и организмах, доставка наноструктур или белковых комплексов. Авторы работы [59] предложили два подхода к получению конъюгатов аптамер-антитело: прямой метод, при котором аптамер имеет в своем составе реакционноспособную альдегидную группу, и непрямой метод, при котором альдегидная группа содержится во второй ДНК-последовательности, комплементарной аптамеру. Надо отметить, что в данной работе продемонстрирована скорее принципиальная возможность присоединения аптамера к антителу, однако конкретного применения этой конструкции авторы не описывают.

Описанный выше ДНК-аптамер, отобранный к β 1-аутоантителам, был использован при создании аффинного сорбента для очистки плазмы крови от патогенных антител при аутоиммунной кардиомиопатии. Для этого полноразмерный вариант аптамера, состоящий из 110 нуклеотидов, был минимизирован до 12 нуклеотидов без потери сродства и специфичности. Аминогексил-модифицированный аптамер был ковалентно присоединен к NHS-активированной сефарозе, полученный сорбент был опробован при экстракорпоральной очистке крови модельных животных (крыс) [58,60]. Принципиальная возможность использования аптамера для нейтрализации аутоантител и, в частности, для лечения кардиомиопатии была показана в системе *in vivo* на мышинной модели спонтанной гипертонии [61].

С использованием ДНК-аптамеров к IgE-антителам были синтезированы три варианта аффинных сорбентов для выделения IgE из плазмы крови человека [62]. К полимерной матрице на основе агарозы через алифатическую аминогруппу были ковалентно присоединены гексиламинопроизводные ДНК-аптамера **D17.4** к IgE.

После хроматографического определения параметров элюирования белка было показано, что все варианты сорбентов с высокой эффективностью связывают IgE, а также обладают групповой специфичностью и пригодны для многократного использования. Сорбенты показали высокую эффективность: в зависимости от ориентации ДНК-аптамеров на матрице экспериментальные значения констант сорбции IgE составили 0.11 – 0.17 нМ.

Также на основе аптамера **D17.4** была создана матрица для определения IgE в сыворотке крови методом MALDI масс-спектрометрии (MALDI-MS) [63]. Аптамер-модифицированная поверхность связывала специфично целевые иммуноглобулины так, что сигнал, детектируемый от других белков сыворотки крови, был незначительным, причем разбавление раствора сыворотки крови увеличивало чувствительность метода по оценке соотношения сигнал/шум. Наилучшая чувствительность достигалась при 10^4 -кратном разбавлении сыворотки, что позволило определять IgE в нативных наномолярных концентрациях.

Для детекции IgE методом АСМ была сконструирована матрица с ковалентно присоединенным через полиэтиленгликолевый линкер аптамером **D17.4** [64]. Полученная матрица демонстрировала высокую специфичность по отношению к IgE (90%) даже в присутствии большого количества других белков.

1.3.2. Биоимиджинг с использованием аптамеров

На основе химерного аптамера **TD05.1** к мембраносвязанным IgM был сконструирован флуоресцентный зонд. Поскольку цитозин обладает свойством образовывать кластерные комплексы с серебром, на 5'-конец аптамера вводили дополнительную октацитидиновую последовательность и иммобилизовали его на поверхности серебряных частиц [65]. Необходимо отметить, что для создания зонда была использована мономерная последовательность **TD05.1** и все эксперименты проводились при 4°C. Полученный флуоресцентный зонд был успешно применен в системах *in situ* при детекции Ramos-клеток и количественной детекции мембраносвязанных IgM-антител методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой.

1.4. Биосенсоры на основе аптамеров

Наиболее широкое на данный момент применение аптамеры нашли в качестве узнающего компонента в составе биосенсоров для определения концентрации антител. Биосенсор – это датчик, который объединяет биологический элемент с физико-химическим преобразователем для получения электронного сигнала, пропорционального концентрации анализируемого вещества, который затем передается на детектор. Обычно роль биорецептора в биосенсоре играют ферменты, антитела, микроорганизмы и нуклеиновые кислоты. Использование аптамера в качестве узнающего компонента в биосенсоре (такие биосенсоры носят название «аптасенсоры») дает ряд преимуществ над классическими видами биосенсоров, основанных, чаще всего, на антителах или ферментах. Эти преимущества достигаются за счет экономичного и доступного химического синтеза аптамеров, а также возможности регенерировать функции иммобилизованных аптамеров, что обеспечивает многократное использование аптасенсоров [66].

1.4.1. Аптасенсоры к IgG

РНК-аптамер **R18** к IgG кролика был использован вместо вторичного антитела в анализе сэндвич-типа для определения фактора роста эндотелия сосудов [67]. Количество связанного аптамера определяли методом количественной ОТ-ПЦР. С использованием данной системы детекции достигалось 100-кратное увеличение чувствительности по сравнению с классическим методом ИФА – 16 амоль.

Аптамер **Apt8-2** использовали в качестве первичного компонента для создания оптического аптасенсора по определению взаимодействия антиген-антитело без использования дополнительных меток [68]. В качестве твердой подложки авторы работы использовали кремниевые наночастицы, покрытые золотом, на которые иммобилизовали тиол-модифицированный аптамер **Apt8-2**. За счет того, что аптамер **Apt8-2** специфичен к Fc-фрагментам антител, анти-фибриногеновые антитела были зафиксированы на поверхности таким образом, что антиген-связывающий сайт оставался стерически доступным. После добавления на поверхность чипа фибриногена, инкубации и отмывки, регистрировали изменение интенсивности спектра поглощения при взаимодействии биомолекул. Принципиальная схема аптасенсора представлена на рисунке 1.18.

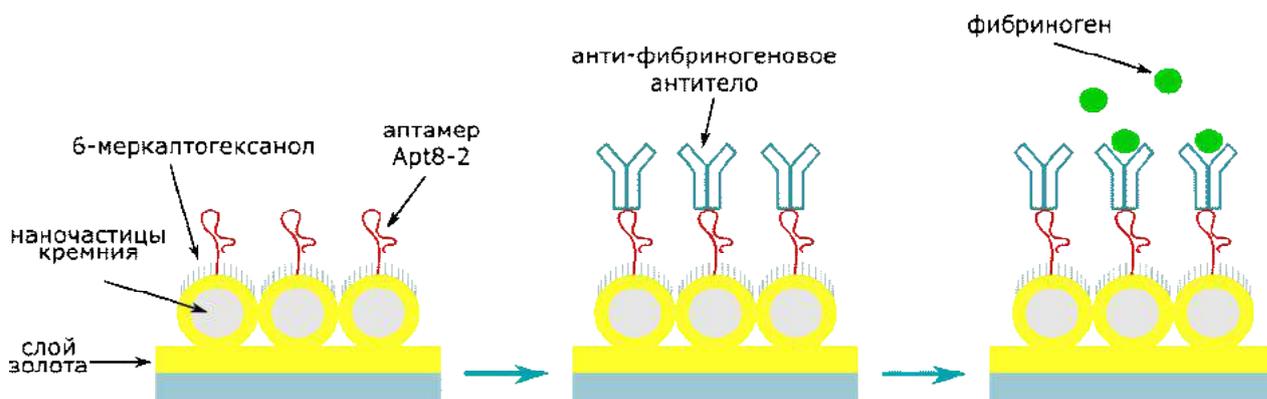


Рисунок 1.18. Схема действия оптического аптасенсора по определению взаимодействия антиген-антитело с использованием аптамера **Apt8-2**[68].

Предел обнаружения полученной системы составил 0.5 пМ. Этот подход потенциально является универсальным для исследования аффинности любых человеческих антител к их антигенам.

1.4.2. Биосенсоры для детекции IgE

Говоря об аптасенсорах для детекции антител, следует отметить, что подавляющее большинство из них представляют системы для детекции IgE на основе аптамера **D17.4** (рисунок 1.4Б). Этот 37-звенный ДНК-аптамер может быть относительно легко синтезирован в количествах, достаточных для конструирования биосенсорных систем, имеет устойчивую вторичную структуру и может быть адаптирован практически к любой биосенсорной системе. Кроме того, авторами нескольких работ [69,70] было показано, что равновесная константа диссоциации аптамера **D17.4** с мишенью сравнима с константой диссоциации моноклональных анти-IgE антител.

Быстрое и чувствительное определение концентрации IgE в крови человека представляет большой интерес с точки зрения диагностики аллергических заболеваний. В настоящее время для определения IgE создано большое разнообразие аптасенсоров различных типов, обладающих широким диапазоном чувствительности. Принципы действия аптасенсоров с различными типами детекции схематически представлены на рисунке 1.19.

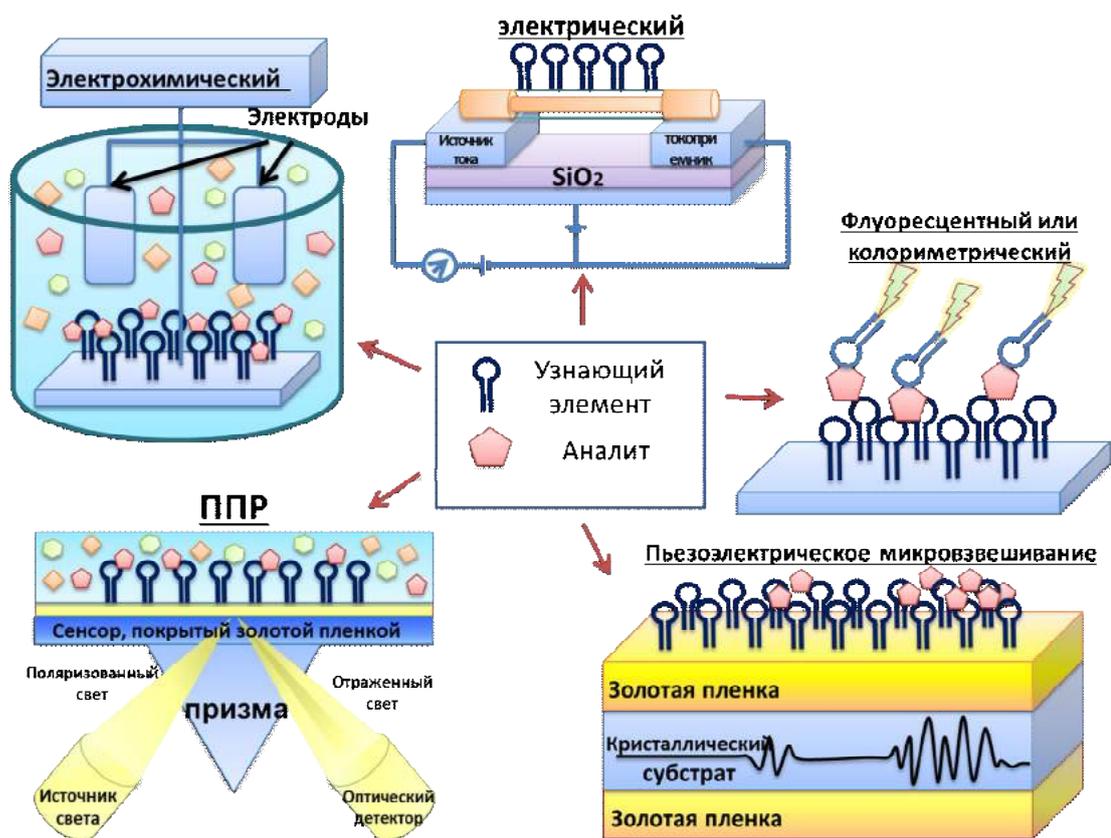


Рисунок 1.19. Общая схема аптасенсоров различных типов на основе аптамера к IgE.

В литературе описано создание IgE-аптасенсоров различных типов: акустических, электрохимических, электрических аптасенсорных устройств, основанных на ППР, оптической детекции различного типа; предел обнаружения сенсора обусловлен конкретной конструкцией сенсора и типом преобразования сигнала и варьирует от наномолярных до фемто- и даже аттомолярных значений (см. таблицу 1.3).

Таблица 1.3. Аптасенсоры на основе аптамера **D17.4** для детекции IgE-антител.

Тип аптасенсора	Преобразование сигнала	Предел обнаружения	Ссылка	
Оптический	ППР	1 аМ – 2 нМ	[71–76]	
	Колориметрический	1 пМ – 0.2 нМ	[77–79]	
	Люминесцентный	Гомогенный	94.5 фМ – 0.5 нМ	[80–85]
		Гетерогенный	0.4 фМ – 0.7 нМ	[86–95]
Электро-химический	Изменение сопротивления	0.1 – 0.15 нМ	[96,97]	
	Измерение напряжения	5 фМ – 80 пМ	[98–110]	
	Измерение электропроводности	2.8 фМ – 10 пМ	[111,112]	
Электрический	Амперометрия, потенциометрия	0.25 – 5 нМ	[113–117]	
Электрофоретический	Электрофоретическая мобильность	39 – 46 пМ	[118–120]	
Детекция изменения масс	пьезоэлектрический (QCM)	12.5 пМ – 0.5 нМ	[121–123]	
	акустический		[124]	

В большинстве случаев чувствительность аптасенсоров для детекции IgE лежит в пМ диапазоне. Концентрация IgE в крови человека составляет 50 – 300 нг/мл [125], что соответствует 0.25 – 1.5 нМ; таким образом, почти все известные на данный момент аптасенсоры по IgE-детекции потенциально являются достаточно чувствительными для определения уровня IgE в серологических образцах. Некоторые из этих аптасенсоров были успешно использованы для анализа образцов сыворотки крови человека [97,109]

Поскольку перспективной целью данной диссертационной работы является создание оптических аптасенсоров к аутоантителам, именно этот тип аптасенсоров будет рассмотрен нами далее более подробно.

1.4.2.1. Аптасенсоры для детекции IgE методом поверхностного плазмонного резонанса

Метод ППР – поверхностно-чувствительный оптический метод, основанный на изменении показателя преломления поляризованного света. Биосенсоры, основанные на спектроскопии ППР, дают возможность проводить быстрое, количественное и высокочувствительное измерение биомолекулярных взаимодействий без использования

дополнительных репортерных групп. С помощью этого метода можно определить кинетические константы ассоциации/диссоциации и равновесную константу диссоциации комплекса лиганд-мишень [126].

В работе [71] было исследовано взаимодействие аптамера **D17.4** и IgE методом ППР в мультиканальном формате. Для приготовления связывающей поверхности и доставки аналита использовали полидиметилсилоксановую (ПДМС) проточную микроювету, содержащую пять микроканалов. Такие микроюветы отличаются простотой изготовления и химической инертностью, что позволяет получить результаты с высокой скоростью и воспроизводимостью. Проточная микроювета была установлена на поверхность золотого ППР-чипа, после чего ее промывали и добавляли смесь аптамер/цистамин в каждый канал. Анти- IgE аптамер был иммобилизован на золотой поверхности через концевую тиольную группу, а его оптимальное пространственное расположение на поверхности было обеспечено использованием цистамин, выступающего в качестве спейсера. После инкубации смеси аптамер/цистамин, промывки и добавления IgE-антител измеряли полученный сигнал. Линейная зависимость сигналов была получена в диапазоне концентраций IgE 8.4 – 84 нМ, предел обнаружения полученного аптасенсора составил 2 нМ.

В работе [73] на основе аптамера **D17.4** был получен SAM-чип (self-assembled monolayer – самособирающийся монослой) для детекции IgE-антител методом ППР. Для получения различных SAM-поверхностей золотые микрочипы обрабатывали смесью алкантиолов, что позволяло избежать неспецифического связывания белков с поверхностью чипа. Карбоксильные группы на поверхности SAM-чипа активировали добавлением N-этил-N-(3-диэтиламинопропил)-карбодиимида, а затем конъюгировали с гидразидом биотина с последующим добавлением стрептавидина. Далее микрочип модифицировали биотинилированным аптамером **D17.4** и использовали для детекции IgE-антител методом ППР. Схема получения и использования SAM-чипа представлена на рисунке 1.20.

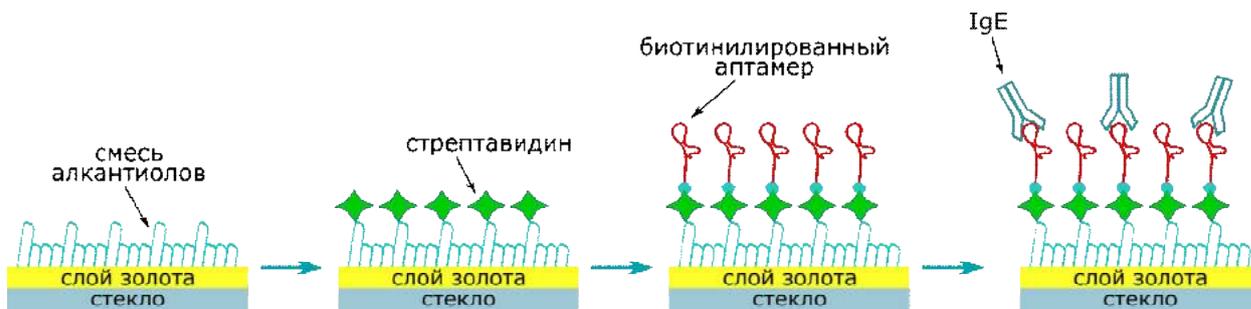


Рисунок 1.20. Схематическая иллюстрация получения и использования SAM-чипа для детекции IgE методом ППР [73].

На последующем этапе работы для увеличения чувствительности определения IgE с помощью полученного SAM-чипа авторы вводили дополнительную стадию – инкубацию комплекса аптамер-антитело с моноклональными анти-IgE антителами. Предел обнаружения полученного аптасенсора достиг 18.5 пМ.

В работе [72] для детекции IgE-антител методом ППР был использован эффект амплификации сигнала конъюгатами НЧЗ. Принцип действия биосенсора представлен на рисунке 1.21.

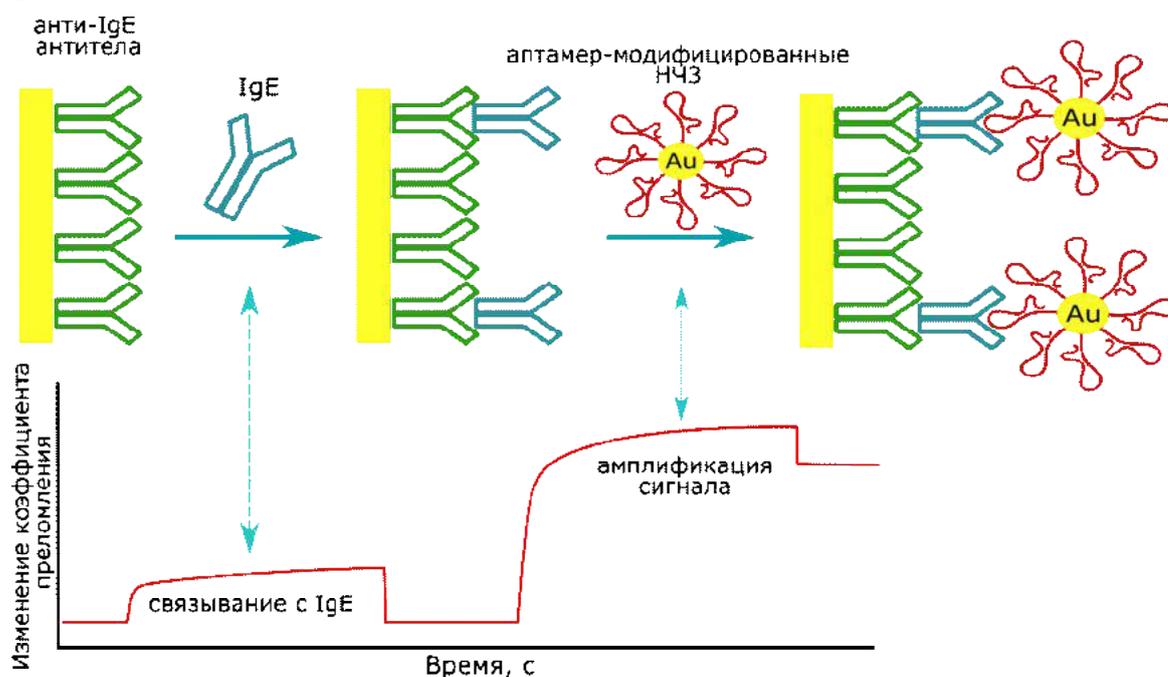


Рисунок 1.21. Схема действия аптасенсора с использованием эффекта амплификации сигнала конъюгатами золотых наночастиц для детекции IgE методом ППР. Au – наночастицы золота [72].

В качестве подложки для ППР использовали золотой чип с иммобилизованными анти-IgE антителами. На поверхность чипа наносили аналит, содержащий IgE, после инкубации и отмывки добавляли НЧЗ, модифицированные аптамером **D17.4** через концевую тиольную группу. При сборке сэндвич-комплекса золотые наночастицы усиливали отклик биосенсора, и это позволило значительно повысить чувствительность анализа, предел обнаружения полученного аптасенсора составил 5 пМ.

В работе [74] были разработаны две схемы детекции IgE методом ППР: прямая детекция и детекция с использованием наночастиц. Схема прямой детекции представляла собой иммобилизацию на поверхности золотого чипа анти-IgE антител или аптамера **D17.4** с последующим добавлением целевых IgE антител. Предел обнаружения полученного аптасенсора составил 1 нМ. Для увеличения чувствительности авторы работы добавили в систему НЧЗ, получив при этом два типа сэндвич-комплексов, схема которых представлена на рисунке 1.22. На поверхности чипа иммобилизуют анти-IgE

антитела или аптамер **D17.4** и после внесения аналита добавляют НЧЗ, модифицированные аптамером **D17.4** или анти-IgE антителами, соответственно. В случае использования НЧЗ предел обнаружения удалось понизить на 6 порядков - до 1 фМ.

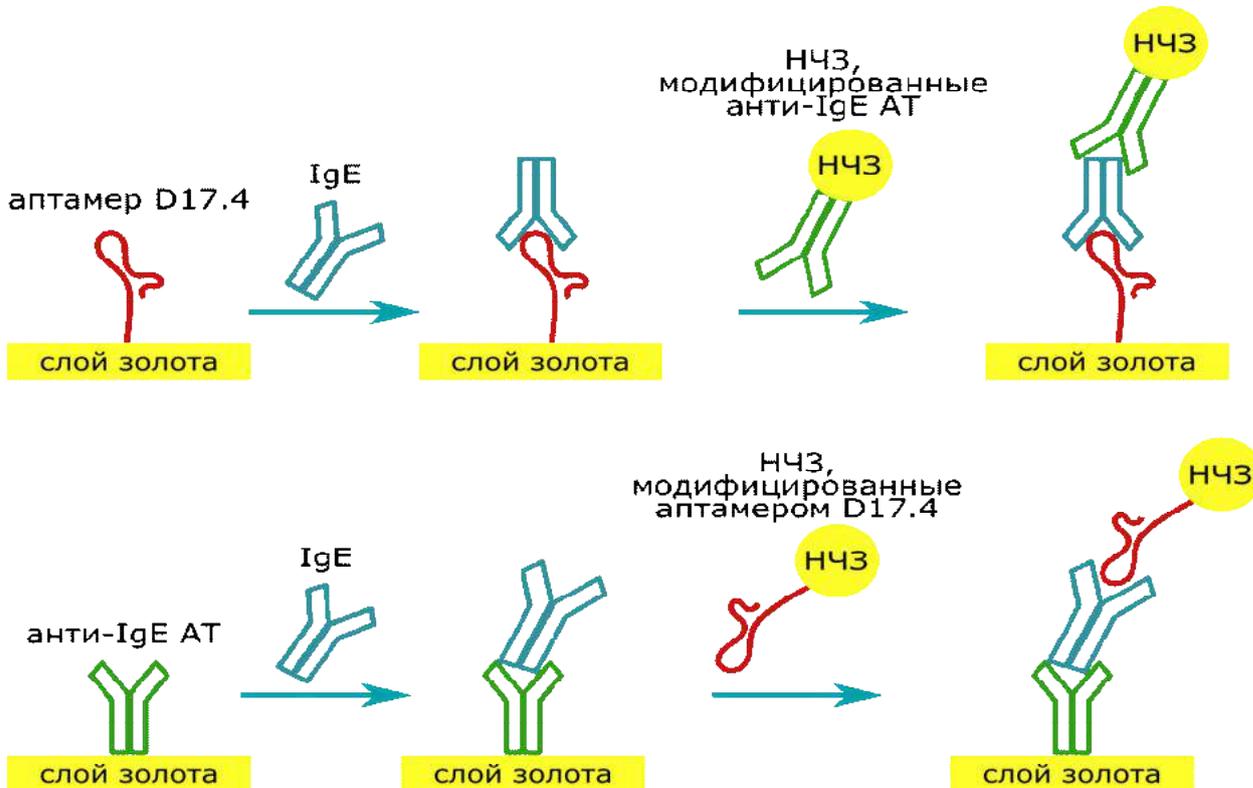


Рисунок 1.22. Схема сборки сэндвич-комплекса для детекции IgE с использованием аптамера **D17.4** или анти-IgE антител. НЧЗ – наночастицы золота [74].

В работе [75] описан способ высокочувствительной детекции IgE-антител методом ППП с использованием золотых наностержней. В отличие от сферических наночастиц, наностержни обеспечивают изменение плазмонной длины волны в более широком диапазоне, а также имеют больший концентрационный диапазон, при котором достигается линейная зависимость сигнала, что позволяет избежать стадию точного подбора концентрации наночастиц. Эти факторы позволяют достичь большей чувствительности детекции. С другой стороны, из-за использования поверхностно-активных веществ при получении наностержней их последующая биофункционализация требует более сложной стратегии, чем в случае сферических НЧЗ. Для создания аптасенсора поверхность наностержней была стабилизирована катионным бислоем гексадецилтриметилбромида аммония (СТАВ). Полученный СТАВ-слой был модифицирован алкантиолом с терминальной карбоксильной группой с последующей ее активацией N-гидроксисукцинимидом группы для реакции с анти-IgE антителами (рисунок 1.23). Такие конъюгаты антитело-наностержень играли роль вторичных компонентов биосенсора. Для улавливания аналита (IgE) был использован ППП-чип с

иммобилизованным на нем через 5'-тиольную группу аптамером **D17.4**. На поверхность полученного чипа наносили анализируемый раствор IgE-антител, инкубировали, промывали и детектировали образовавшийся комплекс конъюгатом антитело-наностержень. Амплификация сигнала за счет использования золотых наностержней позволила достичь предела обнаружения в 1 аМ.

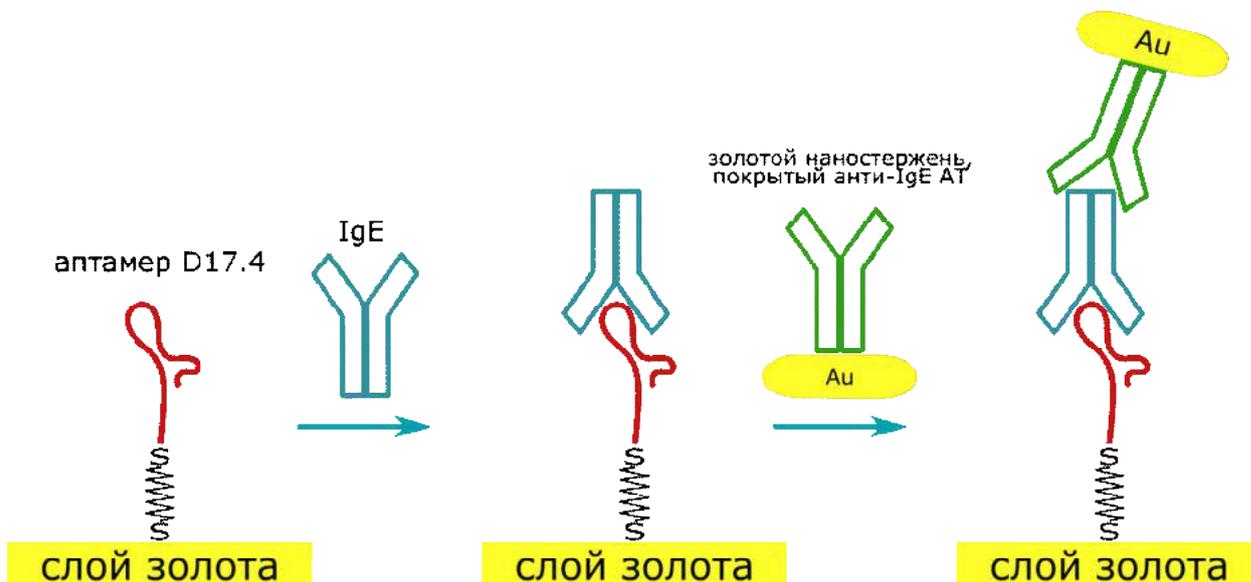


Рисунок 1.23. Схема аптасенсора с использованием конъюгата антитело-наностержень в детекции IgE методом ППР. Au – золотой наностержень [75].

В работе [76] для увеличения чувствительности детекции IgE методом ППР были использованы Fe_3O_4 -магнитные наночастицы (МНЧ). МНЧ широко применяются в качестве подложек для иммобилизации за счет большой площади поверхности и удобства разделения связавшихся и несвязавшихся молекул. Благодаря высокому коэффициенту преломления поверхности и большой молекулярной массе, МНЧ можно использовать в качестве амплифицирующего сигнал элемента биосенсора. По сравнению с золотыми наночастицами магнитные наночастицы имеют ряд преимуществ: контролируемый размер, быстрое и экономически выгодное получение, возможность концентрирования целевых молекул из смесей под действием магнитного поля, что позволяет уменьшить вероятность появления ложноположительных сигналов. Принципиальная схема аптасенсора с амплификацией ППР-сигнала за счет МНЧ представлена на рисунке 1.24.

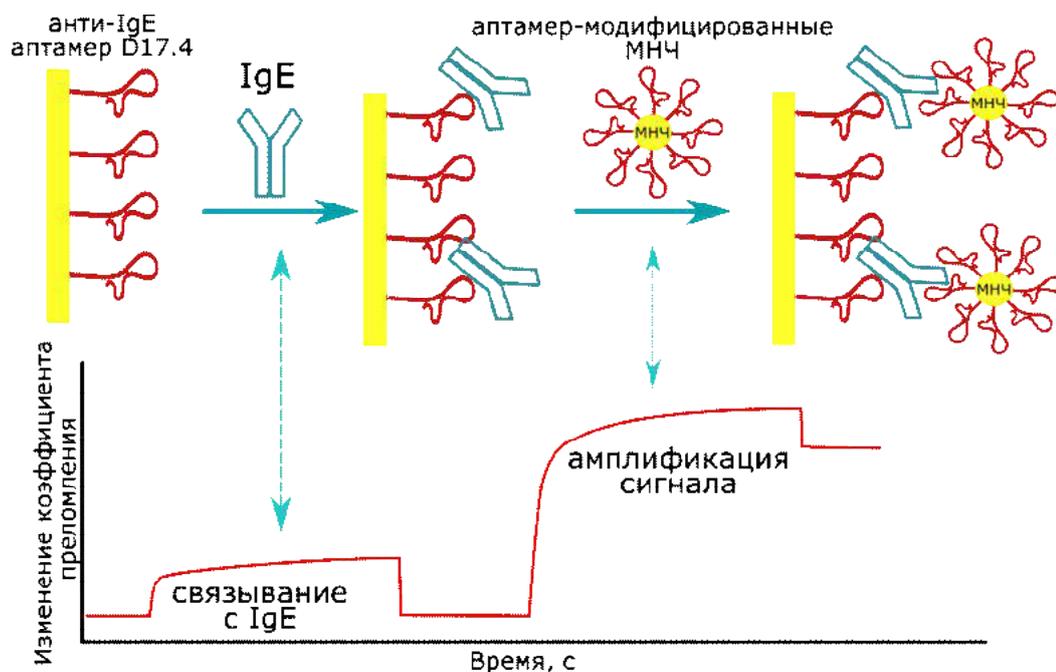


Рисунок 1.24. Схема действия работы аптасенсора с использованием аптамер-модифицированных МНЧ для детекции IgE. МНЧ – Fe₃O₄-магнитные наночастицы [76].

Принцип работы этого сенсора схож с описанным выше [72], за исключением использования магнитных наночастиц вместо наночастиц золота и использования аптамера, иммобилизованного на поверхности, в качестве первичного компонента. Предел обнаружения сенсора с использованием МНЧ составил 17 пМ, что сравнимо со значением, полученным в предыдущей работе [72].

Проанализировав современные данные по аптасенсорам для детекции IgE на основе ППР, можно заключить, что данный вид сенсоров обладает высокой чувствительностью, достигает аттомолярного предела обнаружения, также несомненным преимуществом является отсутствие необходимости введения метки в состав аптамера. Минусом данного вида аптасенсоров является возможность регистрации ложноположительных сигналов за счет неспецифического связывания с поверхностью микрочипа, а также необходимость использования сложного специализированного оборудования.

1.4.2.2. Аптасенсоры для определения IgE с колориметрическим типом детекции

В отличие от аптасенсоров на основе ППР, колориметрические системы анализа подразумевают использование доступного лабораторного оборудования, при этом колориметрическая детекция обеспечивает высокую чувствительность анализа и простоту его проведения.

В работе [77] был описан колориметрический аптасенсор, основанный на аптамер-модифицированных наночастицах золота. Оптические свойства НЧЗ обуславливаются плазмонным резонансом, связанным с коллективным возбуждением электронов, локализованным в широкой области – от видимой до инфракрасной, в зависимости от размера, формы и структуры частиц. При агрегации НЧЗ происходит изменение окраски раствора с красного на синий. Высокий коэффициент экстинкции золотых наночастиц в растворе обеспечивает высокочувствительную колориметрическую детекцию и позволяет регистрировать изменение цвета при низких концентрациях НЧЗ. При дизайне биосенсора была использована способность аптамера **D17.4** формировать две различные вторичные структуры: мономерную шпильку (рисунок 1.25А) и димерный межмолекулярный комплекс (рисунок 1.25Б).

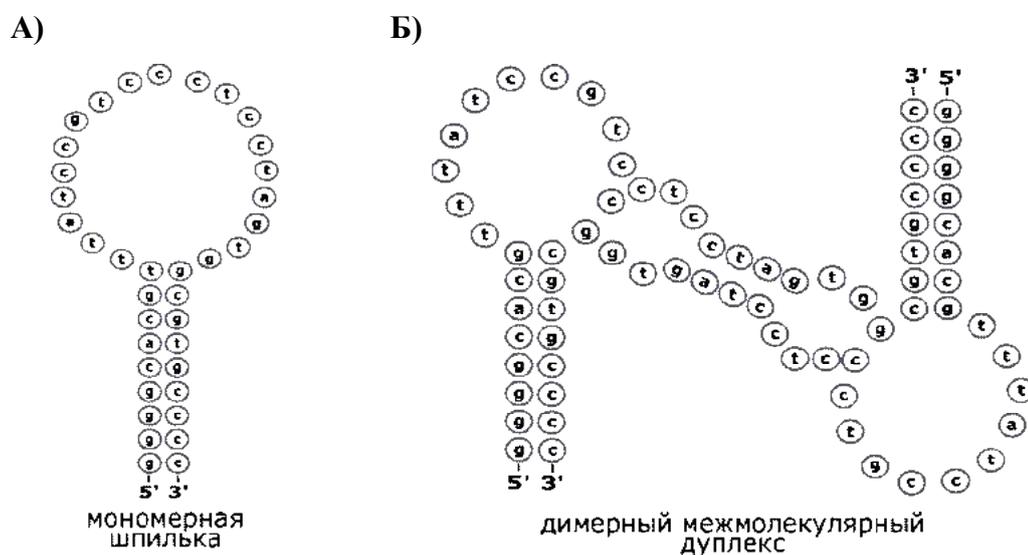


Рисунок 1.25. А) Вторичная структура аптамера **D17.4**; Б) вторичная структура гомодимера [77].

Иммобилизация аптамера на поверхности НЧЗ приводит к увеличению локальной концентрации аптамера и образованию межмолекулярных дуплексов. Аптамер **D17.4** с дополнительной 5'-концевой SH-группой инкубировали с IgE-антителами, а затем добавляли суспензию НЧЗ. При формировании комплекса аптамер-антитело и последующем ковалентном присоединении его на поверхность, НЧЗ отдаляются друг от друга за счет стерических затруднений и электростатического отталкивания (красная окраска раствора). При отсутствии в системе антител-мишеней аптамеры, присоединённые к поверхности НЧЗ, образуют межмолекулярные комплексы, это приводит к агрегации наночастиц, и раствор приобретает синий цвет. По изменению спектрофотометрических характеристик раствора можно сделать вывод об агрегации наночастиц. Схема анализа представлена на рисунке 1.26. Аптасенсор протестировали в

диапазоне концентраций IgE 1 пМ – 10 нМ, наблюдали линейную зависимость изменения окраски раствора от концентрации антител, предел обнаружения составил 18.9 пМ.

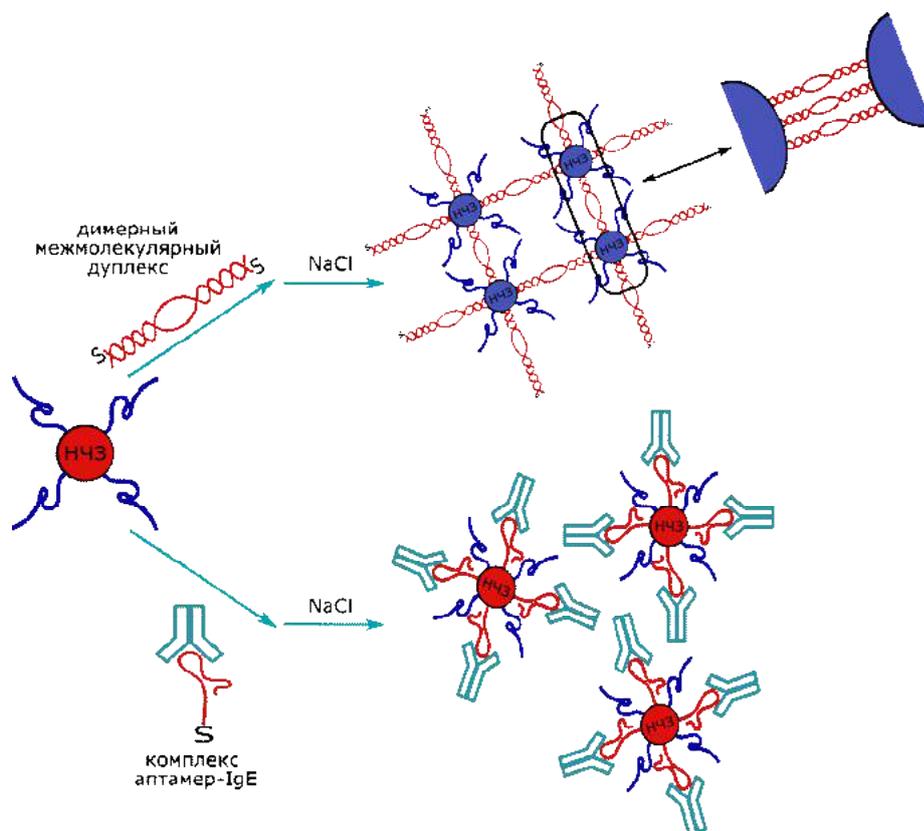


Рисунок 1.26. Схема действия колориметрического аптасенсора на основе аптамера **D17.4** с использованием свойств аптамера образовывать межмолекулярный дуплекс. НЧЗ – наночастицы золота [77].

В работе [78] был предложен другой подход к созданию колориметрического аптасенсора на основе НЧЗ. В состав аптамера **D17.4** была введена вспомогательная последовательность, комплементарная петлевому участку **D17.4**, за счет этого аптамер приобрел способность формировать вторичную структуру псевдоузла. Схема аптасенсора представлена на рисунке 1.27. Псевдоузловую структуру инкубировали с анализируемым раствором, затем добавляли к смеси НЧЗ и олигонуклеотида, комплементарного вспомогательной последовательности. В отсутствие IgE псевдоузловая структура стабильна и взаимодействует с комплементарной последовательностью, в этом случае комплементарная последовательность сорбируется на поверхности НЧЗ, и НЧЗ остаются в неагрегированном состоянии. В присутствии IgE образуется комплекс аптамер-антитело, происходит разрушение псевдоузловой структуры и высвобождение вспомогательной последовательности, которая образует комплекс с комплементарным олигонуклеотидом. В таком случае комплементарная последовательность не препятствует агрегации НЧЗ, что приводит к переходу окраски «красный-синий». Предел обнаружения полученного аптасенсора составил 0.2 нМ.

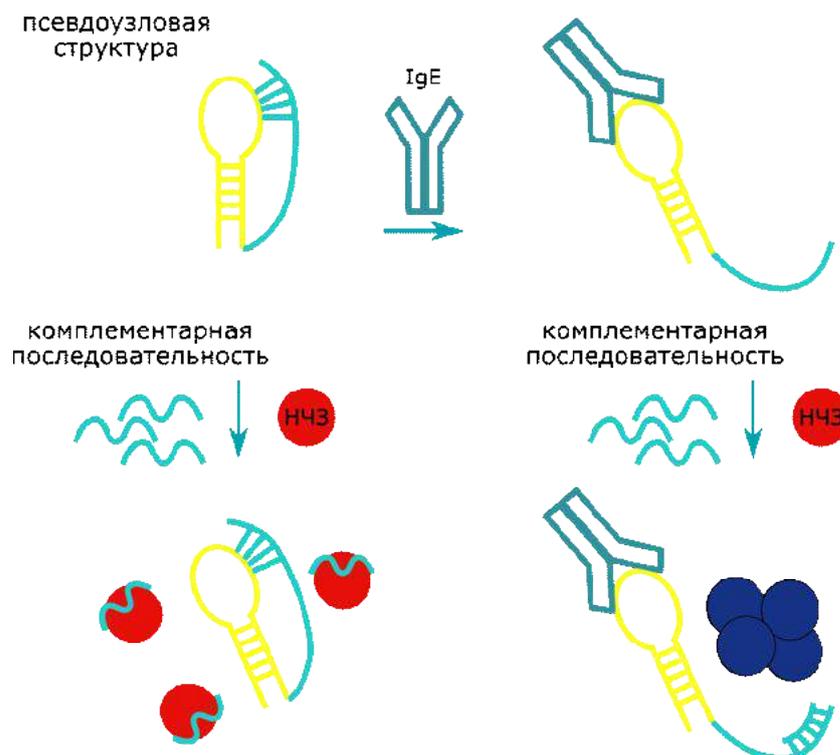


Рисунок 1.27. Схема действия колориметрического аптасенсора с использованием псевдоузловой структуры, содержащей аптамер **D17.4** [78]. H3Au – наночастицы золота.

Авторы работы [79] разработали новый метод ALONA (aptazyme-linked ON assay), в котором использовали бифункциональный аптамер, обладающий пероксидазной активностью. Аптамер объединял в своем составе анти-IgE аптамер **D17.4** и G-квадруплексный аптамер на гемин (железосодержащий порфирин, обладающий пероксидазной активностью). Полученная последовательность ДНК содержала 115 нуклеотидов, для её синтеза два аптамера соединяли при помощи клик-химии. Антигеминный аптамер с 5'-гексинильной группой и анти-IgE аптамер с азидной группой на 3'-конце были использованы в реакции азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемой медью (реакция Хьюсгена) [127]. Полученный бифункциональный аптамер (рисунок 1.28) использовали в качестве репортерного компонента для детекции IgE.

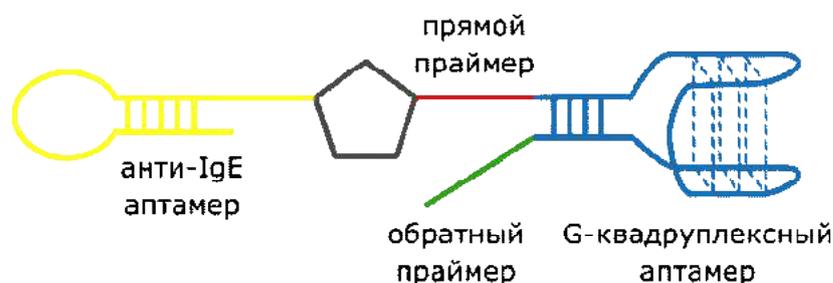


Рисунок 1.28. Схематическое представление бифункционального аптамера, объединяющего анти-IgE аптамер **D17.4** и G-квадруплексный аптамер на гемин [79].

На рисунке 1.29 схематически представлен ALONA-анализ с применением полученного бифункционального аптамера. На стенках ПЦР-пробирки за счет сорбции иммобилизовали анти-IgE моноклональные антитела, блокировали свободную поверхность, вносили препараты IgE и после кратковременной инкубации и промывки добавляли бифункциональный аптамер. Связанные G-квадруплексы геминового аптамера амплифицировали геликаза-зависимой амплификацией. На последнем этапе для получения колориметрического сигнала добавляли гемин и хромогенный субстрат 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоукислоту) (ABTS). При наличии в образце целевых IgE антител раствор приобретал зеленый цвет, предел обнаружения полученного аптасенсора составил 1 пМ.

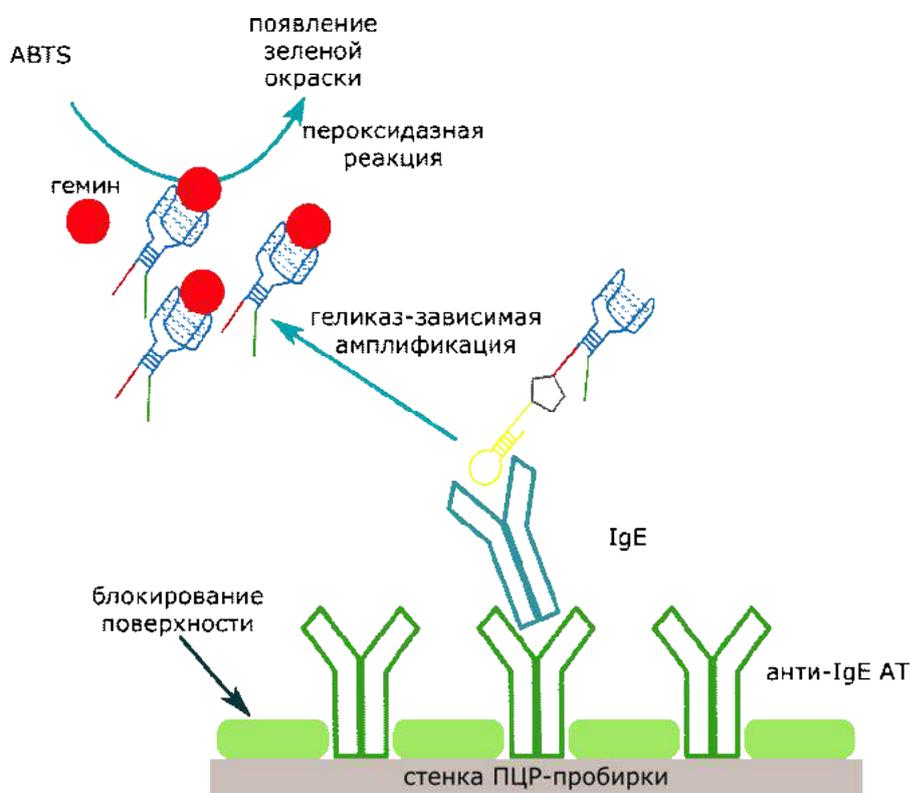


Рисунок 1.29. Схема действия ALONA-аптасенсора на основе бифункционального аптамера [79]. ABTS - 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоукислота).

Аптасенсоры с колориметрическим типом детекции, основанном на измерении изменения окраски раствора, позволяют количественно оценивать содержание IgE с достаточно высокой точностью – предел обнаружения таких сенсоров достигает пикомолярных значений. При этом колориметрические системы анализа достаточно просты и подразумевают использование доступного лабораторного оборудования.

1.4.2.3. Аптасенсоры для определения IgE с люминесцентным типом детекции

Системы детекции в растворе

Для детекции связывания аптамера **D17.4** с IgE в работе [80] был использован флуоресцентный комплекс рутения $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ (рисунок 1.30), интеркалирующий в двуцепочечный участок в структуре аптамера.

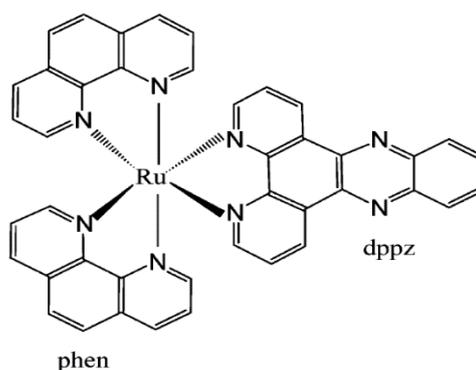


Рисунок 1.30. Химическая структура флуоресцентного комплекса рутения. Обозначения: phen – 1,10 фенантролин, dppz–дипиридо [3,2-а:2',3'-с]феназин [80].

Использование данного флуорофора позволяет получить чувствительный флуоресцентный сигнал. Сам по себе комплекс $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ в растворе имеет низкую интенсивность испускания флуоресценции, т.к. перенос энергии от металла к лиганду тушится водородными связями между феназином и водой. В присутствии аптамера происходит интеркаляция $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ в двуцепочечный участок аптамера, что приводит к разрушению водородных связей и увеличению интенсивности сигнала в 20 раз. Интенсивность флуоресценции комплекса зависит от пространственной структуры аптамера. В случае связывания аптамера с мишенью происходит изменение пространственной структуры аптамера, поэтому авторы работы предположили, что по изменению интенсивности флуоресценции можно будет сделать вывод о присутствии мишени в растворе. Было показано, что при добавлении IgE интенсивность флуоресценции дополнительно возрастает, в то время как добавление других белков не вызывает изменения флуоресценции, что говорит о специфичности детекции. Предел обнаружения IgE в данной системе составил 500 пМ.

В работе [81] описано создание флуоресцентных аптасенсоров на основе аптамера **D17.4** с детекцией методом флуоресцентной поляризации (ФП). В рамках этого метода флуорофор в составе комплекса аптамер-антитело возбуждают плоскополяризованным светом, а затем измеряют анизотропию испускания флуоресценции. В качестве флуоресцентных меток использовали флуоресцеин и краситель техасский красный,

введенные на 5'-конец аптамера через линкеры различной длины (С6 или С12). Было показано, что природа флуорофора влияет на чувствительность анализа в большей степени, чем длина линкера, используемого для конъюгирования. Наибольшей чувствительностью обладал конъюгат аптамера с красителем тexasским красным, присоединенным через линкер С12. Предел обнаружения IgE при использовании этого варианта составил 350 пМ.

В работе [82] флуоресцентную метку – флуоресцеин – вводили не в концевое положение аптамера **D17.4**, а присоединяли к нуклеотиду, находящемуся в сайте связывания аптамера с антителом. Система содержала также антитела к флуоресцеину (анти-FITC антитела). В отсутствие IgE-мишени анти-FITC антитела связываются с остатком флуоресцеина, что приводит к тушению флуоресценции. Если аптамер связывается с IgE, анти-FITC антитело не может связаться с флуоресцеином, и благодаря этому наблюдается флуоресцентный сигнал. Принцип действия такого аптасенсора представлен на рисунке 1.31. Предел обнаружения для данного аптасенсора составил 100 пМ.

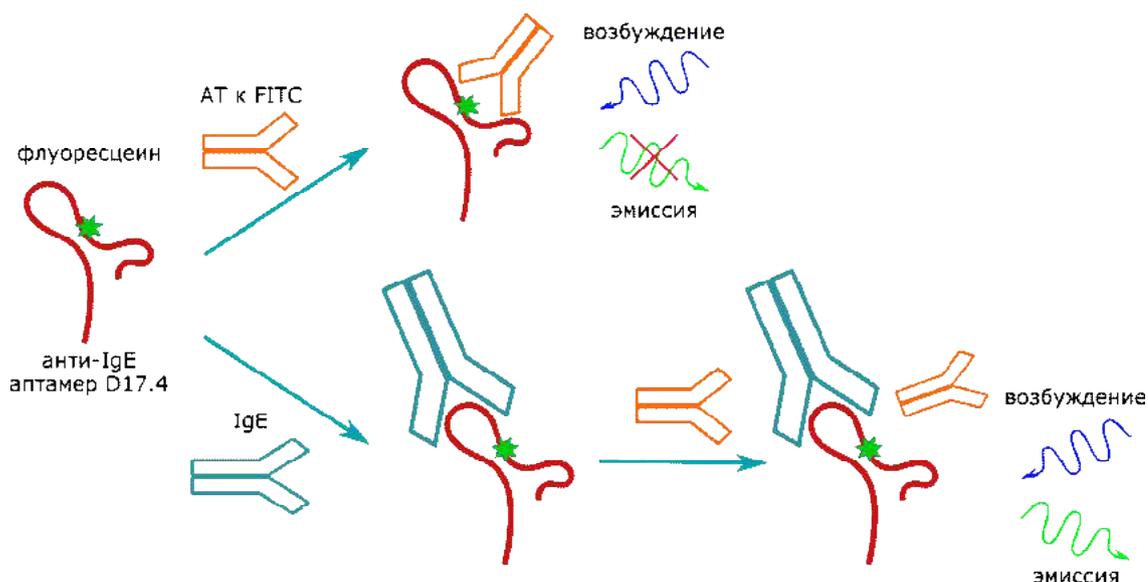


Рисунок 1.31. Схематическая иллюстрация принципа действия аптасенсора на основе аптамера **D17.4** с использованием анти-FITC антител [82].

В работе [83] описан аллостерически регулируемый аптасенсор, в конструкцию которого помимо IgE-связывающего аптамера **D17.4** входит дополнительный 37-звенный ДНК-фрагмент, способный гибридизоваться с комплементарным «молекулярным маяком» (рисунок 1.32). «Молекулярный маяк» представляет собой олигодезоксирибонуклеотид, образующий шпилечную структуру и несущий остатки флуорофора (FAM) и тушителя (dabcyl – 4-(4'-диметиламинофенилазо)бензойная кислота). Последовательность «молекулярного маяка» содержит сайт узнавания эндонуклеазы Nt.BbvCI, поэтому, если

он находится в линейной форме, происходит специфическое расщепление нуклеазой. При связывании аптамер-содержащей конструкции с IgE дополнительный фрагмент изменяет свою вторичную структуру, оказываясь доступным для связывания с «молекулярным маяком». При этом происходит разрушение шпильочно-петлевой структуры «маяка» и стерическое расхождение флуорофора и тушителя, что приводит к появлению флуоресцентного сигнала. Одновременно сайт узнавания эндонуклеазы в составе «молекулярного маяка» становится доступным для гидролиза, и происходит его расщепление по сайту рестрикции. После диссоциации продуктов реакции аптамер может связываться с новой молекулой «молекулярного маяка», что обеспечивает амплификацию сигнала. Предел обнаружения для данного аптасенсора составляет 5 пМ.

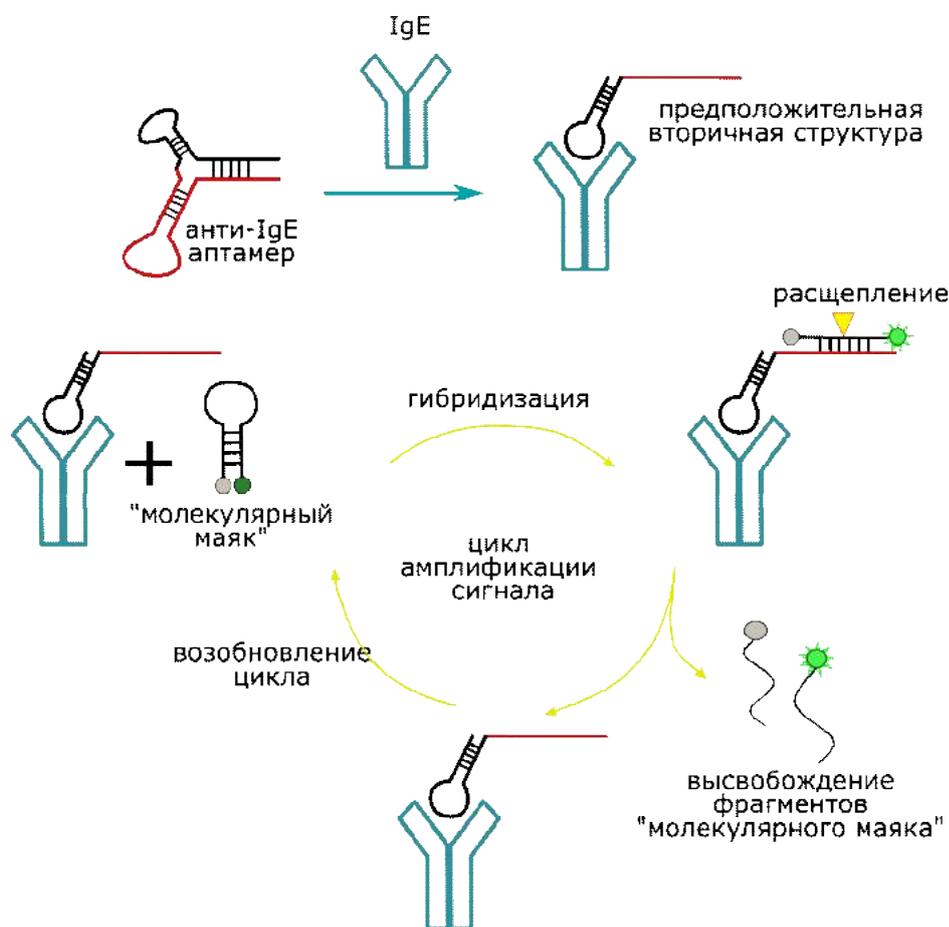


Рисунок 1.32. Схема аллостерически регулируемого флуоресцентного аптасенсора на основе аптамера **D17.4** [83]. «Молекулярный маяк» – олигодезоксирибонуклеотид, несущий остатки флуорофора (FAM) и тушителя (dabcyl).

Авторы работы [84] также использовали вспомогательные олигонуклеотиды при конструировании системы флуоресцентной детекции. В этом случае краситель техасский красный был присоединен к олигодезоксирибонуклеотиду (Т-ДНК), комплементарному фрагменту аптамера **D17.4**. К другому олигодезоксирибонуклеотиду, комплементарному соседнему участку **D17.4**, был присоединен тушитель – дабсил (Q-ДНК). В отсутствие IgE

аптамер связан с комплементарными последовательностями, несущими на себе флуорофор и тушитель, таким образом происходит тушение флуоресценции (см. схему детекции на рисунке 1.33). В присутствии мишени аптамер связывается с антителом, в результате вспомогательные олигонуклеотиды диссоциируют из комплекса, флуорофор и тушитель удаляются друг от друга, что приводит к появлению флуоресцентного сигнала. Предел обнаружения IgE с использованием такого сенсора составил 0.57 пМ.

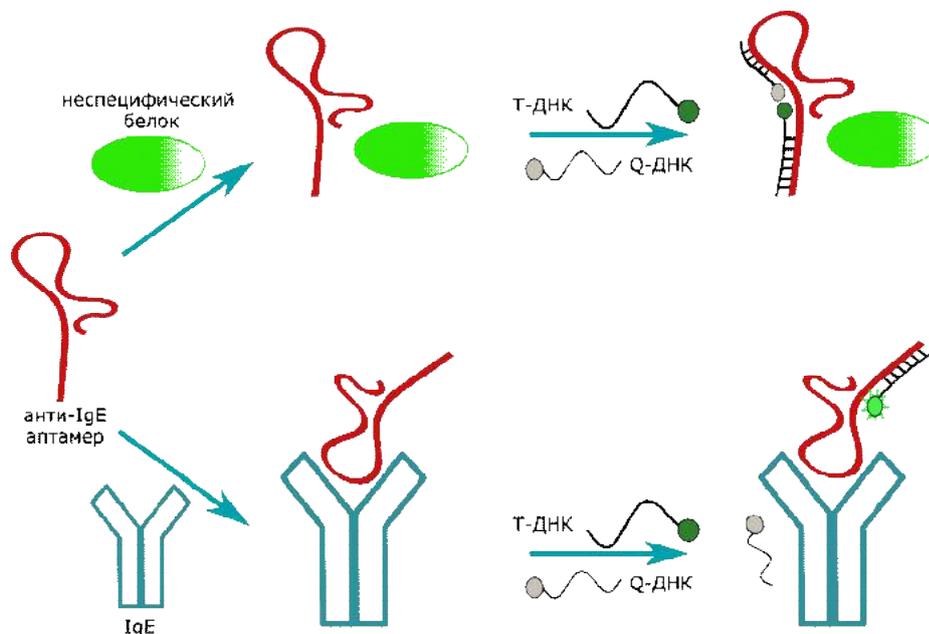


Рисунок 1.33. Схема действия флуоресцентного аптасенсора на основе аптамера D17.4 [84]. Т-ДНК – олигодезоксирибонуклеотид, несущий флуорофор (краситель техасский красный), Q-ДНК – олигодезоксирибонуклеотид, несущий тушитель (дабсил).

Гетерогенные системы

Гетерогенные системы детекции являются более сложными, но обеспечивают бóльшую специфичность и чувствительность детекции за счет возможности «обогащения» анализируемых образцов молекулами-мишенями и возможности отмывки нецелевых молекул, позволяющей исключить ложноположительные сигналы. Далее мы рассмотрим примеры гетерогенных систем флуоресцентной детекции IgE с использованием аптамера D17.4.

В работе [86] флуоресцентные метки вводили не в состав аптамера, а присоединяли к антителам в исследуемом образце. Для мечения антител были использованы красители техасский красный, Alexa 555 и Alexa 647, что позволило получать данные об образовании комплекса при различных длинах волн. Аминомодифицированный по 3'-концу аптамер был иммобилизован на предметном стекле, к которому затем добавляли анализируемый раствор. По степени изменения интенсивности флуоресценции рассчитывали степень связывания между аптамером и антителами. Предел обнаружения IgE для полученного

аптасенсора составил 0.5 нМ. В работе [87] биотинилированный аптамер **D17.4** иммобилизовали на предметных стеклах, покрытых стрептавидином или нейтравидином. В качестве флуоресцентной метки был использован цианиновый краситель Су3, который присоединяли к антителам. Изменение способа иммобилизации аптамера на предметном стекле, а также некоторых параметров, при которых исследовалось связывание, снизило предел обнаружения аптасенсора до 0.01 нМ.

В работе [90] был предложен подход к созданию флуоресцентного аптасенсора, не предполагающий использования отдельной флуоресцентной метки. Аптамер **D17.4** был иммобилизован на полистирольных частицах, анти-IgE моноклональные антитела – на магнитных частицах. Схематическое изображение принципа действия данной системы приведено на рисунке 1.34. При введении в систему IgE-антител образуется комплекс, который отделяют от несвязавшихся компонентов под действием магнитного поля. Затем проводят модификацию 3,4,5-триметоксифенилглиоксалем (TMPG), который реагирует с остатками гуанозина в составе аптамера с образованием флуоресцентного производного. Флуоресцентный сигнал позволяет детектировать наличие IgE в анализируемом образце с пределом обнаружения 4.6 пМ.

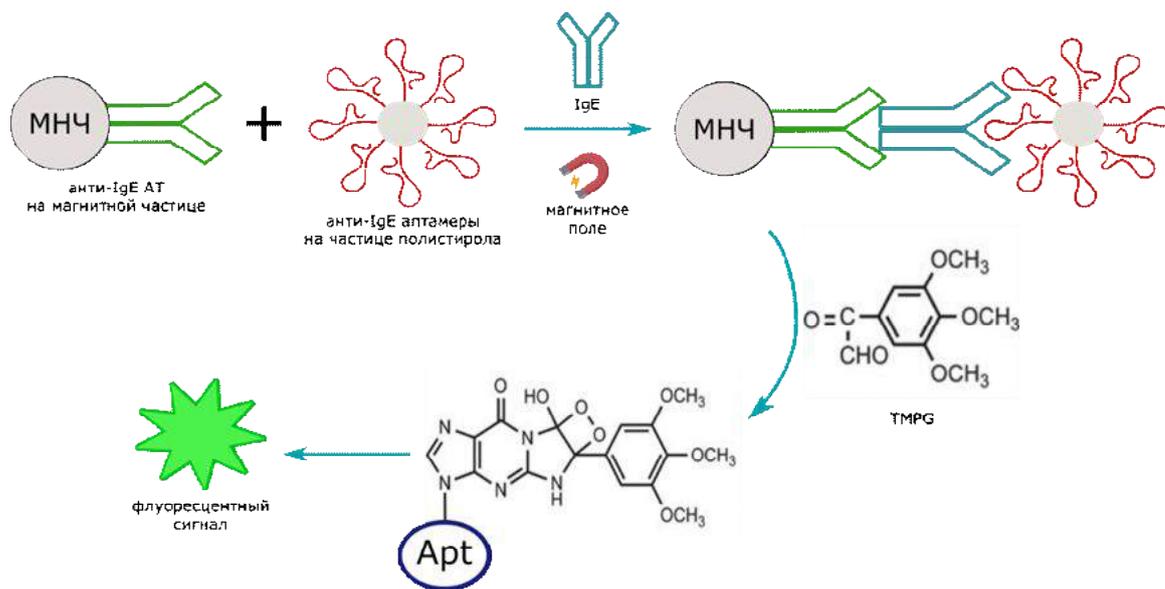


Рисунок 1.34. Схема действия флуоресцентного аптасенсора на основе аптамера **D17.4** с использованием магнитных частиц и TMPG [90]. МНЧ – магнитные наночастицы

В работе [88] при создании аптасенсора был применен эффект усиления флуоресценции вблизи поверхности металла (metal-enhanced fluorescence). Авторы использовали наночастицы серебра, к каждой частице была присоединена одна молекула анти-IgE аптамера и несколько молекул вспомогательных ДНК-дуплексов, образованных олигодезоксинуклеотидами олиго-В и олиго-Су5 (конъюгат с цианиновым красителем Су5). Олигонуклеотидный дуплекс использовали для того, чтобы обеспечить

фиксированное расстояние между флуоресцентной меткой и поверхностью наночастицы. В состав системы входили также анти-IgE антитела, иммобилизованные на поверхности биочипа. Принцип действия аптасенсора схематично изображен на рисунке 1.35: на биочип наносят анализируемый раствор, затем добавляют наночастицы серебра, несущие аптамер и флуоресцентную метку, и измеряют изменение флуоресценции в системе. Такой подход позволяет достигнуть предела обнаружения в 5 пМ.

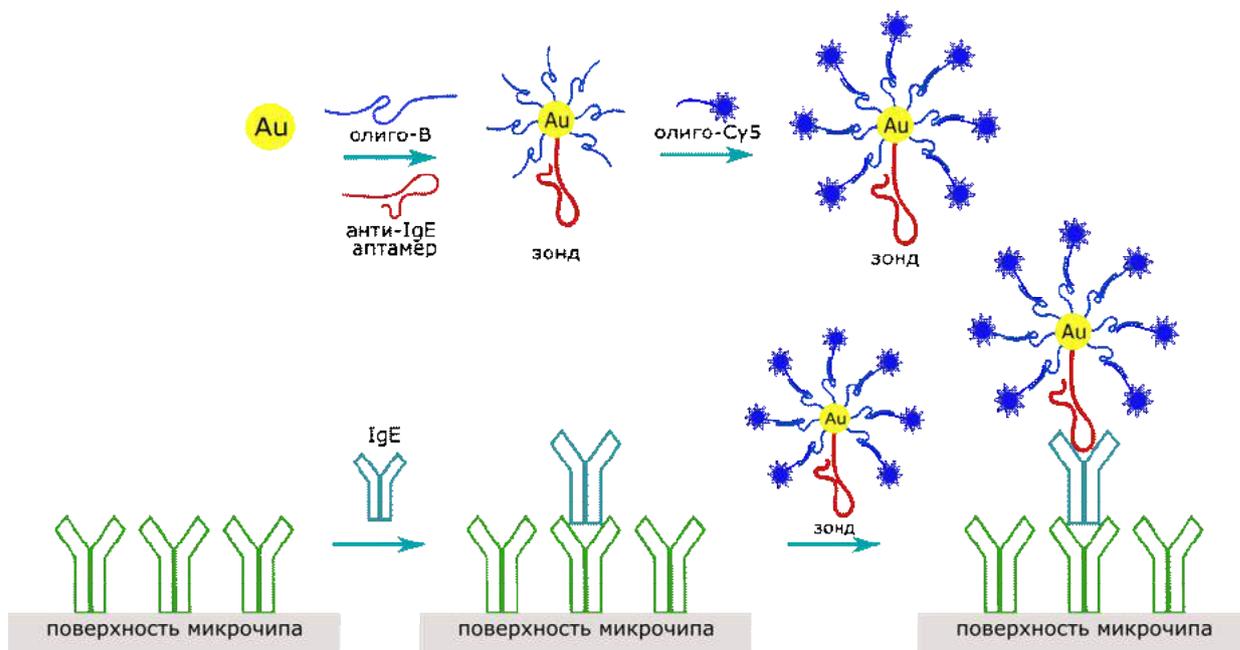


Рисунок 1.35. Схема действия флуоресцентного аптасенсора на основе аптамера **D17.4** и наночастиц серебра [88]. Au – наночастицы золота, олиго-В – вспомогательная последовательность, комплементарная олиго-Су5 (конъюгат с цианиновым красителем Су5).

Другим примером применения частиц металла при конструировании аптасенсоров является использование наночастиц золота, которые могут аккумулировать хемилюминесцентные агенты. В работе [92] при создании аптасенсоров аптамер **D17.4** присоединяли к наночастицам золота. Метод детекции включает в себя несколько стадий (рисунок 1.36), на первой из которых анализируемые IgE образуют комплекс с моноклональными анти-IgE антителами, иммобилизованными в лунках планшета. Для образования «сэндвич»-комплекса в лунку планшета добавляли аптамер-функционализованные наночастицы золота, в результате чего происходило формирование тройного комплекса. Принципиально важной стадией является обработка NH_2OH и HAuCl_4 , в результате которой выпадающее в осадок золото дополнительно накапливается на поверхности золотых наночастиц. Для образования люминесцентного сигнала в систему добавляют люминол и нитрат серебра, реагирующие друг с другом в присутствии золота с образованием хемилюминесцентного свечения. Использование

дополнительной обработки, увеличивающей количество золота на поверхности сенсора, приводит к усилению сигнала. Предел обнаружения IgE для данного аптасенсора составляет 50 фМ.

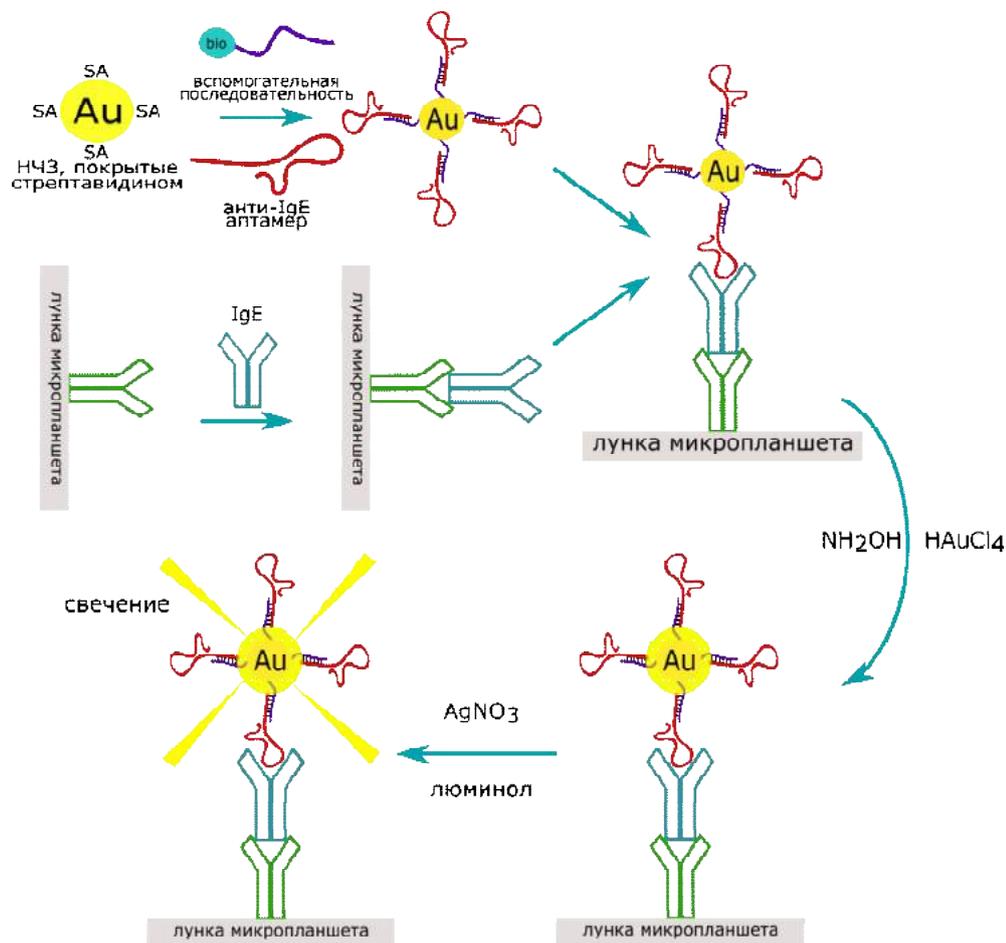


Рисунок 1.36. Схема действия аптасенсора на основе аптамера D17.4 и золотых наночастиц для получения люминесцентного сигнала [92]. Au – наночастицы золота, SA – стрептавидин.

В работе [91] для усиления флуоресцентного сигнала красителя Cu_3 были использованы наночастицы серебра. Кроме того, авторами была разработана система амплификации флуоресцентного сигнала. В ее состав входили наночастицы серебра Tag-A и Tag-B с присоединенными к ним анти-IgE аптамером, олигомером $(dA)_{15}$, олигомером $(dA)_{24}$, несущим Cu_3 -метку, а также комплементарными друг другу олигодезоксирибонуклеотидами A (для Tag-A) и B (для Tag-B). Все олигонуклеотиды были присоединены к поверхности серебра через сульфгидрильные группы на 5'-конце. Схема детекции IgE в данной системе приведена на рисунке 1.37. В ходе анализа на предметное стекло с иммобилизованными анти-IgE моноклональными антителами наносят анализируемый образец IgE, после чего добавляют частицы Tag-A и Tag-B. Аптамеры, входящие в их состав, связываются с IgE, после чего за счет комплементарных взаимодействий между олигомерами A и B происходит связывание свободных

конъюгатов Tag-A и Tag-B друг с другом. Полиадениновые последовательности необходимы для увеличения стабильности образуемых комплексов. Количество IgE в образце определяли по флуоресценции $Cy3$, предел обнаружения IgE в этой системе составил 211 фМ.

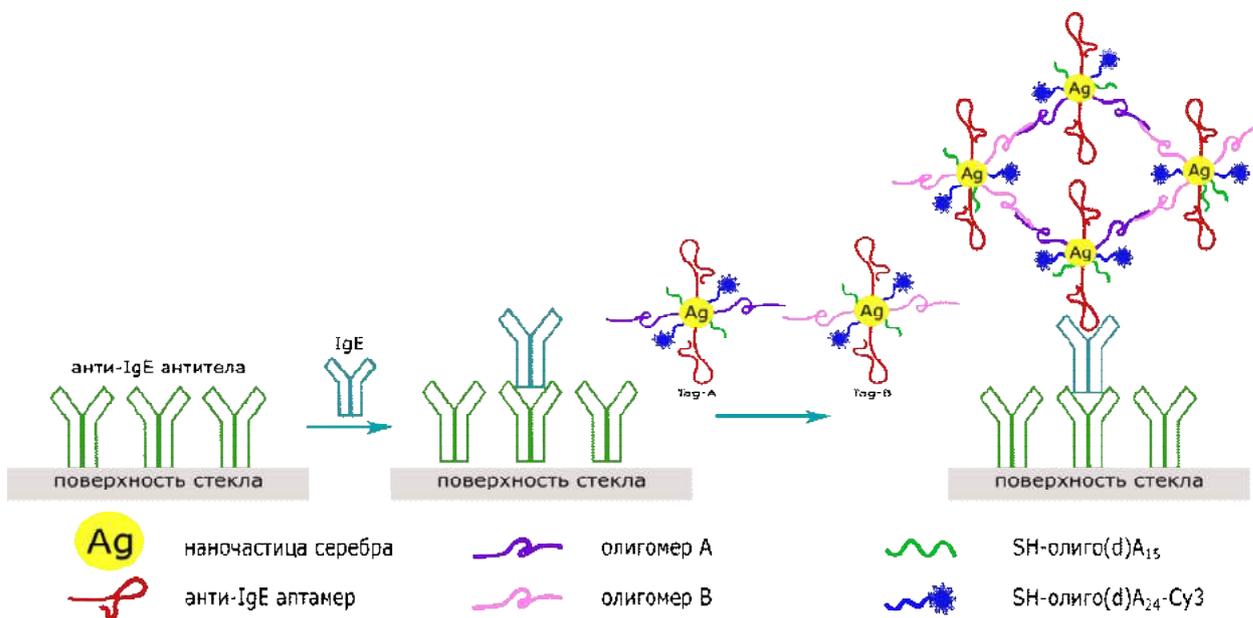


Рисунок 1.37. Схема действия аптасенсора на основе на основе аптамера **D17.4** и серебряных наночастиц с амплификацией флуоресцентного сигнала [91]. Ag – наночастица серебра, олигомеры A и B – комплементарные друг другу олигодезоксирибонуклеотиды, (dA)₂₄ – олигомер, несущий Cy3-метку, (dA)₁₅ – олигомер, используемые для стабилизации наночастиц.

Дальнейшим усовершенствованием конструкций аптасенсорных систем стало создание мультифункциональной системы для одновременной детекции нескольких молекул-мишеней [93]. На наночастицы серебра, зафиксированные на предметном стекле, ковалентно иммобилизуют олигодезоксирибонуклеотиды, комплементарные последовательностям ДНК-аптамеров к IgE и тромбину. Аптамеры к разным мишеням несут различные флуоресцентные метки: $Cy3$ (анти-IgE аптамер) и $Cy5$ (анти-тромбиновый аптамер). При добавлении к комплексу молекул-мишеней происходит их связывание с аптамерами и диссоциация аптамеров от иммобилизованных олигонуклеотидов, что приводит к изменению флуоресцентных сигналов обоих флуорофоров (рисунок 1.38). Детекция испускания флуоресценции на двух длинах волн позволяет определять концентрацию тромбина и IgE в пробе независимо друг от друга и с высокой точностью (0.4 фМ).

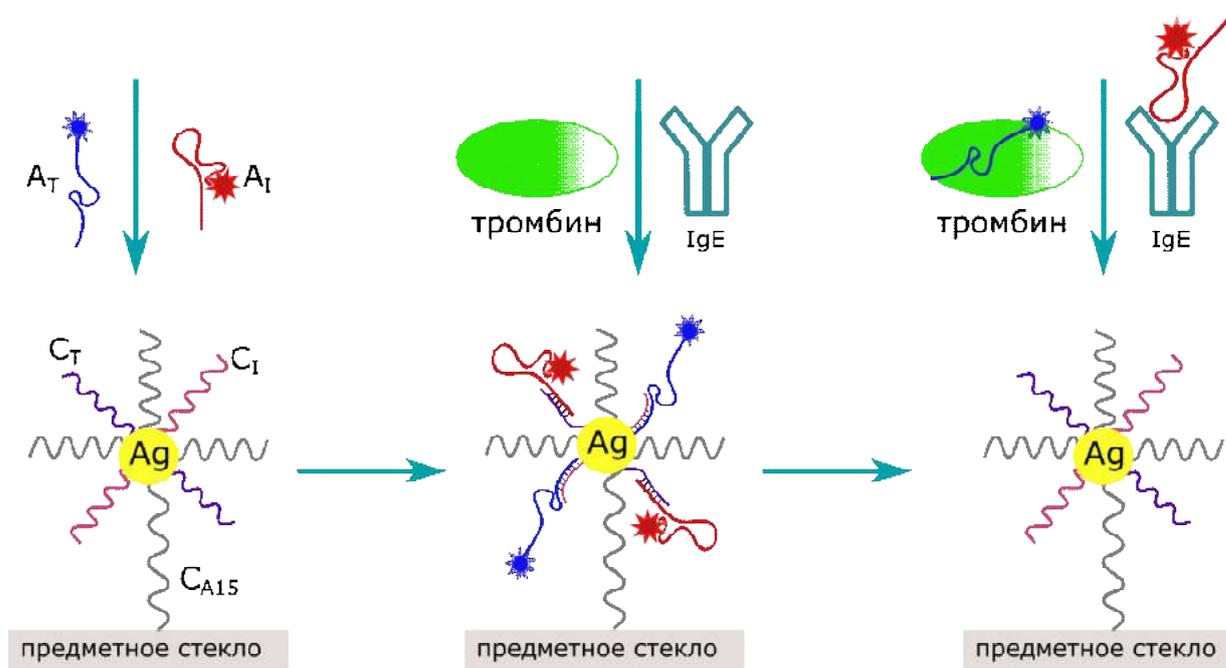


Рисунок 1.38. Схема действия мультифункционального аптасенсора для определения тромбина и иммуноглобулинов класса E [68]. AgNPs – наночастица серебра, A_T – $Cy5$ -меченый аптамер к тромбину; A_I – $Cy3$ -меченый аптамер к IgE; C_I – олигодезоксирибонуклеотид, комплементарный анти-IgE аптамеру; C_T – олигодезоксирибонуклеотид, комплементарный антитромбиновому аптамеру; C_{A15} – олигодезоксирибонуклеотид, с помощью которого наночастица серебра иммобилизована на предметном стекле через терминальную аминогруппу [93].

В качестве тушителя флуоресценции при создании аптасенсора может быть использован оксид графена, обеспечивающий тушение за счет стэкинг-взаимодействий между поверхностью оксида графена и азотистыми основаниями в составе нуклеиновых кислот. За счет этих же взаимодействий возможна иммобилизация аптамеров на его поверхности. В работе [89] было предложено создание аптасенсора для чувствительного определения IgE, основанного на принципе тушения флуоресценции оксидом графена. К 5'-концу последовательности анти-IgE аптамера **D17.4** был присоединен остаток флуоресцеина. В отсутствие антител происходит тушение флуоресцеина оксидом графена. При добавлении IgE-антител происходит образование комплекса аптамер-антитело, разрушаются стэкинг-взаимодействия аптамер-оксид графена и наблюдается разгорание флуоресценции, пропорциональное количеству связанного IgE (рисунок 1.39). Предел обнаружения в данном случае составил 22 пМ.

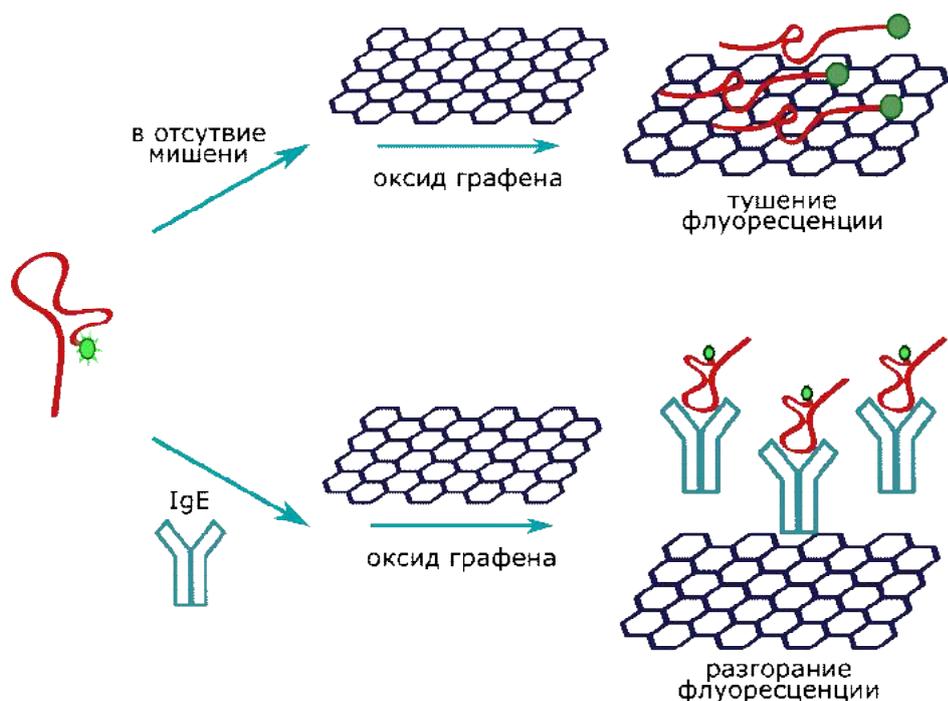


Рисунок 1.39. Схема действия флуоресцентного аптасенсора на основе аптамера **D17.4** и оксида графена [89].

Авторы работы [94] сконструировали для детекции IgE антител два типа биосенсоров на основе поли-диациетиловых (ПДА) липосом с использованием аптамера **D17.4** и моноклональных анти-IgE-антител в качестве узнающих элементов. ПДА-супрамолекулы – класс полимеров, представляющих собой одноцепочечные липидные молекулы с чередующимися тройными связями. Полимеризованные ПДА структуры (липосомы или бислои) характеризуются наличием синей окраски, детектируемой невооруженным глазом, которая может измениться на красную при так называемом стрессировании липосом - изменении температуры, pH, механической встряске, смене раствора и связывании лиганд-рецептор, происходящем вблизи поверхности раздела (межфазное связывание). При смене цвета ПДА-липосомы наблюдается изменение флуоресцентного сигнала в красном диапазоне (возбуждение - 530 нм, эмиссия – 590 нм), которое можно измерить с помощью флуоресцентного микроскопа или микропланшетного ридера. Это свойство позволяет использовать ПДА-супрамолекулы при создании аналитических платформ как с колориметрическим, так и с флуоресцентным типом детекции. Имобилизованные на поверхности предметного стекла ПДА-липосомы модифицировали гидразидом биотина через терминальные карбоксильные группы, после чего добавляли стрептавидин и биотинилированные анти-IgE моноклональные антитела (рисунок 1.40А) или биотинилированный аптамер **D17.4** (рисунок 1.40Б).

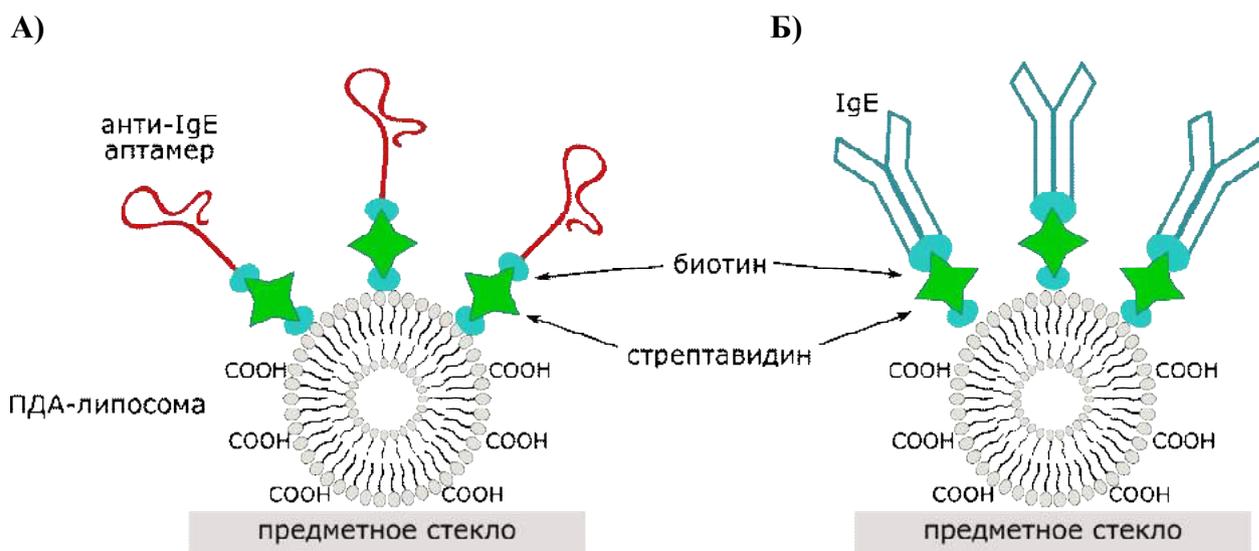


Рисунок 1.40. Схема аптасенсора на основе ПДА-липосом с использованием **А)** анти-IgE моноклональных антител **Б)** аптамера **D17.4** [94].

После модификации поверхности ПДА-липосом биотином флуоресцентный сигнал увеличивался незначительно, что свидетельствует о том, что присоединения низкомолекулярного биотина недостаточно для стрессирования липосом. При последующем присоединении стрептавидина (60 кДа) сигнал возрастал, и дополнительно увеличивался в случае присоединения в качестве рецептора анти-IgE антител (190 кДа). Однако добавление детектируемых IgE антител не приводило к резкому изменению флуоресцентного сигнала. Авторы объясняют это тем, что комплекс стрептавидин/антитело на поверхности ПДА-липосом уже обладал молекулярной массой, достаточной для стрессирования. Значительно более удачным вариантом оказалось использование в качестве рецептора аптамера **D17.4** со сравнительно небольшой собственной молекулярной массой (11.3 кДа). В такой системе основное увеличение флуоресцентного сигнала происходило при добавлении аналита. Флуоресцентный сигнал полученного аптасенсора линейно увеличивался при увеличении концентрации целевых IgE в аналитическом растворе, предел обнаружения аптасенсора составил 141 нг/мл (0.7 нМ).

В работе [95] была разработана стратегия амплификации сигнала для более чувствительной детекции IgE с использованием поли-диацетиленовых (ПДА) супрамолекул. Для проведения анализа ПДА-липосомы иммобилизовали на поверхности предметного стекла через этилендиаминовый линкер и модифицировали с использованием анти-IgE аптамера **D17.4** с 3'-концевой аминогруппой. После добавления аналита, инкубации и отмывки несвязавшихся мишеней в систему добавляли моноклональные анти-IgE антитела для увеличения флуоресцентного сигнала (схема

детекции представлена на рисунке 1.41). Присоединение аптамера к поверхности липосомы через линкер позволило проводить пошаговую регистрацию увеличения флуоресцентного сигнала: при добавлении IgE-мишеней, а затем при введении в систему вторичных анти-IgE антител.

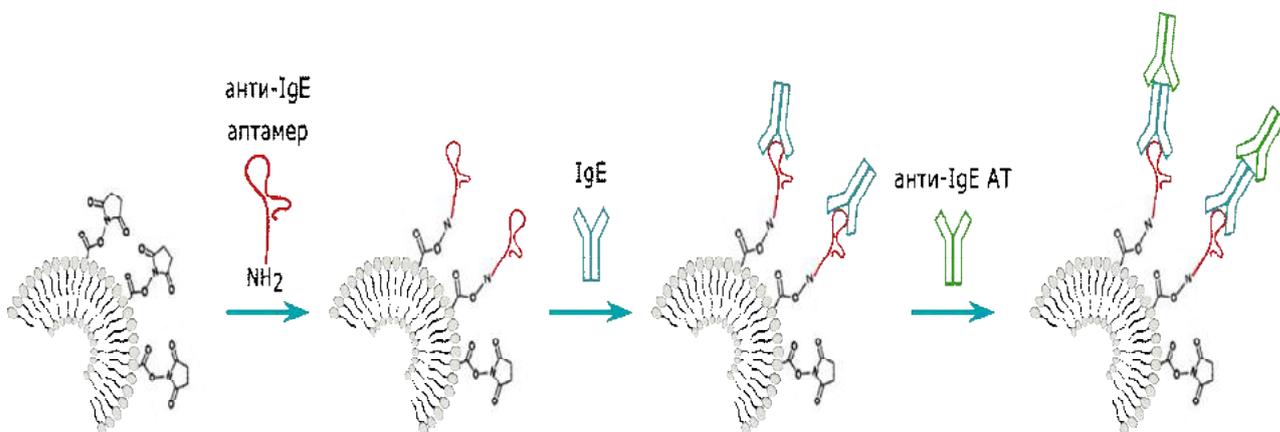


Рисунок 1.41. Схема аптасенсора для детекции IgE с использованием ПДА-супрамолекул в качестве амплифицирующего агента [95].

Предел обнаружения составил 0.5 пМ. Полученный аптасенсор также демонстрировал специфичность по отношению к IgE: сигнал в присутствии других белков (БСА, фибриноген и IgG человека) не отличался от фонового.

Таким образом, к настоящему времени создан широкий спектр аптасенсоров с люминесцентным типом детекции, позволяющих специфично и с высокой чувствительностью детектировать IgE-антитела, как в гомогенном, так и в гетерогенном формате. Широкое разнообразие флуоресцентных красителей с различными физико-химическими свойствами позволяет подобрать флуорофоры для решения практически любых аналитических задач и даже сконструировать мультифункциональный сенсор, определяющий несколько типов мишеней. Введение систем амплификации флуоресцентного сигнала дает возможность достижения фемтомолярного предела обнаружения IgE при использовании аптасенсора.

В заключение следует отметить, что получение НК-аптамеров к антителам – важная и интересная задача, как в фундаментальном, так и в прикладном плане. Аптамеров к антителам пока не очень много, однако очевидно, что это направление вызывает интерес с точки зрения создания различных систем для аффинного выделения антител, исследования их свойств и блокирования их функциональной активности. Наиболее широкое применение аптамеры нашли в качестве узнающего компонента в составе биосенсоров для определения концентрации антител. На данный момент созданы аптасенсоры для детекции IgG- и IgE-антител, с преобладанием последних. Аптасенсоры для детекции IgE, в частности, с оптическим типом детекции, имеют высокую

чувствительность и широкое разнообразие конструкций. Принципы конструирования, использованные при создании аптасенсоров на IgE-антитела, могут быть в дальнейшем использованы и при разработке аптасенсоров для детекции других сходных иммуноглобулинов. Получение и использование аптамеров к IgG, особенно к IgG-аутоантителам при аутоимунных заболеваниях, представляет особый интерес, потому что во многих случаях не существует достоверного лабораторного способа их диагностики и эффективных методов терапии.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1. Исходные материалы

В работе были использованы следующие реактивы и растворители: 5'-О-диметокситритил-2'-О-*трет*-бутилдиметилсилил-N⁶-бензоилрибоаденозин-3'-N,N-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида (A-CE) (Glen Research, США), 5'-О-диметокситритил-2'-О-*трет*-бутилдиметилсилил-N²-изобутирилрибогуанозин-3'-N,N-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида (G-CE) (Glen Research, США), 5'-О-диметокситритил-N⁴-ацетил-2'-F-рибоцитидин-3'-N,N-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида (C^F-CE) (Glen Research, США), 5'-О-диметокситритил-2'-F-уридин-3'-N,N-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида (U^F-CE) (Glen Research, США), полимерный носитель CPG-500 с присоединенным 5'-О-диметокситритил-2'-О-*трет*-бутилдиметилсилил-N⁶-бензоилрибоаденозином (Glen Research, США), CPG-500 с 5'-О-диметокситритил-2'-О-*трет*-бутилдиметилсилил-N²-изобутирилрибогуанозином (Glen Research, США), 3'-PT-аминомодифицированный полимерный носитель CPG-500 с линкером C3 (Glen Research, США), N-метилимидазол (N-MeIm), дитиотреит, додецилсульфат натрия (Life Technologies, США), этилтиотетразол, трис(гидроксиметил)аминометан (Sigma-Aldrich, США), тетрагидрофуран, пиридин (Panreac, Испания), 40%-ный водный метиламин (Merck, Германия), ацетонитрил (ос.ч.) (Panreac, Испания), диметилсульфоксид (ос. ч.), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, 2,6-лутидин, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид (Acros Organics, Бельгия), Твин 20, перхлорат натрия, персульфат аммония, краситель "Stains-All", полиэтиленгликоль 8000, хлорид магния, мочевины, ксиленцианол FF, бромфеноловый синий, Тритон X-100 (Serva, Германия), дихлоруксусная кислота, хлорид калия (Fluka, Швейцария), Na₂ЭДТА (Amresco, США), спермидин гидрохлорид (CALBiochem, США), 2-бис(2-гидроксиэтил)-аминоуксусная кислота, γ -[³²P]-АТФ и 5'-[³²P]-pCp (15*10⁷МБк/моль, "Биосан", Россия), 2'-F-УТР, 2'-F-СТР (НаноТех-С, Россия), АТФ и GTP (Fermentas, Латвия), гидрокарбонат натрия (ос.ч.), карбонат натрия (ос.ч.) и другие реактивы и растворители отечественного и импортного производства.

Для ферментативных реакций использовали полинуклеотидкиназу фага T4 (КФ 2.7.1.78), РНК-полимеразу фага T7 (КФ 2.7.7.6), бактериальную щелочную фосфатазу (КФ 3.1.3.1), ДНКазу I (КФ 3.1.4.5), неорганическую пирофосфатазу (КФ 3.6.1.1), рибонуклеазу T1 (КФ 3.1.27.3) (Fermentas, Латвия), Taq ДНК-полимеразу (КФ 2.7.7.7) ("Биосан", Россия).

При измерении констант диссоциации комплексов аутоантител и 2'-F-РНК использовали нитроцеллюлозные фильтры MF-Millipore™ с размером пор 0.45 мкм (Millipore, Ирландия).

Олигодезоксирибонуклеотиды-праймеры **pr3**, **pr5** и оцДНК-матрицы **ssDNAII-8**, **ssDNAIII-7**, **ssDNAII-3**, **ssDNAII-11**, **ssDNAI-3**, **ssDNAIII-6**, **ssDNAII-9**, **ssDNAII-5** (таблица 2.1) были синтезированы в ЛХРНК ИХБФМ СО РАН М.А. Воробьевой и М.И. Мещаниновой на синтезаторе ASM-800 («Биоссет», Россия) с использованием протокола операций твердофазного фосфитамидного синтеза, оптимизированного для данного прибора. Выделение олигодезоксирибонуклеотидов см. **2.3.1.** и **2.3.2.**

Ca²⁺-регулируемый фотопроtein обелин с уникальным остатком цистеина, доступного для сайт-направленного конъюгирования с другими молекулами (Обе-SH, мутантный вариант Asp12-Cys) получен в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН по методу описанному в [168].

Таблица 2.1. Олигодезоксирибонуклеотиды, использованные в работе.

ОН	Последовательность олигонуклеотида 5'→3'
5'-праймер pr5	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGG Подчеркиванием выделена промоторная последовательность для T7 РНК-полимеразы
3'-праймер pr3	TCGCGCGAGTTCGTCTG
ssDNAI-3	TCG CGC GAG TCG TCT GGG CAG CAC CCG AAC GAG AGC GCG AGA CTG AGG ATT GCC CTC CGC ATC GTC CTC CC
ssDNAII-3	TCG CGC GAG TCG TCT GTG GGT AAA CGA GGG TGG GGC AGA GAT GTA CTC AGA AAA CAC CGC ATC GTC CTC CC
ssDNAII-5	TCG CGC GAG TCG TCT GCA GGG TGA ACA AGG GTG GGG CAG AGA TGT ACT CAG AAA ACA CCG CAT CGT CCT CCC
ssDNAII-8	TCG CGC GAG TCG TCT GGG CAG CAC CCG AAC GAG GAG CGC GAG ACU GAG GAT TGC CCT CCG CAT CGT CCT CCC
ssDNAII-9	TCG CGC GAG TCG TCT GGG GGT AAA CAA GGG TGG GGC AGA GAT GTA CTC AGA AAA CAC CGC ATC GTC CTC CC
ssDNAII-11	TCG CGC GAG TCG TCT GCG GGT AGA CAA GGG TGG GGC AGA GAT GTA CTC AGA AAA CAC CGC ATC GTC CTC CC
ssDNAIII-6	TCG CGC GAG TCG TCT GCG GGT AAA CAA GGG TGG GGC AGA GAT GTA CTC AGA AAA CAC CGC ATC GTC CTC CC
ssDNAIII-7	TCG CGC GAG TCG TCT GTG GGT AAA CAA GGG UGG GGC AGA GAU GUA CUC AGA AAA CAC CGC ATC GTC CTC CC

Образцы крови для выделения поликлональных анти-ОБМ аутоантител, используемых при отборе аптамеров, были взяты у больных, состоящих в областной общественной организации больных РС г. Новосибирска, и у больных, состоящих на учете при кафедре неврологии и нейрохирургии НГМУ. Протокол пробоподготовки образцов крови был одобрен локальным этическим комитетом (НГМУ) согласно нормам Хельсинкской декларации. Поликлональные анти-ОБМ аутоантитела и препараты антител

здоровых доноров были выделены из образцов сыворотки крови больных РС сотрудниками лаборатории ферментов репарации ИХБФМ СО РАН, а также лично автором работы. Антитела хранили в 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 100 мМ NaCl, 0.1% Твин 20 при -20°C. Образцы сывороток крови больных РС и здоровых доноров для проведения гетерогенного анализа были предоставлены кафедрой неврологии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом КрасГМУ, всеми пациентами было подписано информированное согласие на участие в исследовании.

Для радиоавтографии использовали кассету Bio-Rad Exposure Cassete-K (20*25см) с фоточувствительным экраном Kodak Storage Phosphor Screen SO230 (Bio-Rad, США).

Для выделения антител использовали колонки HI Trap protein G (GE Healthcare, США), хроматограф (GE Healthcare, США), CNBr-сефарозу (GE Healthcare, США), основной белок миелина (Биоалекса, Россия), агарозу, модифицированную белком А (Биосан, Россия).

Для проведения гетерогенного анализа и синтеза конъюгатов аптамеров использовали N-гидроксисукцинимидный эфир биотина (Merk, Германия), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (SMCC) (Fluka, Швейцария), стрептавидин (Sigma, США), непрозрачные 96-луночные микропланшеты (Costar, США), моноклональные IgG мыши, специфичные к Fc-фрагментам IgG человека (Биосан, Россия), нормальные IgG-антитела человека (Sigma, США).

В работе использовали приборы: систему очистки воды Simplicity System (Millipore, Ирландия), спектрофотометр Nano Drop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США), суховоздушный термостат (Jouan, Франция), термостатируемый шейкер Thermomixer compact, амплификатор Mastercycler gradient (Eppendorf, Германия), центрифуги MiniSpin plus и Centrifuge 5415R (Eppendorf, Германия), Speed-Vac Concentrator SVC-100H (Savant, США), термостатируемый шейкер (Bioer, США), прибор для сушки гелей Gel Dryer B35 (Bio-Rad, США), термостатируемую камеру для вертикального электрофореза и фосфоримиджер Molecular ImagerFX (Bio-Rad, США), люминометр LB 940 Multimode Reader (Berthold, Германия), автоматический промыватель планшетов (Биосан, Россия).

2.2. Основные методы работы

Для приготовления реакционных смесей и буферных растворов использовали дистиллированную воду, очищенную с помощью системы Simplicity System и стерилизованную автоклавированием.

Оптическую плотность растворов измеряли с помощью прибора NanoDrop 1000. Для расчета концентрации растворов олигонуклеотидов использовали коэффициенты молярного поглощения олигонуклеотидов при 260 нм, вычисленные с учетом гипохромного эффекта по формуле

$$\varepsilon = 2 \cdot (\varepsilon_{1,2} + \varepsilon_{2,3} + \dots + \varepsilon_{n-1,n}) - \varepsilon_2 - \varepsilon_3 - \dots - \varepsilon_{n-1} \text{ [128]},$$

где ε_i – молярный коэффициент поглощения нуклеотида N, $\varepsilon_{i-1,i}$ – молярный коэффициент поглощения для пары нуклеотидов.

Значения молярных коэффициентов поглощения для 2'-F-рибонуклеотидов принимали равными соответствующим молярным коэффициентам поглощения для рибонуклеотидов. Массы полученных дцДНК-библиотеки и 2'-F-модифицированной РНК-библиотеки определяли из соотношений 1 о.е. = 50 мкг и 1 о.е. = 40 мкг, соответственно [129].

Оптическую плотность растворов IgG-антител измеряли относительно буфера, содержащего 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 100 мМ NaCl, 0.1% Твин 20. Расчет концентрации производился автоматически в программном пакете NanoDrop 1000 с использованием коэффициента молярного поглощения IgG при 280 нм.

Аналитический гель-электрофорез проводили в денатурирующих условиях в 12%-ном или 15%-ном ПААГ толщиной 0.4 мм в условиях: акриламид:N,N'-метиленабисакриламид (30:1), 8 М мочевины, 50 мМ Трис-борат (рН 8.3), 0.1 мМ Na₂ЭДТА, при напряжении 50 В/см. Для нанесения олигонуклеотидных образцов на гель использовали денатурирующий буфер следующего состава: 8 М мочевины, 0.025%-ный ксиленцианол FF и 0.025%-ный бромфеноловый синий. После проведения электрофореза гель окрашивали раствором красителя “Stains-All”, приготовленным из 50 мг красителя “Stains-All” и 100 мл смеси формамид:вода (1:1). Полученные гели сушили в течение 1.5-2 часов.

Препаративный гель-электрофорез проводили в денатурирующих условиях в 12%-ном или 15%-ном ПААГ толщиной 0.8 мм в условиях: акриламид:N,N'-метиленабисакриламид (30:1), 8 М мочевины, 50 мМ Трис-борат (рН 8.3), 0.1 мМ Na₂ЭДТА, при напряжении 50 В/см. Для нанесения олигонуклеотидных образцов на гель использовали денатурирующий буфер следующего состава: 8 М мочевины, 0.025%-ный ксиленцианол FF и 0.025%-ный бромфеноловый синий. После проведения электрофореза гель помещали на пластину для ТСХ (DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, Германия) и визуализировали олигонуклеотиды в УФ-свете.

2.3. Методики эксперимента

2.3.1. Твердофазный фосфитамидный синтез 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров

2.3.1.1. Приготовление растворов мономеров

Качество коммерческих препаратов фосфитамидов, используемых в работе, проверяли методом ТСХ в системе этанол:хлористый метилен (5:95). Результаты ТСХ визуализировали в УФ-свете "Хроматоскоп-М" (ФИМЕТ, Россия) и проявляли реактивом Дише (0.5%-ный раствор солянокислого цистеина в 3 н H₂SO₄) при нагревании до 150°C. Результаты ТСХ коммерческих препаратов фосфитамидов защищенных нуклеозидов дополнительно проявляли 0.1%-ным раствором нингидрина в спирте при нагревании до 150°C. Фосфитамиды защищенных рибонуклеозидов перед работой сушили над P₂O₅ при 2-4 мм рт. ст. в течение 1 ч.

2.3.1.2. Синтез 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров и их аналогов

Синтез вели на синтезаторе ASM-800 ("Биоссет", Россия) в масштабе 0.4 мкмоль (объем реактора 50 мкл) твердофазным фосфитамидным методом согласно протоколу, приведенному в таблице 2.2.

Таблица 2.2. Протокол операций автоматического фосфитамидного синтеза олигорибонуклеотидов

№ п/п	Операция	Реагент	Кол-во мкл /эквивалентов	Время, сек
1.	Промывка	CH ₃ CN	280	11.6
2.	Промывка	CH ₂ Cl ₂	270	9.0
3.	Детритилирование	3% DCA в CH ₂ Cl ₂	560	107.0
4.	Промывка	CH ₃ CN	270	10.8
5.	Промывка	CH ₃ CN абс.	250	10.0
6.	Конденсация	0.1 М р-р мономера, 0.25 М р-р этилтиотетразола в CH ₃ CN абс.	74 / 12.5 70 / 31	350.0
7.	Промывка	CH ₃ CN	60	1.2
8.	Кэпирование	СрВ (16% N-MeIm в THF) СрА (Ac ₂ O/2,6-лутидин/THF (1:1:8))	150 / 1268 170 / 525	100.0
9.	Промывка	CH ₃ CN	30	31.8
10.	Окисление	0.02 М I ₂ в THF / Py / H ₂ O (90:1:9)	130 / 13	40.0
11.	Повторить п. 1-10			
12.	Конец синтеза Повторить п. 1-4			

2.3.1.3. Деблокирование олигонуклеотидов

а) Деблокирование олигодезоксирибонуклеотидов

Связанный с носителем олигонуклеотид после синтеза переносили в пробирку на 0.6 мл. К носителю приливали 0.3 мл 40% водного метиламина, выдерживали в течение 15 мин при 65°C и постоянном перемешивании, затем при -20°C в течение 15-20 мин и отделяли от носителя центрифугированием. Носитель промывали 3x150 мкл смеси этанол:ацетонитрил:вода (1:1:1). Растворы объединяли и упаривали до 100 мкл в вакуумном испарителе Speed-Vac Concentrator SVC-100H.

б) Деблокирование 2'-F-пиримидинсодержащих олигорибонуклеотидов

Связанный с носителем олигонуклеотид после синтеза переносили в пробирку на 0.6 мл. К носителю приливали 0.3 мл смеси АМА (NH₄OH:40% водный метиламин 1:1), выдерживали в течение 3 ч при 25°C и постоянном перемешивании, затем при -20°C в течение 15-20 мин и отделяли от носителя центрифугированием. Носитель промывали 3x150 мкл смеси этанол:ацетонитрил:вода (1:1:1). Растворы объединяли и упаривали до сухого остатка в вакуумном испарителе Speed-Vac Concentrator SVC-100H. Для удаления 2'-О-третбутилдиметилсилильных защитных групп к сухому остатку олигонуклеотида добавляли 200 мкл смеси N-метил-2-пирролидинон:триэтиламин:ТЕА·3HF (1.5 : 0.75 : 1, v/v/v) и выдерживали при 65°C в течение 1.5 ч. После охлаждения раствора до комнатной температуры добавляли 300 мкл этокситриметилсилана и перемешивали в течение 10 мин. К полученной смеси добавляли 1 мл серного эфира и центрифугировали, раствор декантировали, осадок промывали серным эфиром, высушивали на воздухе, растворяли в воде.

2.3.2. Выделение ДНК-праймеров

К реакционным смесям после синтеза олигодезоксирибонуклеотидов и деблокирования добавляли равный объем денатурирующего буфера и выделяли при помощи препаративного гель-электрофореза в 15%-ном денатурирующем ПААГ. Участки геля, содержащие целевой олигонуклеотид, вырезали, добавляли 10 мл 0.3 М водн. NaClO₄ и перемешивали при 25°C в течение нескольких часов. Элюат отбирали, гель промывали 1 мл того же раствора. По окончании элюции проводили обессоливание объединенных элюатов с помощью картриджа Waters SepPac C18 (Waters, США). Для этого раствор олигонуклеотида наносили на картридж, промывали 4 мл водного 0.05 М NaClO₄ и элюировали 1 мл 0.05 М NaClO₄ в 50%-ном ацетонитриле. Полученные растворы упаривали до объема 0.1 мл. Олигонуклеотидный материал осаждали

добавлением 10-ти кратного избытка 2%-ного NaClO_4 в ацетоне с последующим выдерживанием при -20°C в течение 2 ч. Осадок отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 4°C и 13200 об./мин. Супернатант отбирали, осадок олигонуклеотида промывали ацетоном, высушивали при 37°C .

Гомогенность выделенных олигонуклеотидов анализировали гель-электрофорезом в 15%-ном денатурирующем ПААГ с последующим окрашиванием геля раствором красителя "Stains-All".

2.3.3. Выделение оцДНК-матриц для синтеза индивидуальных аптамеров. Выделение 2'-F-РНК-аптамеров

К реакционным смесям после синтеза и деблокирования добавляли эквивалентный объем денатурирующего буфера и выделяли при помощи препаративного гель-электрофореза в 12%-ном денатурирующем ПААГ. Участок геля, содержащий целевой олигонуклеотид, вырезали, заливали 1 мл буферного раствора для элюции, содержащего 0.3 М $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ (рН 7.8 для ДНК, рН 5.2 для РНК), 2 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, 0.1% (по объему) SDS, перемешивали при 25°C в течение 16 ч. Элюат отбирали, гель промывали 1 мл того же раствора. Олигонуклеотидный материал осаждали добавлением 2.5-кратного избытка (по объему) этанола и выдерживали при -20°C в течение 2 ч. Осадок отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 4°C и 13200 об./мин. Супернатант отбирали, осадок промывали 75%-ным этанолом и сушили в эксикаторе над CaCl_2 (2-4 мм. рт. ст.) 20 мин.

Гомогенность образцов ДНК/РНК анализировали гель-электрофорезом в 12%-ном денатурирующем ПААГ с последующим окрашиванием геля раствором красителя "Stains-All".

2.3.4. Синтез дцДНК-матриц методом ПЦР высокой точности

Аmplификацию оцДНК-матриц проводили методом ПЦР высокой точности [129]. В качестве праймеров для ПЦР использовали 3'-праймер **pr3** (16 нт), комплементарный 5'-концу оцДНК-матрицы, и 5'-праймер **pr5** (37 нт), комплементарный 3'-концу оцДНК-матрицы, содержащий промоторную последовательность для T7 РНК-полимеразы.

Реакционная смесь (1000 мкл) содержала 30 пмоль оцДНК-матрицы, 2 мкМ 3'-праймер **pr3**, 2 мкМ 5'-праймер **pr5**, 1 мМ dATP, 1 мМ dGTP, 1 мМ dCTP, 1 мМ TTP, 25 е.а./мл Taq ДНК-полимеразы, 7.5 мМ MgCl_2 , 10 мМ Трис-НСl (рН 8.3), 50 мМ KCl. Реакционную смесь переносили в 10 ПЦР-пробирок на 0.5 мл по 100 мкл реакционной смеси в каждую и помещали в амплификатор.

Амплификацию проводили в следующих условиях: 93°C 3 мин, 93°C 30 сек, 63°C 1 мин, 72°C 1 мин, затем повтор еще 20 циклов, охлаждение до 4°C. Продукты амплификации анализировали гель-электрофорезом в 12%-ном денатурирующем ПААГ в денатурирующих условиях.

ПЦР-продукт очищали с помощью набора MinElute PCR Purification KIT (Sigma-Aldrich, США) согласно протоколу производителя. Полученную дцДНК использовали в реакции транскрипции *in vitro*.

2.3.5. Транскрипция *in vitro* и выделение 2'-F-пиримидинсодержащего РНК-транскрипта

Реакцию проводили в 500 мкл раствора, содержащего 40 mM Трис-НСl (рН 7.9), 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 10 mM NaCl, 2mM спермидин, 1 mM АТР, 1 mM GTP, 3 mM 2'-F-УТР, 3 mM 2'-F- СТР, 3500 е.а./мл Т7 РНК-полимеразы, 200 пмоль дцДНК-матрицы, 2 е.а./мл неорганической пирофосфатазы. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 15-16 ч в суховоздушном термостате. По окончании инкубации в реакционную смесь добавляли 0.4 е.а./мкл ДНКазы I и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. В реакционную смесь добавляли 100 mM Na₂ЭДТА (рН 8.0) до концентрации 10 мкМ и инкубировали при 65°C в течение 10 мин. Реакционную смесь дважды экстрагировали 1 мл хлороформа. К водной фазе добавляли 10% (по объему) 3M CH₃CO₂Na (рН 5.2). РНК-транскрипт осаждали добавлением 2.5-кратного избытка (по объему) этанола с последующим выдерживанием при -20°C в течение 2 ч. Осадок 2'-F-РНК отделяли центрифугированием при 13000 об./мин, 10 мин., 4°C, промывали 75%-ным этанолом и сушили в эксикаторе над СаСl₂ (2-4 мм. рт. ст.) в течение 20 мин. Полученный осадок РНК-транскрипта растворяли в денатурирующем буфере для нанесения и проводили гель-электрофорез в 12%-ном денатурирующем ПААГ. Олигонуклеотид визуализировали в УФ-свете. Фрагмент геля, содержащий 2'-F-модифицированный РНК-аптамер, вырезали, заливали 1 мл 0.3 М CH₃CO₂Na (рН 5.2), 0.1% SDS, перемешивали при комнатной температуре в течение нескольких часов, элюат отбирали, гель промывали 1 мл 0.3 М CH₃CO₂Na (рН 5.2). Олигонуклеотидный материал осаждали 2.5-кратным по объему избытком этанола, как описано выше. Полученный 2'-F-модифицированный РНК-аптамер растворяли в воде и хранили при -20°C.

Гомогенность выделенного РНК-транскрипта анализировали гель-электрофорезом в 12%-ном ПААГ (в денатурирующих условиях) с последующим окрашиванием геля раствором красителя «Stains-All».

2.3.6. Введение радиоактивной метки по 5'-концу 2'-модифицированного РНК-аптамера

2.3.6.1. Дефосфорилирование

В случае ферментативно полученных 2'-F-РНК-аптамеров и 2'-F-РНК-библиотек предварительно проводили удаление 5'-фосфатной группы. Реакцию дефосфорилирования 2'-F-модифицированного РНК-аптамера проводили в 50 мкл буферного раствора, содержащего 10 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 5 мМ MgCl₂, 0,1 М KCl, 0.02%-ный Тритон X-100, 0,1 мг/мл BSA, 40 пмоль 2'-F-модифицированного РНК-аптамера. Пробу инкубировали при 90°C в течение 2 мин, а затем охлаждали до комнатной температуры. В реакционную смесь добавляли 120 е.а./мл бактериальной щелочной фосфатазы, инкубировали 20 мин при 37°C и 10 мин при 75°C, охлаждали до комнатной температуры и использовали непосредственно в реакции кинирования.

2.3.6.2. Кинирование

Введение радиоактивной метки по 5'-концу 2'-F-модифицированного РНК-аптамера проводили в 70 мкл буферного раствора, содержащего 50 мМ Трис-НСl (рН 7.6), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ DTT, 0.1 мМ Na₂ЭДТА, 0.1 мМ спермидин, 4 МБк γ -[³²P]-АТР, 10%-ный (по объему) диметилсульфоксид, 30 е.а. полинуклеотидкиназы фага Т4, в течение 2 ч при 37°C. Затем к реакционной смеси добавляли 10 е.а. полинуклеотидкиназы фага Т4, 2 МБк γ -[³²P]-АТР и инкубировали еще 30 мин при 37°C. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и очищали на колонках Micro BioSpin P30 (Bio-Rad, США) согласно протоколу производителя. Полученный продукт анализировали гелем-электрофорезом в 12%-ном ПААГ в денатурирующих условиях с последующей радиоавтографией.

2.3.7. Введение радиоактивной метки по 3'-концу 2'-модифицированного РНК-аптамера

Введение радиоактивной метки по 3'-концу 2'-F-модифицированного РНК-аптамера проводили в 20 мкл раствора, содержащего 10 мМ АТР, 40 пмоль 2'-F-модифицированного РНК-аптамера, 5 МБк 5'-[³²P] рСр, 1000 е.а./мл Т4 РНК-лигазы. Перед началом реакции раствор 2'-F-модифицированного РНК-аптамера инкубировали в течение 2 мин при 90°C, добавляли остальные компоненты реакционной смеси и инкубировали 3 ч при 37°C. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и очищали на колонках Micro BioSpin P30 (Bio-Rad, США) согласно протоколу

производителя. Полученный продукт анализировали гель-электрофорезом в 12%-ном ПААГ в денатурирующих условиях с последующей радиоавтографией.

2.3.8. Определение констант диссоциации комплексов 2'-F-модифицированных РНК с антителами

2.3.8.1. Определение K_D методом связывания на нитроцеллюлозных фильтрах

Для определения констант диссоциации комплексов антител с 2'-F-модифицированными РНК готовили по 7 проб для каждого аптамера (по 80 мкл) в буферном растворе для связывания, содержащем 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 200 мМ КСl. Концентрацию 2'-F-РНК варьировали в диапазоне от 1.33 нМ до 10 мкМ. Концентрация 5'-[³²P]-меченой 2'-F-РНК в пробе была пренебрежительно малой по сравнению с концентрацией немеченой 2'-F-РНК, но достаточной для получения радиоавтографа. Реакционные смеси инкубировали 2 мин при 90°C, затем охлаждали до комнатной температуры. К каждой пробе добавляли 20 мкл раствора поликлональных антител с концентрацией 10 нмоль/л в однократном буфере для связывания (50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 200 мМ КСl). Контрольные пробы содержали только 5'-[³²P]-меченый 2'-F-модифицированный РНК-аптамер. Все реакционные смеси инкубировали при 25°C в течение 16 ч.

Нитроцеллюлозные фильтры для сорбции диаметром 2.5 см вырезали из нитроцеллюлозных фильтров MF-MilliporeTM диаметром 9 см и пористостью 0.45 мкм. Фильтры выдерживали в буферном растворе для связывания в течение 12-14 ч при 4°C.

Для сорбции комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах использовали систему для фильтрования, состоящую из стеклянного микропористого фильтра, переходника и колбы-приемника. Для создания вакуума использовали водоструйный насос. На прединкубированный в буфере для связывания фильтр наносили по 95 мкл пробы и промывали 1 мл буфера для связывания, после чего фильтр высушивали в течение 10 мин на воздухе. Контрольную пробу «100%» наносили на сухой фильтр и высушивали в течение 10 мин на воздухе. Все фильтры помещали в кассету с фоточувствительным экраном на ночь (16 ч). Экран сканировали при помощи фосфоримиджера. Для получения количественных характеристик радиоавтографы нитроцеллюлозных фильтров переводили в цифровую форму в программном пакете Quantity One (Bio-Rad, США). Долю комплексов олигонуклеотидов с белками определяли как отношение интенсивности пятна, соответствующего фильтру с нанесенным комплексом, к интенсивности пятна, соответствующего фильтру с нанесенной контрольной пробой «100%». Полученные

данные описывали приведенным ниже уравнением, используя программу GraphPad Prism 5.0.4.533, и из полученных коэффициентов находили значения K_D и $[T]_{ta}$:

$$F_a = [T]_{ta} \cdot [T] / (K_D + [T]),$$

где $[T]$ - концентрация АТ; F_a – доля связавшихся аптамеров; $[T]_{ta}$ – концентрация АТ, способных связываться с аптамером; K_D – константа диссоциации комплексов 2'-F-РНК с антителами.

2.3.8.2. Определение K_D методом задержки в геле

Для определения констант диссоциации комплексов антител с 2'-F-РНК готовили 7 проб по 40 мкл в буферном растворе для связывания, содержащем 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 200 мМ КСl. Концентрация 3'- $[^{32}P]$ -меченой 2'-F-РНК была пренебрежительно малой по сравнению с концентрацией белка, но достаточной для радиоавтографии. Реакционные смеси инкубировали 2 мин при 90°C, затем охлаждали до комнатной температуры. К каждой пробе добавляли 50 мкл раствора поликлональных IgG с концентрацией, варьирующейся в диапазоне от 10 до 500 нМ в однократном буфере для связывания. Контрольные пробы содержали только 3'- $[^{32}P]$ -меченый 2'-F-модифицированный РНК-аптамер. Все реакционные смеси инкубировали при 25°C в течение 16 ч. Из реакционных смесей отбирали аликвоты 15 мкл, добавляли 3 мкл нативного буфера для нанесения (по 0.05% ксиленцианолового голубого и бромфенолового синего красителей в 50%-ном водном глицерине) и наносили на 6%-ный нативный ПААГ при напряжении 15 В/см. После окончания электрофореза гель высушивали и помещали в кассету с фоточувствительным экраном. Экран сканировали при помощи фосфоримиджера. Для получения количественных характеристик радиоавтографы переводили в цифровую форму в программном пакете Quantity One (Bio-Rad, США). Данные описывали приведенным ниже уравнением, используя программу GraphPad Prism 5.0.4.533, и из полученных коэффициентов находили константу K_D :

$$F_a = [T]_{ta} \cdot [T] / (K_D + [T]),$$

где $[T]$ - концентрация мишени (белка); F_a – доля связавшихся аптамеров; $[T]_{ta}$ – концентрация белка, способного связываться с аптамером; K_D – константа диссоциации комплексов 2'-F-РНК с антителами.

2.3.9. Получение ОБМ-сефарозы

Препарат основного белка миелина растворяли в 1 мл 0.1 М NaHCO₃ (pH 8.3). Лиофилизированный порошок CNBr-сефарозы (2 г) заливали 10 мл 1 мМ HCl, перемешивали 2 минуты. Сорбент переносили на пористый фильтр, подключенный к водоструйному насосу, и промывали 400 мл 1 мМ HCl, а затем 30 мл 0.5 М NaCl в 0.1 М NaHCO₃ (pH 8.3). К суспензии сорбента добавляли раствор ОБМ, перемешивали 2 часа при 25°C и инкубировали 16 часов при 4°C. Для блокирования непрореагировавших с белком групп сефарозы добавляли 1 мл 1 М Трис-HCl (pH 8.3). Сорбент переносили в колонку, промывали 20 мл 0.1 М Трис-HCl (pH 8.0), 0.5 М NaCl, а затем 20 мл 0.1 М NaOAc (pH 4.0) для удаления несвязавшегося белка. Колонку уравнивали 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 100 мМ NaCl.

2.3.10. Выделение антител

2.3.10.1. Выделение антител для проведения исследований связывания с аптамерами

Выделение суммарных IgG-антител [15]

Для выделения суммарных антител класса G из сывороток больных РС или здоровых доноров использовали колонку HI Trap protein G GE 5мл, перистальтический насос. Колонку промывали 25 мл 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 100 мМ NaCl со скоростью 1 мл/мин.

Сыворотку центрифугировали 13500 об/мин 2 мин, отбирали супернатант, разбавляли в 4 раза 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 100 мМ NaCl и наносили на колонку. Сорбент промывали 20 мл 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 100 мМ NaCl, затем 30 мл 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 100 мМ NaCl, 1% Тритон X-100 и снова 15 мл 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 100 мМ NaCl. Элюцию проводили на хроматографе (GE Healthcare, США) 100 мМ Gly-HCl (pH 2.6). Элюат собирали порционно по 1 мл, нейтрализовали 100 мкл 1 М Трис-HCl (pH 8.8).

Элюат, содержащий антитела, объединяли и диализовали против 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 100 мМ NaCl. Антитела фильтровали на пористом фильтре 0.45 мкм. Для определения концентрации антител измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 280 нм с использованием спектрофотометра NanoDrop, для расчета концентрации использовали значение коэффициента экстинкции 210,000 М⁻¹см⁻¹. Полученные антитела использовали для проведения экспериментов, описанных в разделах 3.7, 3.8.

Выделение анти-ОБМ антител

На колонку с ОБМ-сефарозой, подключенную к перистальтическому насосу, наносили 10 мг суммарных IgG антител со скоростью 0.5 мл/мин. Промывали колонку 30 мл 50 mM Трис-НСl (рН 7.5), 100 mM NaCl, элюировали антитела раствором 0.1 M Gly-НСl (рН 2.6) фракциями по 1 мл, каждую фракцию нейтрализовали 100 мкл 1 M Трис-НСl (рН 9.3). Объединенные фракции диализовали против воды в течение 16 ч при 4°C, упаривали с использованием вакуумного концентратора Speed Vac без нагрева до объема около 100 мкл. К полученным растворам антител добавляли 20% (v/v) буферного раствора, содержащего 1 M Трис-НСl (рН 7.5), 2M NaCl, измеряли оптическую плотность при 280 нм на спектрофотометре Nano Drop и рассчитывали концентрацию антител, как описано выше. Полученные аффинно очищенные анти-ОБМ антитела использовали для проведения экспериментов, описанных в разделе 3.9.

2.3.10.2. Выделение антител для проведения серийного биолюминесцентного микропланшетного анализа

Выделение суммарных IgG-антител

Для упрощения пробоподготовки образцов из сывороток крови был разработан оптимизированный протокол выделения антител с использованием спин-колонок. В спин-колонки помещали по 1мл агарозы, модифицированной белком А, и уравнивали 50 mM Трис-НСl (рН 8.0), 100 mM KCl.

Образец сыворотки крови (0.5 мл) разбавляли в 4 раза буфером 50 mM Трис-НСl (рН 8.0), 100 mM KCl и наносили на спин-колонку с белком А. Сорбент промывали 4 мл 50 mM Трис-НСl (рН 8.0), 100 mM KCl, центрифугируя колонку 1.5 мин 650g. Неспецифические белки элюировали 4 мл 50 mM Трис-НСl (рН 8.0), 100 mM KCl, 1% Тритон X-100 и 4 мл 50 mM Трис-НСl (рН 6.5), 100 mM NaCl (650 g, 1 мин). Антитела элюировали 0.1 M Gly-НСl (рН 2.6), центрифугируя при тех же параметрах, и нейтрализовали 90 mM Трис-НСl (рН 8.8), содержащим 145 mM NaCl. Концентрацию выделенных антител измеряли с использованием спектрофотометра Nano Drop, как описано выше. Полученные антитела использовали для проведения экспериментов, описанных в разделах 3.10, 3.12.

Выделение анти-ОБМ антител

В спин-колонку помещали ОБМ-сефарозу, полученную по описанной выше методике (п. 2.3.9), и уравнивали буфером 50 mM Трис-НСl (рН 7.5), 0.1 M NaCl. Раствор суммарных антител наносили на спин-колонку, промывали 3 мл 50 mM Трис -НСl

(pH 7.5), 0.1 M NaCl (650 g, 1 мин), затем 50 mM Трис-НСl (pH 6.5), 100 mM NaCl (650 g, 1 мин). Целевые анти-ОБМ антитела элюировали 0.1 M Gly-НСl (pH 2.6) (650 g, 1 мин), нейтрализовали 90 mM Трис-НСl (pH 8.8), содержащим 145 mM NaCl. Концентрацию выделенных антител измеряли с использованием спектрофотометра Nano Drop, как описано выше. Полученные антитела использовали для проведения экспериментов, описанных в разделах 3.10, 3.11.

2.3.11. *In vitro* селекция 2'-F-РНК-аптамеров

Поликлональные аутоантитела класса G (2.6 мг/мл, 0.7 мкл) в 50 mM Трис-НСl (pH 7.5), разбавляли 0.05 M NaHCO₃/Na₂CO₃ (pH 9.6) до концентрации 10 мкг/мл. 100 мкл полученного раствора помещали в ПЦР-пробирку и инкубировали при 4°C в течение 16-20 ч. Раствор несвязавшихся со стенками пробирки антител удаляли. Иммуобилизованные на стенках ПЦР-пробирки антитела промывали 4x100 мкл промывочного буфера (50 mM Трис-НСl (pH 7.5), 200 mM KCl, 0.05%-ный (по объему) Твин 20). Далее в ПЦР-пробирку с иммуобилизованными антителами добавляли 500 мкл блокирующего буфера (50 mM Трис-НСl (pH 7.5), 200 mM KCl, 0.1%-ный казеин) и инкубировали при комнатной температуре 1 ч, после чего еще раз промывали антитела 500 мкл промывочного буфера.

2'-F-Модифицированную РНК-библиотеку в 100 мкл буфера для связывания (50 mM Трис-НСl (pH 7.5), 200 mM KCl) инкубировали при 90°C в течение 3 мин. Охлаждали до комнатной температуры, помещали в ПЦР-пробирку с иммуобилизованными антителами и инкубировали при комнатной температуре 1 ч. Несвязавшиеся с аутоантителами олигонуклеотиды удаляли. Комплексы иммуобилизованных аутоантител с 2'-F-модифицированными РНК промывали 500 мкл промывочного буфера (50 mM Трис-НСl (pH 7.5), 200 mM KCl, 0.05% Твин 20).

В ПЦР-пробирку с иммуобилизованными комплексами аутоантител и 2'-F-РНК добавляли буфер (100 мкл), содержащий 50 mM Трис-НСl (pH 8.0), 8 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM dGTP, 0.5 mM dATP, 0.5 mM dCTP, 0.5 mM dTTP, 100 пмоль 3'-праймера **pr3**, инкубировали при 90°C в течение 2 мин и охлаждали до комнатной температуры. К полученной реакционной смеси добавляли обратную транскриптазу AMV до концентрации 400 е.а./мл и инкубировали при 37°C в течение 30 мин, затем при 48°C в течение 30 мин. Полученную кДНК использовали в ПЦР, амплифицированную дцДНК использовали в реакции транскрипции *in vitro*, как описано выше. Полученную обогащенную 2'-F-РНК-библиотеку очищали гель-электрофорезом и использовали в следующем раунде отбора. Обогащенную библиотеку после 12 раундов отбора переводили в дцДНК форму, амплифицировали с использованием баркодированных

праймеров и передавали для установления нуклеотидных последовательностей с использованием платформы высокопроизводительного секвенирования Illumina MiSeq в ЦКП «Геномика» СО РАН.

2.3.12. Синтез конъюгатов 2'-F-РНК-аптамеров с обелином

К 5 пмоль аминомодифицированного 2'-F-РНК-аптамера, содержащего NH₂-группу на 3'-конце, добавляли 50-кратный избыток бифункционального реагента - сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилата (SMCC) (Fluka, Швейцария) - в 0.1 М растворе 2-бис(2-гидроксиэтил)-аминоуксусной кислоты (BICINE) (рН 8.5) и инкубировали 2 часа при 25°C. Избыток реагентов удаляли обессоливанием на колонке DSalt Desalted Column (Pierce, Rockford, IL, США), уравновешенной 20 мМ Трис-НСl (рН 7.0), 5 мМ ЭДТА. Активированное производное аптамера далее инкубировали с 3-кратным молярным избытком обелина (Обе-SH), при 8 °С в течение 16 часов. Полученный конъюгат очищали ионообменной хроматографией на колонке Mono Q (GE Healthcare, Швеция), уравновешенной 20 мМ Трис-НСl (рН 7.0), 5 мМ ЭДТА в градиенте NaCl (0 – 2 М).

2.3.13. Синтез биотинилированных конъюгатов аптамеров

К 20 нмоль аминомодифицированного олигонуклеотида, растворенного в 0.1 М Na₂B₄O₇, добавляли раствор N-гидроксисукцинимидного эфира биотина в диметилформамиде и инкубировали 2.5 часа при комнатной температуре и перемешивании 500 об./мин. Продукт осаждали 2% NaClO₄ в ацетоне. Осадок дважды промывали ацетоном, растворяли в воде и измеряли концентрацию полученного конъюгата. Реакционную смесь очищали от непрореагировавшего эфира биотина на Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters 3K device (Merck, Германия). Гомогенность полученных конъюгатов анализировали электрофоретически.

2.3.14. Тестирование конъюгатов 2'-F-РНК-аптамеров с обелином в качестве репортерных компонентов биолюминесцентного аптасенсора

На поверхности лунок микропланшета сорбировали моноклональные IgG мыши, специфичные к Fc-фрагментам IgG человека, по 100 мкл в концентрации 10 мкг/мл в PBS буфере при 8 °С 16 часов. Лунки промывали трижды PBS с 0.1% Твин 20, 5 мМ ЭДТА и блокировали 1% раствором обезжиренного сухого молока в PBS (100 мкл/лунку, инкубация 1 час, 25°C), затем повторяли промывку. В лунку вносили по 50 мкл раствора аналита – анти-ОБМ антитела или IgG-антитела здоровых доноров с концентрацией 0.39 –

400 нМ в 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 100 мМ NaCl, 0.1% Твин 20, инкубировали 1 час при 25°C при перемешивании. Повторяли промывку. В каждую лунку вносили по 50 мкл конъюгата аптамеров с обелином (**II-9(57)~Obe** или **12-2(26)~Obe**) в концентрации 0.025 нМ в 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 200 мМ KCl, 2 мМ ЭДТА, инкубировали 40 мин при 25°C. Повторяли промывку. Интенсивность биолюминесценции измеряли на люминометре сразу после добавления в лунку 50 мкл 0.1 М CaCl₂ в 0.1 М Трис-НСl (рН 8.8). Сигнал интегрировали в течение 5 сек.

2.3.15. Анализ образцов антител с использованием аптасенсора на основе пары аптамеров

Анализ образцов анти-ОБМ антител или IgG индивидуальных доноров проводили согласно протоколу, приведенному в таблице 2.3.

Таблица 2.3. Протокол анализа образцов в микропланшетах с использованием пары аптамеров

№ п/п	Операция	Реагент	Объем, мкл	Время, температура
1.	Сорбция стрептавидина	Стрептавидин, 10 мкг/мл	50	8°C 16 часов
2.	Промывка (5х)	PBS, 0.1% Твин 20, 5 мМ ЭДТА	100	25°C
3.	Сорбция конъюгата аптамера	75 нМ 12-2(26)~bio в 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 200 мМ KCl	50	1 час, 25°C, 350 rpm
4.	Промывка (5х)	PBS, 0.1% Твин 20, 5 мМ ЭДТА	100	25°C
5.	Добавление анализа	анти-ОБМ или IgG-антитела в 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 100 мМ NaCl, 0.1% Твин 20	50	1 час, 25°C, 350 rpm
6.	Промывка (5х)	PBS, 0.1% Твин 20, 5 мМ ЭДТА	100	25°C
7.	Добавление метки	1 нг/мл II-9(57)~Obe в 20 мМ Трис-НСl (рН 7.0), 5 мМ Na ₂ ЭДТА, 0.1 М NaCl, 0.1% BSA	50	40 мин, 25°C, 350 rpm
8.	Промывка (5х)	PBS, 0.1% Твин 20, 5 мМ ЭДТА	100	25°C

Интенсивность биолюминесценции измеряли на люминометре сразу после добавления в лунку 50 мкл 0.1 М CaCl₂ в 0.1 М Трис-НСl (рН 8.8). Сигнал интегрировали в течение 5 сек.

2.3.16. Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводили в программном пакете Statistica version 12.0 (StatSoft, Россия) и MedCalc для Windows version 18.2.1 (MedCalc Software, Бельгия). Достоверность различий между биолюминесцентными сигналами пациентов с РС и

контрольной группой оценивали двумя методами: t-критерием Стьюдента (Statistica) и ROC-анализом (Receiver Operating Characteristic), определяя площадь под ROC-кривой (AUC) (MedCalc). Для определения оптимального порога отсечения был выбран критерий максимального значения индекса Юдена (индекс Юдена используется для характеристики потенциала теста по подтверждению и опровержению диагнозов, рассчитывается как чувствительность и 100%-специфичность). Исходя из этого значения, были рассчитаны значения чувствительности и специфичности метода.

Глава 3. Создание 2'-F-РНК-аптамеров к анти-ОБМ аутоантителам, характерным для РС, и разработка биосенсоров на их основе (результаты и обсуждение)

Среди широкого разнообразия НК-аптамеров к белкам аптамеры, направленные на антитела, вызывают особый интерес, поскольку они специфично связывают молекулы, сами по себе являющиеся высокоаффинными и специфичными молекулярными узнающими элементами. В настоящее время опубликовано довольно значительное число работ по созданию и применению аптамеров к антителам (см. обзор литературы). При этом важно отметить, что аптамеры могут быть направлены не только на константные, но и на переменные домены антител, что позволяет связывать антитела конкретной специфичности. С этой точки зрения привлекательной является возможность создания аптамеров, узнающих антитела, характерные для АИЗ. Известно, что каждое аутоиммунное заболевание характеризуется уникальным спектром антител, направленных на собственные антигены организма. В то же время для ряда АИЗ весомо ограничен выбор способов клинической лабораторной диагностики, в том числе определения специфических аутоантител. Создание аптамеров, способных узнавать определенные аутоантитела, может открыть путь к разработке новых подходов для диагностики аутоиммунных заболеваний.

Одним из АИЗ, для которых особенно актуальна проблема лабораторной диагностики, является рассеянный склероз. Для этого заболевания характерно наличие в организме аутоантител к основному белку миелина. Впервые анти-ОБМ антитела были обнаружены в 1980 году [130] в спинномозговой жидкости пациентов с РС, причем авторы работы показали корреляцию количества анти-ОБМ аутоантител с диагнозом и стадией заболевания. Позже этот маркер был обнаружен и в периферической кровеносной системе методами иммуноблоттинга [130–133], импедансной спектроскопии [134] и иммуноферментного анализа [135]. Было установлено, что анти-ОБМ аутоантитела из сывороток крови больных РС обладают протеолитической активностью, способствуют развитию демиелинизации и, таким образом, вносят вклад в патогенез заболевания [15,136,137].

В настоящее время анти-ОБМ аутоантитела рассматривают в качестве кандидатных диагностических биомаркеров активности заболевания РС (см., например, обзор [16]), хотя некоторыми исследователями были обнаружены слабые ассоциации между их уровнем и прогрессированием РС (см., например, [132]). Авторы работы [138] проанализировали сыворотку крови 462 пациентов с РС методом иммуноблоттинга и не

обнаружили закономерностей между количеством анти-ОБМ антител и прогрессированием заболевания. С другой стороны, авторы подчеркивают, что наличие более совершенного метода детекции этих антител могло бы способствовать выявлению их роли в развитии заболевания.

Таким образом, разработка новых подходов к детекции анти-ОБМ антител в серологических образцах является актуальной задачей для определения диагностической значимости предложенного маркера. В данной работе предложены создание новых 2'-модифицированных РНК-аптамеров, способных селективно связывать анти-ОБМ антитела, и конструирование биосенсоров на основе данных аптамеров в качестве «узнающих» элементов для детекции анти-ОБМ аутоантител.

3.1. Получение серии 2'-F-РНК-аптамеров

Задачей первого этапа работы было получение серии 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров к анти-ОБМ аутоантителам из крови больных РС. Важно отметить, что описанные в настоящее время в литературе аптамеры к антителам, в том числе и аутоантителам, получены с использованием в качестве мишеней моноклональных антител модельных животных. Недостатком такого подхода является вероятность получения аптамера к эпитопу, характерному для конкретного клона антител. Известно, что поликлональные антитела из крови человека более разнообразны по сравнению с моноклональными аналогами [139] и в сумме несут большее количество потенциальных эпитопов для связывания с аптамерами (аптатапов) [140]. Соответственно, аптамер, отобранный на моноклональные антитела, будет связывать лишь часть пула антител одной и той же специфичности. Для получения «универсальных» аптамеров, способных узнавать антитела различных пациентов, в работе [140] было предложено использовать в качестве мишени для отбора смесь антител от различных пациентов, однако эта идея не была реализована на практике.

В данной работе для получения аптамеров, направленных на характерные для РС анти-ОБМ аутоантитела, в качестве мишени для селекции была использована смесь анти-ОБМ аутоантител, выделенных из крови пациентов с рассеянным склерозом. Для повышения устойчивости РНК-аптамеров к нуклеазам была использована одна из наиболее часто применяемых модификаций - замена пиримидиновых нуклеотидов их 2'-F-модифицированными аналогами уже на стадии получения РНК-библиотеки. Такая модификация позволяет повысить устойчивость олигонуклеотидов к деградации нуклеазами, при этом она совместима со всеми основными ферментативными стадиями протокола SELEX [141]. К моменту начала данной работы в ЛХРНК ИХБФМ СО РАН

А. А. Фокиной и А.С. Поповецкой была получена обогащенная библиотека 2'-F-РНК аптамеров после 10 раундов отбора на смесь анти-ОБМ антител из крови 10 пациентов с РС (схема селекции представлена на рисунке 3.1), библиотека была переведена в дцДНК-форму, проведено клонирование полученного пула дцДНК и определены нуклеотидные последовательности для 43 клонов [142]. Последовательности ДНК полученных клонов приведены в Приложении 1.

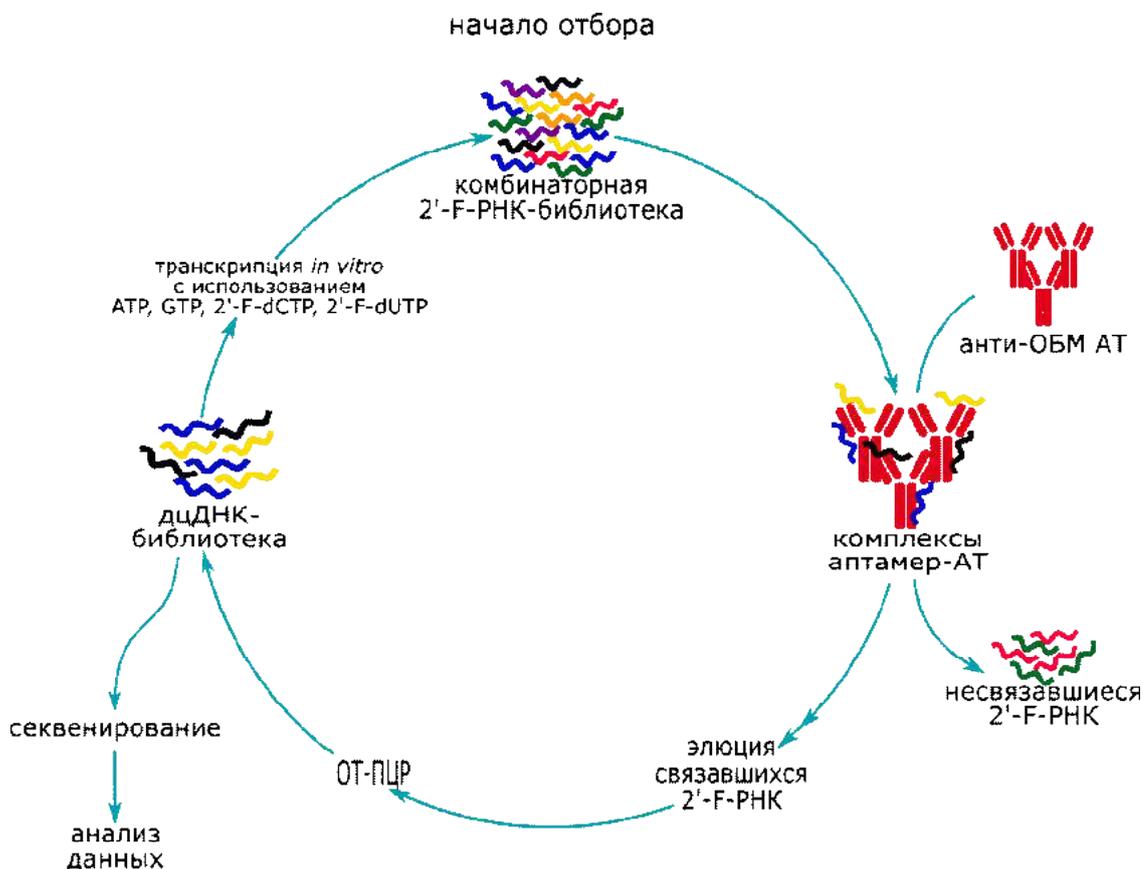


Рисунок 3.1. Схема отбора 2'-F-РНК-аптамеров к анти-ОБМ АТ.

Для дальнейшего исследования аффинности и специфичности на основании анализа первичных последовательностей индивидуальных аптамеров (см. таблицу 3.1) были выбраны две группы 2'-F-РНК-аптамеров, в каждой из которых аптамеры содержали гомологичные участки нуклеотидной последовательности в комбинаторной области. В первую группу вошли аптамеры **I-3** и **II-8**, во вторую – аптамеры **II-3**, **II-5**, **II-9**, **II-11**, **III-6**, **III-7**. Аптамеры отличаются **I-3** и **II-8** друг от друга только наличием одного дополнительного нуклеотида в составе аптамера **II-8** (в таблице 3.1 выделен красным цветом). Аптамеры второй группы отличаются друг от друга несколькими нуклеотидами в составе фрагмента последовательности с 46-го по 54-й нуклеотид (в таблице 3.1 выделены цветом).

Таблица 3.1. Последовательности выбранных 2'-F-РНК аптамеров.

ON	Последовательность 5'→3'
Группа №1	
И-3	<u>GGGAGGACGAUGCGGAGGGCAAUCCUCAGUCUCGCGCU</u> <u>CUCGUUCGGGUGCUGCCCAGACGACUCGCGCGA</u>
И-8	<u>GGGAGGACGAUGCGGAGGGCAAUCCUCAGUCUCGCGCU</u> <u>CCUCGUUCGGGUGCUGCCCAGACGACUCGCGCGA</u>
Группа №2	
И-3	<u>GGGAGGACGAUGCGGUGUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUCGUUUACCU</u> <u>CAGACGACUCGCGCGA</u>
И-5	<u>GGGAGGACGAUGCGGUGUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUUGUUCACCCUG</u> <u>CAGACGACUCGCGCGA</u>
И-9	<u>GGGAGGACGAUGCGGUGUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUUGUUUACCC</u> <u>CAGACGACUCGCGCGA</u>
И-11	<u>GGGAGGACGAUGCGGUGUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUUGUCUACCCCG</u> <u>CAGACGACUCGCGCGA</u>
И-6	<u>GGGAGGACGAUGCGGUGUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUUGUUUACCCCG</u> <u>CAGACGACUCGCGCGA</u>
И-7	<u>GGGAGGACGAUGCGGUGUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUUGUUUACCCA</u> <u>CAGACGACUCGCGCGA</u>

Все С и U - 2'-F-пиримидиновые нуклеотиды. Подчеркиванием выделены константные участки аптамеров. Цветами выделены различия в нуклеотидных последовательностях аптамеров.

Для получения полноразмерных индивидуальных 2'-F-РНК-аптамеров был использован химико-ферментативный способ синтеза, схема которого представлена на рисунке 3.2).

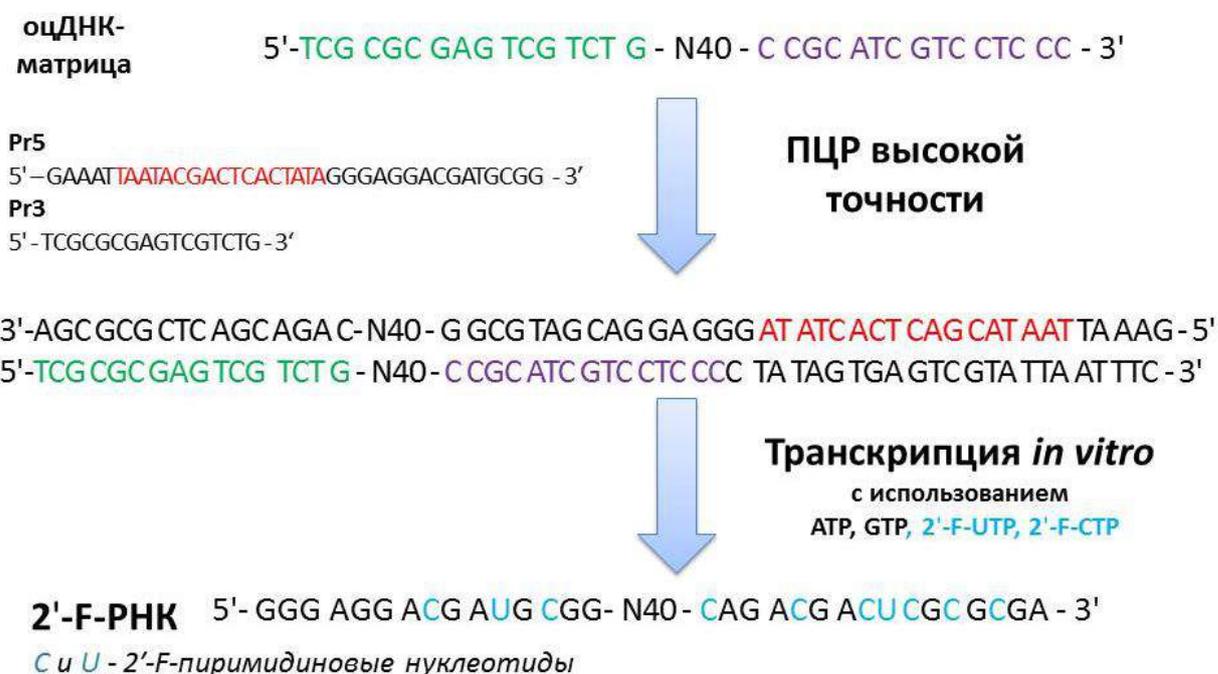


Рисунок 3.2. Получение 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров. <N40> - 40-звенный вариабельный участок последовательности.

При помощи автоматического твердофазного фосфитамидного синтеза были получены оцДНК, соответствующие каждому из аптамеров. Для получения дцДНК-

матриц был использован метод ПЦР высокой точности с использованием оцДНК-матриц и пары праймеров, один из которых содержал последовательность промотора РНК-полимеразы фага Т7 [129]. Далее дцДНК-матрицы использовали в реакции транскрипции *in vitro* в присутствии Т7 РНК-полимеразы, трифосфатов пуриновых рибонуклеозидов и 2'-F-модифицированных пиримидиновых нуклеозидов для получения 2'-F-РНК-аптамеров. Поскольку РНК-полимераза Т7 включает в состав растущей цепи РНК 2'-модифицированные нуклеотидтрифосфаты менее эффективно по сравнению с их природными аналогами, для увеличения эффективности включения 2'-F-модифицированных трифосфатов при транскрипции *in vitro* использовали буферный раствор оптимизированного состава, содержащий 20% (w/v) PEG 8000 и 0.01% (v/v) Тритон Х-100, а также трехкратный избыток 2'-F-модифицированных пиримидиновых трифосфатов по сравнению с немодифицированными пуриновыми трифосфатами [129].

На рисунке 3.3 представлены предположительные вторичные структуры полученных 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров и расчетные значения ΔG_{298} этих структур, полученные на основе алгоритма минимизации свободной энергии с помощью программного пакета mfold version 2.3 [143].

Как показывают результаты моделирования, все полученные 2'-F-модифицированные РНК-аптамеры характеризуются выраженной вторичной структурой, содержащей двуцепочечные фрагменты, внутренние и шпилечные петли. Аптамеры первой группы **I-3** и **II-8**, как и предполагалось, обладали схожими вторичными структурами (на рисунке 3.3 выделены красным пунктиром). Большинство аптамеров второй группы также содержали одинаковые структурные элементы (на рисунке 3.3 выделены синим пунктиром). Также интересно отметить, что по данным компьютерного моделирования наиболее вероятная структура аптамера **III-6** ($\Delta G_{298} = -20.73$ ккал/моль) отличается от структуры, характерной для других аптамеров этой группы. При этом близкая по энергии альтернативная структура ($\Delta G_{298} = -20.23$ ккал/моль) содержит характерный для остальной группы структурный мотив.

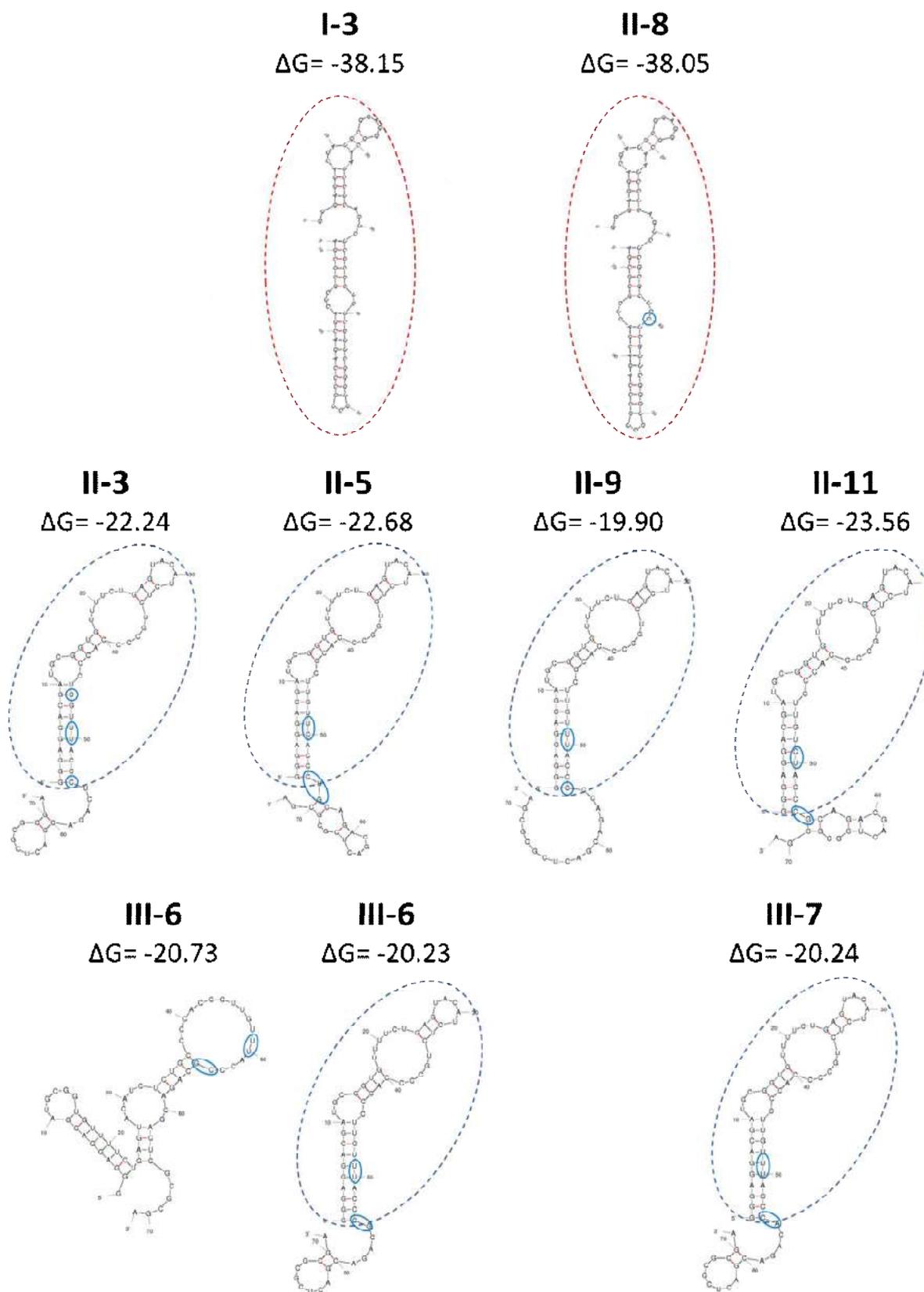


Рисунок 3.3. Расчетные вторичные структуры 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров и значения ΔG_{298} при 25°C по версии программного пакета mfold version 2.3. Значения ΔG_{298} приведены в ккал/моль. Пунктиром выделены общие структурные мотивы аптамеров. Кругами отмечены различия в нуклеотидных последовательностях гомологичных участков.

3.2. Связывание 2'-F-РНК-аптамеров с анти-ОБМ антителами из крови больных РС

Чтобы оценить сродство 2'-F-РНК-аптамеров к патогенным антителам-мишеням, было проведено определение кажущихся равновесных констант диссоциации комплексов аптамер-АТ в условиях постоянной концентрации АТ (10 нМ) и повышающейся концентрации РНК с использованием метода удерживания НК-белковых комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах (см. 2.3.8.1) [144]. С помощью программного пакета Quantity One 4.5.1 из радиоавтографических данных были определены доли связавшихся аптамеров (f_a) при различных исходных концентрациях немеченой РНК. Для определения f_a при каждой концентрации белка вычисляли отношение значения суммарной интенсивности фильтра с нанесенной пробой комплекса к суммарной интенсивности фильтра с контрольной пробой и умножали на общую концентрацию РНК в пробе. Для анализа полученных данных в программном пакете GraphPad Prism 5.0.4.533 были построены кривые зависимости рассчитанных значений f_a от различных исходных концентраций немеченой РНК.

Используя рассчитанные значения f_a и полученные кривые связывания, находили константу K_D по приведенному ниже уравнению:

$$f_a = [T]_{ta} \cdot [T] / (K_D + [T]) \quad [145],$$

где $[T]$ – концентрация антител; f_a – доля связавшихся аптамеров; $[T]_{ta}$ – концентрация белка, способного связываться с аптамером; K_D – константа диссоциации комплексов 2'-F-РНК с антителами.

Значения констант диссоциации комплексов с аутоантителами для индивидуальных аптамеров, а также для обогащенной 2'-F-РНК библиотеки после 10-го раунда отбора представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2. Константы диссоциации комплексов 2'-F-РНК-аптамеров со смесью анти-ОБМ АТ из крови больных РС.

2'-F-РНК		K_D (нМ)	ΔG_{298} (ккал/моль)
Обогащенная библиотека после 10-го раунда		220 ± 190	
Группа 1	I-3	6550 ± 4100	-38.15
	II-8	6300 ± 700	-38.05
Группа 2	II-3	820 ± 50	-22.24
	II-5	460 ± 60	-22.68
	II-9	300 ± 50	-19.19
	II-11	910 ± 290	-23.56
	III-6	5820 ± 320	-20.73
	III-7	1600 ± 430	-20.24

Условия определения K_D приведены в «Экспериментальной части». Значения ΔG_{298} получены по данным программного пакета mfold version 2.3.

Как видно из полученных данных, сродство полученных 2'-F-РНК-аптамеров к антителам-мишеням изменяется в пределах порядка величины, причем для большинства из них значение K_D значительно выше, чем для обогащенной библиотеки, т.е. они образуют с антителами значительно менее прочные комплексы. Интересно отметить, что аптамеры первой группы **I-3** и **II-8**, обладающие одинаковой вторичной структурой, имеют близкие и самые большие по модулю значения ΔG_{298} и при этом проявляют самую низкую аффинность по отношению к антителам-мишеням. Возможно, эти аптамеры представлены в финальной библиотеке за счет их более выгодной амплификации ПЦР, в ходе селекции. Несмотря на высокую степень гомологии, при отличии олигонуклеотидных последовательностей 2'-F-РНК-аптамеров второй группы на несколько нуклеотидов, их аффинность варьирует в широком диапазоне. Можно предположить, что эти нуклеотиды располагаются в ключевых для связывания с мишенями позициях.

Максимальным сродством к патогенным антителам, сравнимым со сродством обогащенной библиотеки, обладал аптамер **II-9**. Интересно отметить, что по данным mfold вторичная структура этого аптамера характеризуется наименьшим абсолютным значением ΔG_{298} . Можно предположить, что за счет этого аптамер **II-9** обладает более гибкой структурой, и возможность "подстройки" пространственной структуры при связывании с мишенью является причиной более аффинного связывания. На основании полученных данных для дальнейших исследований был выбран именно этот аптамер.

3.3. Исследование селективности связывания аптамера П-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. Поэтому необходимо было оценить способность 2'-F-РНК-аптамера П-9, отобранного в ходе селекции *in vitro* по сродству к патогенным аутоантителам, связываться с IgG-антителами из крови здоровых доноров. В ходе предыдущих экспериментов по связыванию были выявлены такие недостатки метода удерживания на нитроцеллюлозных фильтрах, как необходимость использования внешнего контроля, низкая производительность и довольно большой разброс результатов, поэтому в дальнейшем мы исследовали связывание аптамеров с антителами методом нативного гель-электрофореза. В данном случае связывание проводили в условиях постоянной низкой концентрации радиоактивно меченого РНК-аптамера и повышающейся концентрации белка. За образованием комплексов аптамер-антитело следили методом электрофореза в нативном полиакриламидном геле (см. 2.3.8.2). На радиоавтографах, полученных после разделения реакционных смесей, и в случае аптамера П-9 (рисунок 3.4А), и в случае обогащенной 2'-F-РНК-библиотеки после десяти раундов селекции (рисунок 3.4Б) комплексы аптамер-антитело визуализируются в виде полосы с крайне низкой электрофоретической подвижностью.

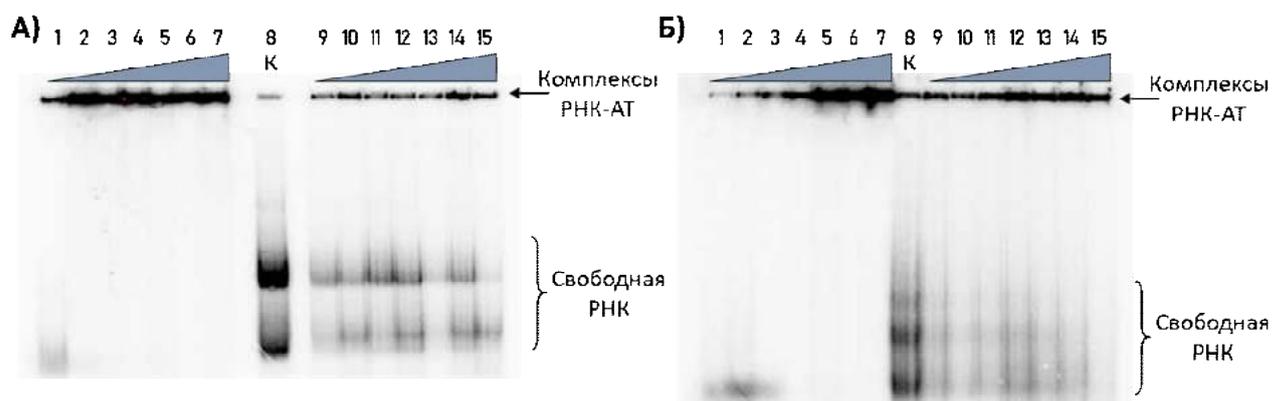


Рисунок 3.4. Образование комплексов антител с 3'-[³²P]-мечеными 2'-F-РНК-аптамером П-9 (А) и обогащенной 2'-F-РНК-библиотекой (Б) (радиоавтограф 6%-ного нативного ПААГ). Дорожки 1-7 – инкубация со смесью анти-ОБМ АТ из крови больных РС в диапазоне концентраций 1 – 500 нМ, дорожки 9-15 – инкубация с суммарными IgG здоровых доноров в диапазоне концентраций 1 – 500 нМ, дорожка К – 2'-F-РНК после инкубации в условиях реакции в отсутствие антител. Условия см. «Экспериментальную часть».

Константы диссоциации 2'-F-РНК обогащенной библиотеки и 2'-F-РНК аптамера **II-9** со смесью патогенных АТ и суммарными IgG из крови здоровых доноров, рассчитанные из полученных данных, приведены в таблице 3.3.

Таблица 3.3. Константы диссоциации комплексов 2'-F-РНК-аптамера **II-9** и обогащенной 2'-F-РНК-библиотеки со смесью патогенных АТ и АТ здоровых доноров.

Мишень \ K_D , нМ	Смесь анти-ОБМ АТ	IgG здоровых доноров
2'-F-РНК аптамер II-9	15±3 нМ	425±300 нМ
Обогащенная 2'-F-РНК библиотека	40±14 нМ	425±92 нМ

Условия определения приведены в «Экспериментальной части».

Как видно из приведенных значений K_D , аптамер **II-9** демонстрирует более высокое сродство к смеси патогенных аутоантител по сравнению с обогащенной библиотекой (снижение K_D в 2.6 раза). При этом в обоих случаях соответствующие значения равновесных констант диссоциации различаются примерно в 10 раз, что свидетельствует о выраженной селективности связывания с патогенными аутоантителами как обогащенной библиотеки 2'-F-РНК, так и аптамера **II-9**.

3.4. Минимизация олигонуклеотидной последовательности аптамера **II-9**

Высокое сродство к антителам-мишеням и высокая селективность связывания определили выбор 2'-F-РНК-аптамера **II-9** в качестве наиболее перспективного кандидата для дальнейших исследований. Как правило, после выбора аптамера с оптимальными характеристиками следующей стадией является минимизация его нуклеотидной последовательности. Удаление нуклеотидов, не участвующих в связывании молекулы-мишени, позволяет снизить вероятность неспецифического связывания аптамера, а в ряде случаев дает возможность повысить его аффинность к мишени [146,147], снижает вероятность образования альтернативных вторичных структур, непродуктивных для связывания, а также делает химический синтез аптамера более быстрым и экономичным. В настоящее время не существует универсальных алгоритмов для минимизации нуклеотидной последовательности аптамеров после селекции. Так, например, удаление константных праймер-связывающих участков в одних случаях не сказывается на сродстве аптамера к мишени, а в других – существенно его снижает (см., например, обзор [148]), в зависимости от того, участвуют ли эти фрагменты в образовании необходимой для связывания пространственной структуры. Поэтому в каждом конкретном случае на основании анализа вторичной структуры аптамера исследователи создают и тестируют

серию его вариантов, из которых полностью или частично удалены нуклеотиды, предположительно не участвующие в связывании с мишенью [141]. Чтобы оценить, какие из участков аптамера **П-9** наименее важны для взаимодействия с аутоантителами-мишенями, мы также основывались на анализе его предполагаемой вторичной структуры.

В составе предполагаемой вторичной структуры аптамера **П-9** 3'-концевой константный участок представлен одноцепочечным фрагментом. Поскольку основной вклад во взаимодействие аптамера с мишенью вносят фрагменты с выраженной вторичной структурой (см., например, [148]), мы предположили, что удаление одноцепочечного участка не должно существенно влиять на сродство аптамера к аутоантителам-мишеням. Чтобы выявить оптимальный вариант конструкции, были предложены три варианта аптамера с последовательным укорочением одноцепочечного 3'-концевого фрагмента: **П-9(66)**, **П-9(61)** и **П-9(57)** длиной 66, 61 и 57 нуклеотидов, соответственно (схема укорочения представлена на рисунке 3.5). Важно отметить, что даже вариант с минимальной длиной содержал на 3'-конце трехнуклеотидный одноцепочечный фрагмент. Мы предположили, что при дальнейшем использовании аптамера в составе аптасенсорных конструкций одноцепочечный 3'-концевой фрагмент будет играть роль спейсера, позволяющего пространственно "изолировать" мишень-связывающий фрагмент аптамера при введении дополнительных концевых модификаций (присоединение репортерных групп, иммобилизация в лунках планшета и др.).

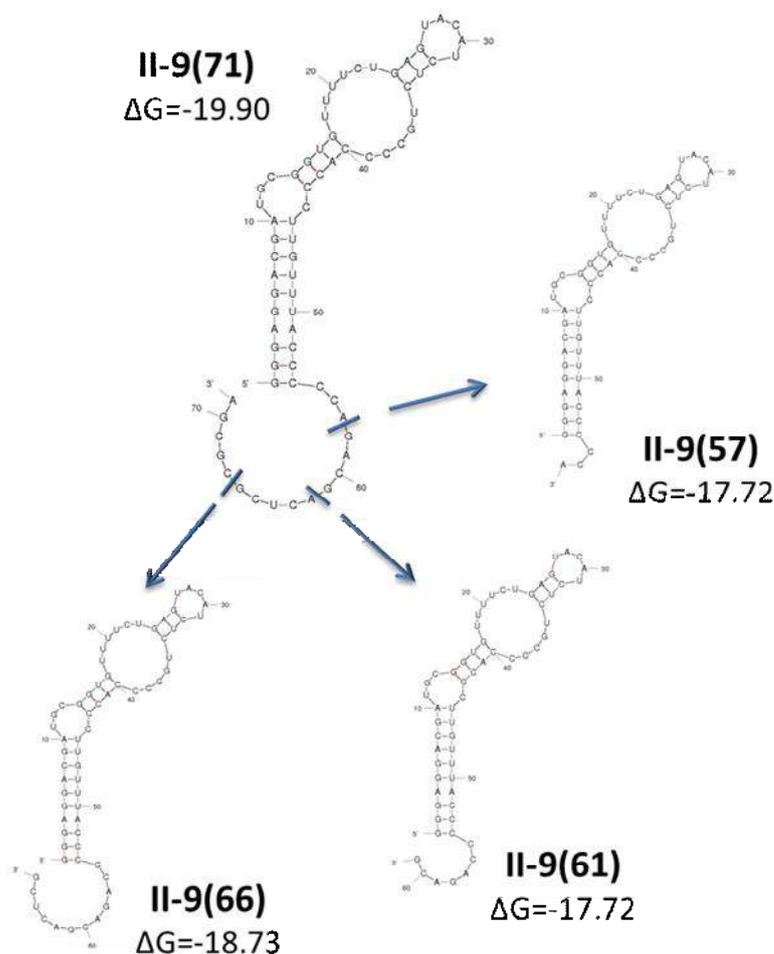


Рисунок 3.5. Расчетные вторичные структуры и значения ΔG_{298} 2'-F-РНК-аптамера **II-9** и его минимизированных аналогов при 25°C по версии mfold version 2.3. Значения ΔG_{298} приведены в ккал/моль.

Серия 2'-F-РНК-аптамеров с укороченным 3'-концевым фрагментом, а также 71-звенный полноразмерный аптамер **II-9(71)** в качестве контроля были синтезированы автоматическим твердофазным фосфитамидным методом, их нуклеотидные последовательности приведены в таблице 3.4.

Таблица 3.4. Последовательности 2'-F-РНК-аптамера **II-9** и его минимизированных аналогов.

ON	Последовательность 5'→3'
II-9(71)	GGGAGGACGAUGCGGUGUUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCA CCCUUGUUUACCCCCAGACGACUCGCGCGA
II-9(66)	GGGAGGACGAUGCGGUGUUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCA CCCUUGUUUACCCCCAGACGACUCG
II-9(61)	GGGAGGACGAUGCGGUGUUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCA CCCUUGUUUACCCCCAGACG
II-9(57)	GGGAGGACGAUGCGGUGUUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCA CCCUUGUUUACCCCCA

Все С и U- 2'-F-пиримидиновые нуклеотиды.

Было исследовано сродство аутоантител-мишеней и селективность связывания 2'-F-РНК-аптамера **II-9** и серии его укороченных вариантов. Связывание аптамеров со смесью анти-ОБМ антител из крови больных РС и суммарными IgG здоровых доноров проводили в условиях недостатка РНК и повышающейся концентрации антител, с использованием радиоактивно меченого РНК-аптамера. За образованием комплексов следили методом гель-электрофореза в нативных условиях, так же как описано в разделе **3.3**. На радиоавтографах гелей после электрофоретического разделения в случае анти-ОБМ антител наблюдаются преимущественно малоподвижные комплексы аптамер-антитело (см., например, рисунок 3.6, дорожки 1-5 для аптамера **II-9(57)**). Необходимо отметить очень низкую степень связывания аптамера **II-9(57)** с антителами здоровых доноров (рисунок 3.6, дорожки 7 – 15). Преимущественное связывание с анти-ОБМ аутоантителами из крови больных РС, и крайне низкая степень образования комплексов с антителами здоровых доноров наблюдались также в случае аптамеров **II-9(66)** и **II-9(61)**.

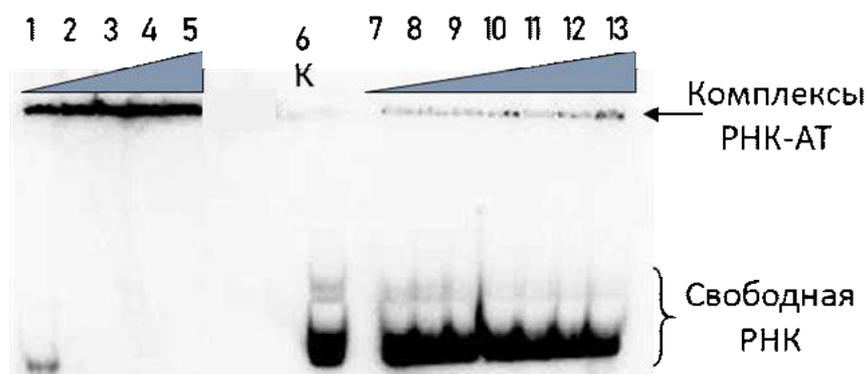


Рисунок 3.6. Образование комплексов антител с радиоактивно меченым аптамером **II-9(57)** (радиоавтограф 6%-ного нативного ПААГ).

Дорожки 1-5 – инкубация с патогенными аутоантителами из крови больных РС в концентрации 1 – 100 нМ, дорожки 7-13 – инкубация с суммарными IgG здоровых доноров в диапазоне концентраций 1 – 500 нМ, дорожка К – 2'-F-РНК после инкубации в отсутствие антител.

Условия см. «Экспериментальную часть».

Определение равновесных констант диссоциации комплексов антител с аптамерами **II-9(66)**, **II-9(61)**, **II-9(57)** проводили так же, как описано в разделе **3.3**: во всех случаях концентрационная зависимость носила гиперболический характер (см., например, рисунок 3.7).

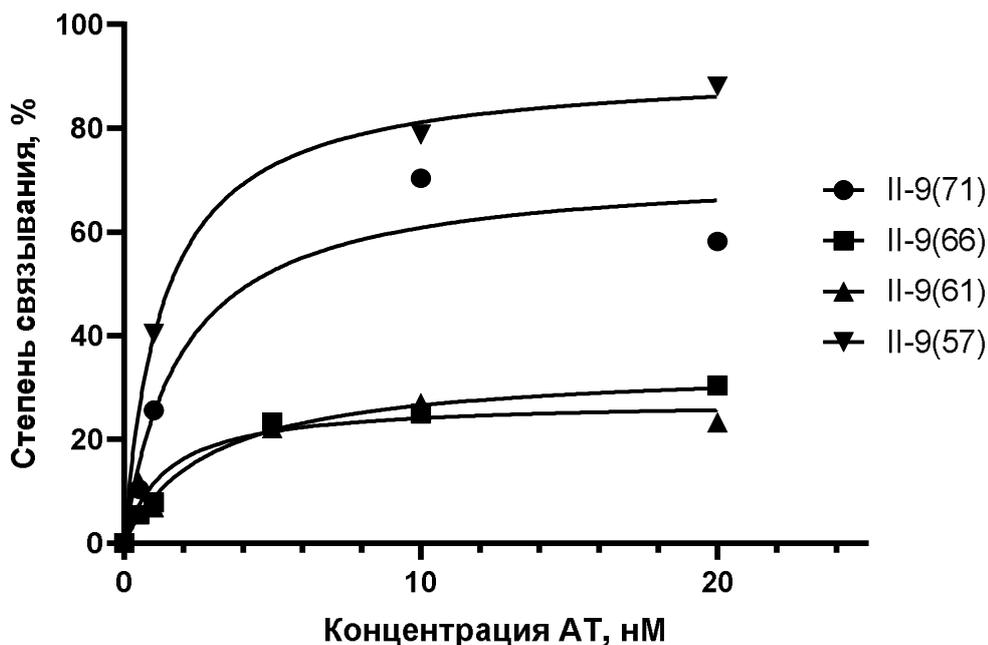


Рисунок 3.7. Кривые связывания 2'-F-РНК-аптамера **II-9** и его минимизированных аналогов со смесью анти-ОБМ АТ из крови больных РС. Условия образования комплексов приведены в «Экспериментальной части».

Сравнивая значения констант диссоциации (таблица 3.5), можно заключить, что, при укорочении аптамера **II-9** на 5-14 звеньев с 3'-конца стабильность комплексов с мишенью возрастает: константы диссоциации комплексов «укороченных» аптамеров со смесью анти-ОБМ аутоантител оказались примерно на порядок ниже по сравнению с комплексами полноразмерного аптамера **II-9**.

Таблица 3.5. Константы диссоциации комплексов 2'-F-РНК-аптамера **II-9** и его «укороченных» аналогов с патогенными АТ и АТ здоровых доноров. Условия определения приведены в «Экспериментальной части».

2'-F-РНК- аптамер	II-9(71)	II-9(66)	II-9(61)	II-9(57)
Мишень				
Смесь анти-ОБМ АТ	15±4 нМ	3.0±0.5 нМ	1.4±0.7 нМ	1.2±0.1 нМ
Суммарные IgG здоровых доноров	425 нМ	н.о. ¹⁾	н.о. ¹⁾	2300±460 нМ

¹⁾ Значение K_D не определено в связи с низкой степенью образования комплексов аптамер-антитело.

Таким образом, удаление константного 3'-концевого участка не только не снижает сродства аптамера к патогенным аутоантителам, но и даже значительно его увеличивает. При этом константа диссоциации комплексов «укороченного» аптамера **II-9(57)** с антителами здоровых доноров на 3 порядка выше константы образования комплексов с

анти-ОБМ аутоантителами, что говорит о значительном увеличении селективности связывания по сравнению с полноразмерным аптамером. Поскольку удаление константного 3'-концевого участка снижает также и сродство аптамера к антителам здоровых доноров, можно предположить, что именно этот фрагмент, не участвующий в образовании вторичной структуры аптамера, доступен для неспецифического взаимодействия с антителами, которое реализуется, возможно, за счет электростатических взаимодействий.

3.5. 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. При аффинном выделении суммарных антител и фракции анти-ОБМ антител из сывороток крови пациентов с РС мы провели оценку содержания анти-ОБМ антител в сыворотке крови пациентов с РС. Это значение варьирует в диапазоне 0.2 – 3 % от общего количества антител, в зависимости от конкретного образца. Поэтому представляло интерес исследовать возможность получения 2'-F-РНК-аптамеров к анти-ОБМ антителам, обладающих повышенной селективностью связывания. Для решения этой задачи была проведена дополнительная *in vitro* селекция с использованием ранее полученной обогащенной 2'-F-РНК-библиотеки. Чтобы исключить из библиотеки фракцию аптамеров, связывающихся с другими иммуноглобулинами крови, в цикл отбора была введена дополнительная стадия негативной селекции - инкубация 2'-F-РНК с суммарными антителами, выделенными из крови здоровых доноров. Далее следовала стадия положительной селекции на выделенные из крови пациентов с РС анти-ОБМ аутоантитела. С использованием оптимизированного таким образом протокола селекции (см. схему на рисунке 3.8), было проведено два раунда отбора, и получена новая обогащенная 2'-F-РНК-библиотека (см. 2.3.11), которую затем методом ОТ-ПЦР переводили в дцДНК-форму для секвенирования.

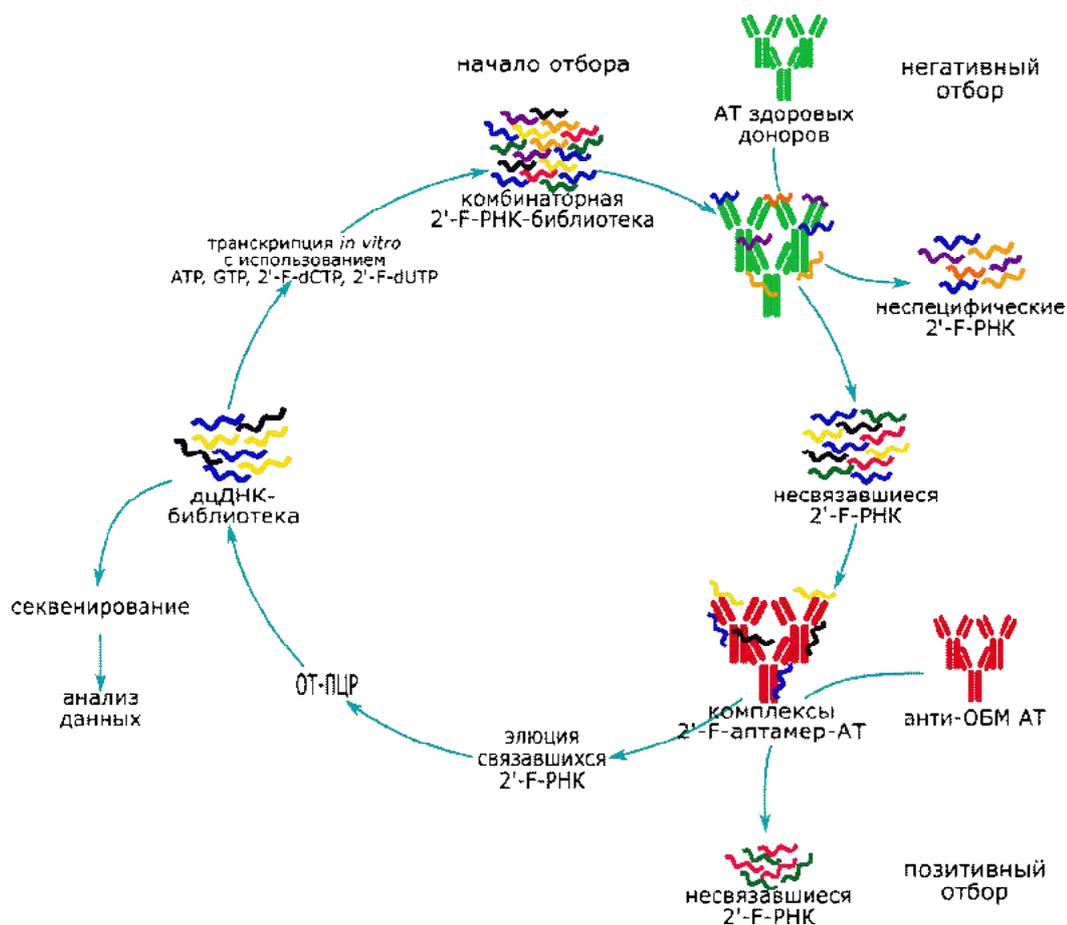


Рисунок 3.8. Общая схема *in vitro* селекции 2'-F-РНК-аптамеров на анти-ОБМ аутоантитела с контрселекцией на антитела здоровых доноров.

Для установления последовательностей индивидуальных аптамеров был использован метод высокопроизводительного параллельного секвенирования на платформе Illumina MiSeq, всего было прочитано 50704 последовательностей. Нуклеотидные последовательности наиболее представленных в библиотеке аптамеров и соответствующие частоты встречаемости приведены в приложении 2. В результате анализа полученных результатов были выявлены десять наиболее часто встречающихся в обогащенной библиотеке аптамеров, последовательности их переменных участков (соответствующих фрагменту N40 исходной 2'-F-РНК-библиотеки) и частоты встречаемости приведены в таблице 3.6. Интересно отметить, что нуклеотидные последовательности некоторых новых 2'-F-РНК-аптамеров совпали с последовательностями аптамеров, полученных после первой селекции (например, аптамеры **II-8** и **12-4**). Для дальнейшей работы в качестве кандидатных были выбраны пять лидирующих по встречаемости аптамеров **12-1**, **12-2**, **12-3**, **12-4**, **12-5** (серия **12**), синтезированных методом автоматического твердофазного фосфитамидного синтеза (**2.3.1**).

Таблица 3.6. Последовательности рандомизированных участков 2'-F-РНК-аптамеров после дополнительных раундов отбора.

ОН	Последовательность 5'→3'	Встречаемость
12-1	CCCAUCGAAUUUCGCUACAUGCCCUUCUUCGGUGCCCCGCA	3.8%
12-2	UCAAUUACCUGAGAGCAGGAGUACAAUCUUUGGCCGCGUG	1.6%
12-3	UUGAGCUCGAUGCCACGGCUCGUCGUCUUUCCGCGUGCCC	1.2%
12-4 (II-8)	AGGGCAAUCCUCAGUCUCGCGCUCCUCGUUCGGGUGCUGCC	0.6%
12-5	CCUUUCUCA AUGCGCCCGUACAGCGCCAUCGAUUCGCCC	0.5%
12-6	UGUUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUCGUUUACCCA	0.5%
12-7	UGUUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUUGUUUACCCG	0.4%
12-8	AUGAUCGGUGCUGAUCGUGCGCGCUCGUGGCUUGGCC	0.4%
12-9	UAGCUCUGGUGACGGCGAAUCGAUUGAUGUCGCUUCUUGC	0.4%
12-10	GACCUCUGUGGAUUUCGGUCCAUCAGGACCCCUUCUCUG	0.3%

Все С и U - 2'-F-пиримидиновые нуклеотиды.

На рисунке 3.9 представлены предположительные вторичные структуры 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров серии **12**, полученные на основе алгоритма минимизации свободной энергии с помощью программного пакета mfold version 2.3. Все аптамеры серии **12** имеют различную сложно организованную пространственную структуру, содержащую двуцепочечные фрагменты, шпильки и внутренние петли.

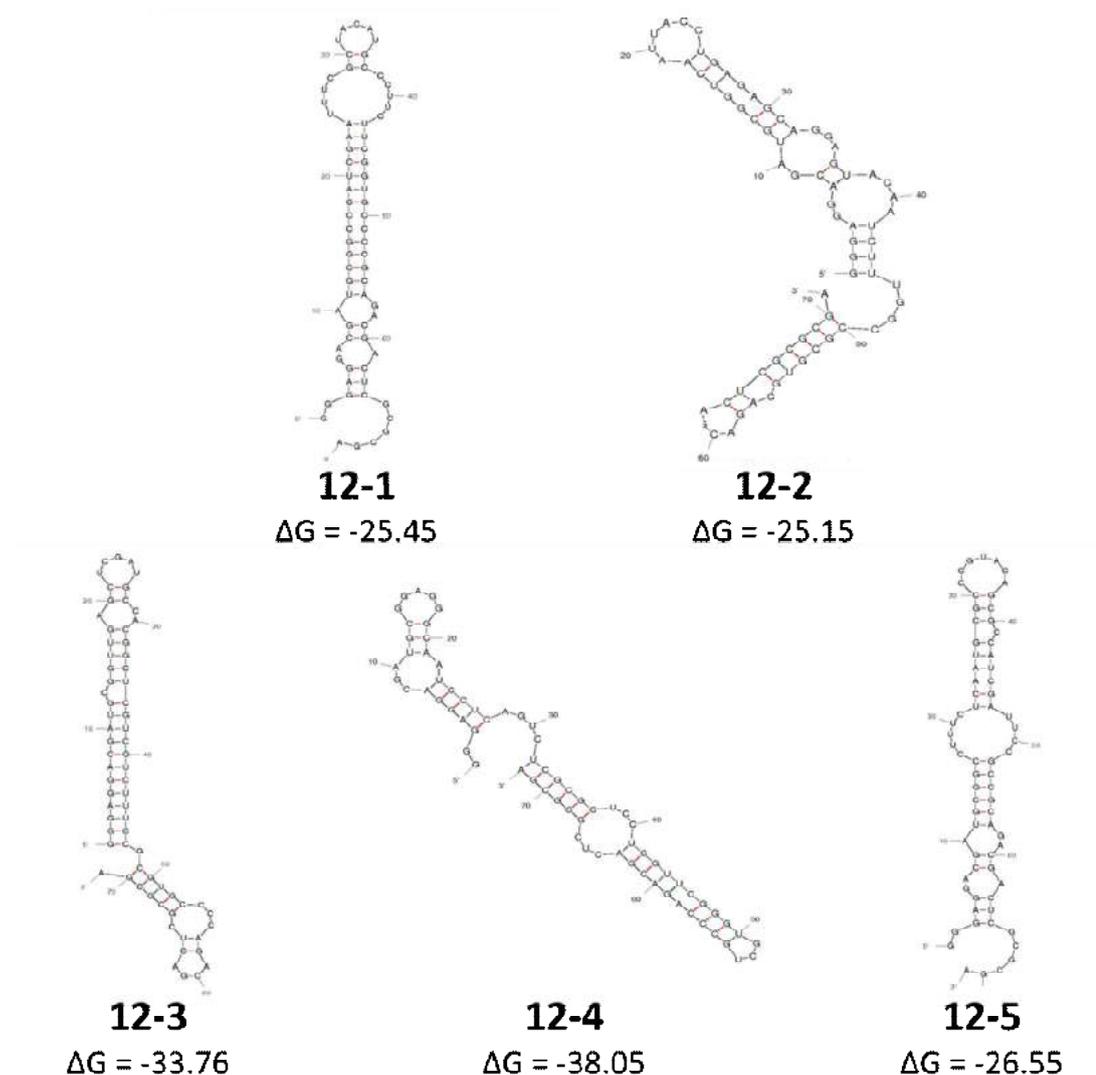


Рисунок 3.9. Расчетные вторичные структуры 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров серии **12** и значения ΔG_{298} при 25°C по версии mfold version 2.3. Значения ΔG_{298} приведены в ккал/моль.

Чтобы определить аптамер с оптимальными для наших задач характеристиками, был проведен скрининг сродства и селективности связывания аптамеров серии **12** со смесью анти-ОБМ аутоантител от больных РС и от здоровых доноров. Исследование образования комплексов антител с аптамерами проводили методом задержки в геле, как описано в разделе **3.3**, в условиях возрастающей концентрации антител и следовых количеств радиоактивно меченых 2'-F-РНК-аптамеров.

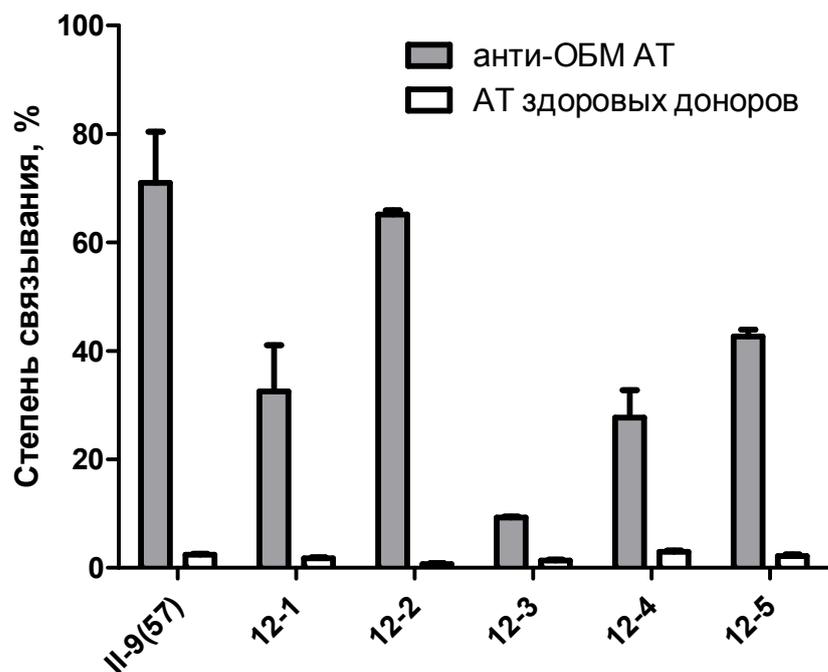


Рисунок 3.10. Степень связывания 2'-F-РНК-аптамеров со смесью анти-ОБМ антител (100 нМ) и антителами здоровых доноров (100 нМ).

Сравнительный анализ связывания аптамеров серии **12**, а также аптамера **11-9(57)** с анти-ОБМ антителами больных РС и IgG здоровых доноров (рисунок 3.10) показал, что в серии **12** максимальная степень связывания с аутоантителами-мишенями и минимальное связывание с пулом аналогичных антител от здоровых доноров характерно для аптамера **12-2**. Интересно отметить, что и в этом случае аптамер **12-2**, демонстрирующий большую степень связывания с антителами-мишенями, обладал наименьшим абсолютным значением ΔG_{298} . Возможно, как и в случае аптамера **11-9**, это дает возможность "подстройки" структуры аптамера для более прочного связывания с мишенью.

3.6. Минимизация олигонуклеотидной последовательности аптамера **12-2**

Как и в случае описанной выше предыдущей серии 2'-F-РНК-аптамеров (раздел 3.4), после выбора кандидатного аптамера мы исследовали возможность удаления из его последовательности нуклеотидов, не влияющих на взаимодействие с мишенью. Для определения таких нуклеотидов, предположительно не участвующих в комплексообразовании, было проведено компьютерное моделирование вторичной структуры. Предположительная вторичная структура аптамера **12-2** представлена на рисунке 3.11.

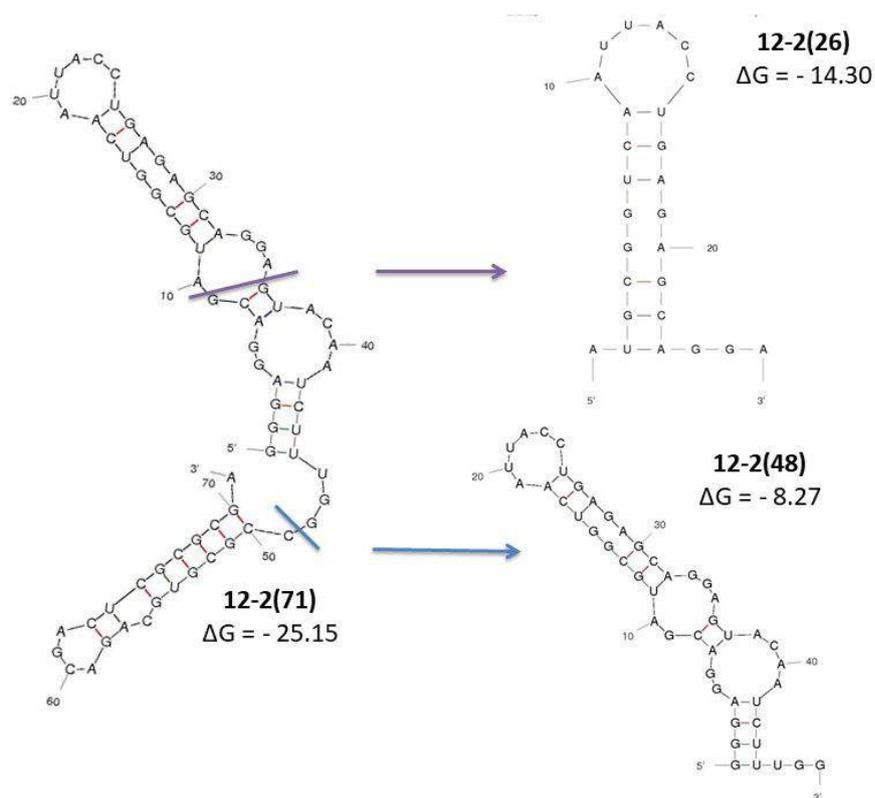


Рисунок 3.11. Расчетные вторичные структуры и значения ΔG_{298} 2'-F-РНК-аптамера **12-2** и его минимизированных аналогов при 25°C по версии mfold version 2.3. Значения ΔG_{298} приведены в ккал/моль.

Предполагаемая вторичная структура аптамера **12-2** состоит из двух РНК-шпилек, соединенных 4-нуклеотидным одноцепочечным фрагментом. При этом 3'-концевая шпилька практически полностью представлена константным праймер-связывающим участком. Чтобы проверить, участвует ли этот структурный элемент в связывании аптамера с мишенью, был сконструирован 48-звенный аптамер **12-2(48)** с удаленной 3'-концевой шпилькой (на рисунке 3.11 отмечено голубой линией). Мы исследовали также возможность более радикальной минимизации нуклеотидной последовательности аптамера до шпилечной структуры, образованной нуклеотидами с 10 по 35 (на рисунке 3.11 этот вариант показан фиолетовой линией). В результате последовательность соответствующего минимизированного аптамера **12-2(26)** составила 26 нуклеотидов.

Методом автоматического твердофазного фосфитамидного синтеза была синтезирована серия 2'-F-РНК-аптамеров **12-2**: **12-2(71)** (полноразмерный аптамер **12-2**), **12-2(48)**, **12-2(26)** (Таблица 3.7).

Таблица 3.7. Последовательности 2'-F-РНК-аптамера **12-2** и его минимизированных аналогов.

ОН	Последовательность 5'→3'
12-2(71)	GGGAGGACGAUGCGGUCAAUUACCUGAGAGCAGGAGUACAAUCUUU GGCCGCGUGCAGACGACUCGCGCGA
12-2(48)	GGGAGGACGAUGCGGUCAAUUACCUGAGAGCAGGAGUACAAUCUUUGG
12-2(26)	UGCGGUCAAUUACCUGAGAGCAGGA

Все С и U - 2'-F-пиримидиновые нуклеотиды.

Чтобы установить, как повлияло последовательное удаление шпильчатых фрагментов из состава аптамера на его аффинность, связывание аптамеров со смесью анти-ОБМ антител было исследовано методом задержки в геле, как описано выше. Кривые связывания приведены на рисунке 3.12.

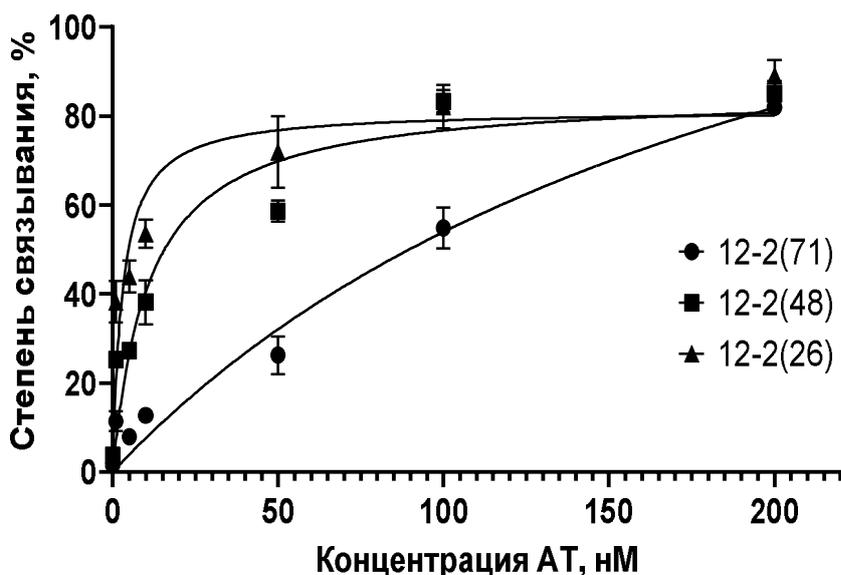


Рисунок 3.12. Кривые связывания минимизированных аналогов 2'-F-РНК-аптамера **12-2** со смесью анти-ОБМ АТ из крови больных РС. Условия образования комплексов приведены в «Экспериментальной части».

Из полученных данных зависимости степени связывания от концентрации белка были рассчитаны значения K_D для комплексов 2'-F-РНК-аптамеров серии **12-2** с анти-ОБМ антителами (таблица 3.8). Оказалось, что при удалении 3'-концевых фрагментов стабильность комплекса аптамер-антитело увеличивается: константы диссоциации комплексов укороченных аптамеров с патогенными аутоантителами оказались приблизительно на порядок ниже, чем в случае полноразмерного аптамера **12-2(71)**. Как и

в описанном выше случае минимизации нуклеотидной последовательности аптамера **II-9**, можно предположить, что стабилизация комплекса достигается за счет меньшего электростатического отталкивания между аптамером и белком.

Таблица 3.8. Константы диссоциации серии 2'-F-РНК-аптамеров **12-2** с анти-ОБМ антителами.

Аптамер	12-2(71)	12-2(48)	12-2(26)
K_D , нМ	88±39	11±3	3±1

Для сравнения свойств полученного при предыдущем отборе 2'-F-РНК-аптамера **II-9(57)** и аптамера **12-2(26)** и оценки селективности их связывания с антителами-мишенями было исследовано комплексообразование радиоактивно меченых аптамеров с анти-ОБМ антителами из сыворотки крови пациентов с РС, с суммарными IgG-антителами, выделенными из крови больных РС, антителами из крови здоровых доноров, а также с суммарными антителами из крови больных другим аутоиммунным заболеванием – системной красной волчанкой (СКВ). СКВ — хроническое мультисистемное заболевание с многообразными дефектами иммунной регуляции, характеризующееся нарушениями толерантности к аутоантигенам клеточных ядер, цитоплазмы и мембран и образованием аутоантител к этим структурам [149]. Известно, что в крови больных СКВ на поздних стадиях заболевания также могут быть обнаружены анти-ОБМ антитела, которые предположительно вносят вклад в разрушение миелиновой оболочки нервных волокон [150]. Поэтому представляло интерес сравнить способность полученных аптамеров связывать препараты антител от больных РС и СКВ.

На рисунке 3.13 приведены кривые связывания аптамеров **II-9(57)** и **12-2(26)** с анти-ОБМ аутоантителами из крови больных РС, с суммарными антителами класса G, выделенными из крови больных РС, СКВ и из крови здоровых доноров. Оба аптамера демонстрируют способность эффективно связываться с анти-ОБМ аутоантителами от больных РС не только в аффинно выделенных на ОБМ-сефарозе препаратах, но и в суммарном пуле антител из сыворотки крови пациентов с РС. Степень связывания с суммарными антителами здоровых доноров при этом не превышала 10%. Важно отметить, что столь же низкая эффективность связывания, сравнивая с контрольными антителами здоровых доноров, характерна также для антител от больных СКВ, что указывает на селективность связывания именно анти-ОБМ антител, характерных для РС.

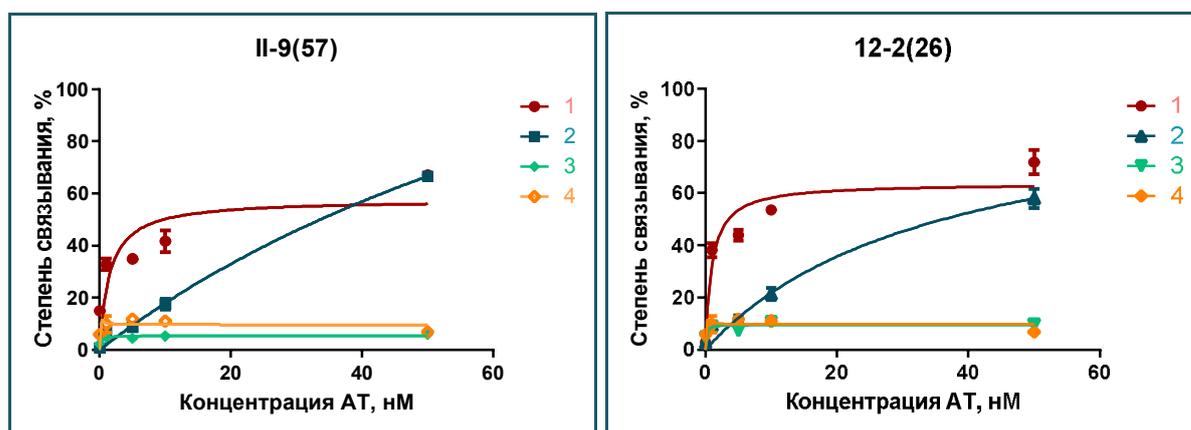


Рисунок 3.13. Кривые связывания аптамеров **II-9(57)** и **12-2(26)** с 1) аффинно-очищенными анти-ОБМ аутоантителами из крови больных РС, 2) суммарными IgG-антителами больных РС, 3) суммарными IgG-антителами здоровых доноров, 4) суммарными IgG-антителами больных СКВ.

Сравнивая константы диссоциации комплексов различных препаратов антител с 2'-F-РНК-аптамерами **II-9(57)** и **12-2(26)** (таблица 3.9), можно заключить, что оба аптамера обладают высоким сродством как к аффинно очищенному препарату анти-ОБМ антител из крови больных РС, так и к суммарным антителам из крови больных РС, при этом сродство к суммарным IgG-антителам из крови здоровых доноров по крайней мере на два порядка ниже, что также говорит о высокой селективности связывания.

Таблица 3.9. Константы диссоциации комплексов аптамеров **II-9(57)** и **12-2(26)** с антителами больных РС и антителами здоровых доноров.

Вид антител K _D комплексов, нМ	Анти-ОБМ аутоантитела	Антитела больных РС	IgG здоровых доноров
12-2(26)	3±1	35±4	400±200
II-9(57)	5±2	33±4	1400±1100

Условия определения приведены в «Экспериментальной части».

Можно заключить, что полученные нами два негомологичных 2'-F-модифицированных РНК-аптамера **II-9(57)** и **12-2(26)** обладают высоким сродством к анти-ОБМ антителам, характерным для РС, и способны селективно узнавать антитела-мишени в том числе в присутствии широкого разнообразия других аналогичных антител. Данное сочетание качеств позволяет рассматривать полученные аптамеры в качестве молекулярных узнающих элементов при создании биосенсоров для высокочувствительной и селективной детекции ассоциированных с РС анти-ОБМ антител. Следующая часть работы посвящена конструированию и характеристике таких биосенсоров и исследованию возможности детекции анти-ОБМ аутоантител с их использованием.

3.7. Создание биолюминесцентных аптасенсоров с использованием полученных 2'-F-РНК-аптамеров в качестве узнающих элементов

На следующих этапах работы мы исследовали возможность использования полученных 2'-F-РНК-аптамеров **П-9(57)** и **12-2(26)** в качестве узнающих элементов для создания аптасенсоров для детекции патогенных аутоантител, характерных для РС.

В настоящее время в литературе описано широкое разнообразие биосенсоров на основе аптамеров с различными типами детекции (см. раздел 1.4 обзора литературы). В данной работе для детекции аутоантител нами был выбран вариант образования аналитических комплексов сэндвич-типа на поверхности микропланшета с последующей оптической детекцией. В рамках этого способа анализа проводят иммобилизацию в лунках микропланшета первичного «узнающего» компонента, специфичного к анализируемой мишени, внесение в систему исследуемого образца, содержащего аналит (в нашем случае - анти-ОБМ аутоантитела) и «проявление» аналита после добавления вторичного компонента, несущего метку для детекции. Выбор такого формата анализа обусловлен несколькими факторами: гетерогенный анализ позволяет отделить несвязавшиеся (незафиксированные на поверхности) молекулы с помощью оптимально подобранного количества промывок. Использование 96-луночного микропланшета позволяет провести несколько серий параллельных измерений. Кроме того, данный подход обеспечивает и значительно более высокую чувствительность детекции по сравнению с оптической детекцией в гомогенных системах [151].

Среди аптасенсоров широкое распространение получили системы, основанные на использовании оптических методов детекции. К преимуществам таких систем относятся разнообразные возможности для конструирования аптасенсора в зависимости от конкретной задачи, относительная простота анализа и высокая чувствительность [152,153].

В рамках совместных работ лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН и лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН была предложена стратегия конструирования биолюминесцентных аптасенсоров для детекции характерных для РС анти-ОБМ аутоантител. В качестве репортерной группы для получения биолюминесцентного сигнала был выбран фотопротеин обелин.

Обелин (рисунок 3.14) – Ca^{2+} -регулируемый фотопротеин, выделенный из гидроидного полипа *Obelia longissima*. На данный момент детально охарактеризованы структура и свойства этого белка. Обелин представляет собой устойчивый фермент-субстратный комплекс, состоящий из белковой части – апопротеина (одноцепочечный полипептид, состоящий из 195 аминокислот, 22.2 кДа) и предокисленного субстрата (2-

гидропероксицелентеразина), нековалентно связанного с апопротеином [154]. По данным рентгеноструктурного анализа глобулярная структура обелина включает 8 альфа-спиралей, организованных в виде двух — N и C концевых доменов, и может быть представлена в виде 2-х «чашек», соединенных краями, с внутренней полостью образованной боковыми цепями гидрофобных аминокислот [155]. Субстрат прочно иммобилизован в этой полости сетью водородных и других нековалентных связей. Из четырех петель, соединяющих альфа спирали, 3 представляют собой Ca^{2+} -связывающие центры канонического EF-hand типа, характерного для семейства Ca^{2+} -связывающих белков.

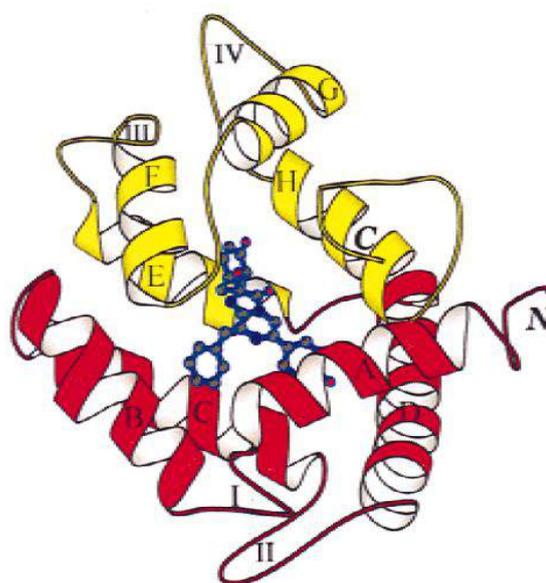


Рисунок 3.14. Пространственная структура фотопротеина обелина. Красным и желтым цветом показаны альфа-спирали N и C концевых доменов, соответственно; римскими цифрами пронумерованы петли их соединяющие, из которых I, III и IV являются Ca^{2+} -связывающими. Синим цветом выделен субстрат – 2-гидропероксицелентеразин [155].

Присоединение ионов кальция вызывает конформационное изменение молекулы белка, в результате чего развивается реакция декарбоксилирования целентеразина, продуктами которой являются молекулы целентерамида в возбужденном состоянии и CO_2 . Переход целентерамида из возбужденного в основное состояние сопровождается излучением кванта света в видимой области ($\lambda_{\text{max}} = 485 \text{ nm}$). Схема биoluminesцентной реакции обелина представлена на рисунке 3.15.

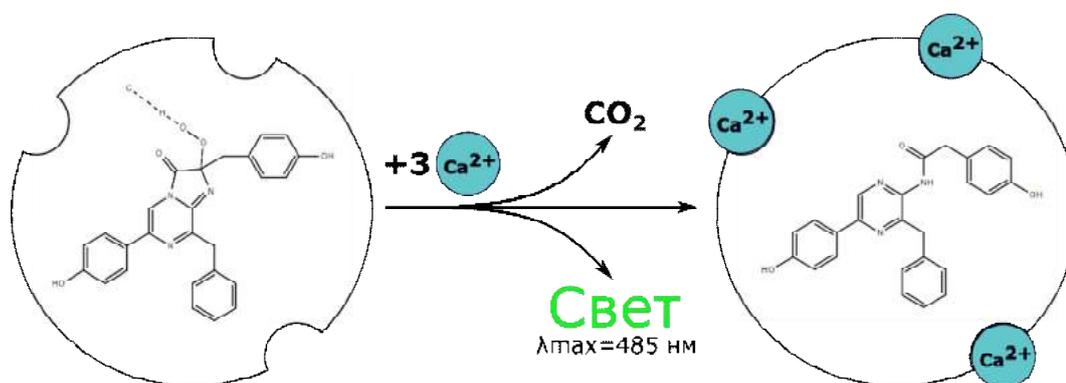


Рисунок 3.15. Схематическое изображение биолуминесцентной реакции фотопротейна обелина.

Высокий квантовый выход и практически полное отсутствие фонового сигнала позволяют детектировать аттомолярные количества обелина. Характерным и очень ценным качеством является принципиально линейная зависимость сигнала от концентрации белка (в условиях избытка ионов Ca^{2+}), ограниченная только возможностями измерительной аппаратуры и условиями эксперимента. Белок стабилен при хранении и способен сохранять функциональную активность после введения химических и генетических модификаций, что позволяет получать на его основе высокочувствительные репортерные молекулы [156–158].

Применение Ca^{2+} -регулируемого фотопротейна обелина в качестве репортера обеспечивает высокую чувствительность анализа и простоту его проведения (см., например, обзор [159]). Создан штамм *E. coli* - суперпродуцент рекомбинантного обелина и его генетических вариантов с новыми полезными свойствами, а также эффективная технология получения этих белков в высокоочищенном виде [160,161]. Разработаны способы конъюгирования обелина с различными биоспецифическими молекулами – гаптенами, белками, олигонуклеотидами и показано, что применение конъюгатов обелина в качестве репортеров в молекулярном анализе обеспечивает чувствительность, сравнимую с изотопной меткой, а также простое и быстрое получение результатов. В частности, была показана перспективность использования обелина как биолуминесцентной метки в иммуно- и гибридном анализе для определения ряда диагностически важных мишеней - гормонов, инфекционных агентов, онкомаркеров и пр. [162–167]. К моменту начала данной работы в литературе не было описано биолуминесцентных сенсоров на основе аптамеров, в которых в качестве метки использован обелин.

Для получения ковалентных конъюгатов аптамер-обелин были химически синтезированы производные 2'-F-РНК-аптамеров **П-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. Этот вариант обелина был получен в ИБФ СО РАН сайт-направленным мутагенезом остатка аспарагиновой кислоты в 12-м положении на цистеин. Наличие такой SH-группы на поверхности обелина обеспечивает его сайт-направленное конъюгирование с другими молекулами практически без потери его биолюминесцентной активности [168].

Нами была предложен способ синтеза ковалентных конъюгатов аптамер-обелин с использованием бифункционального реагента сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилата (SMCC), схема которого приведена на рисунке 3.16.

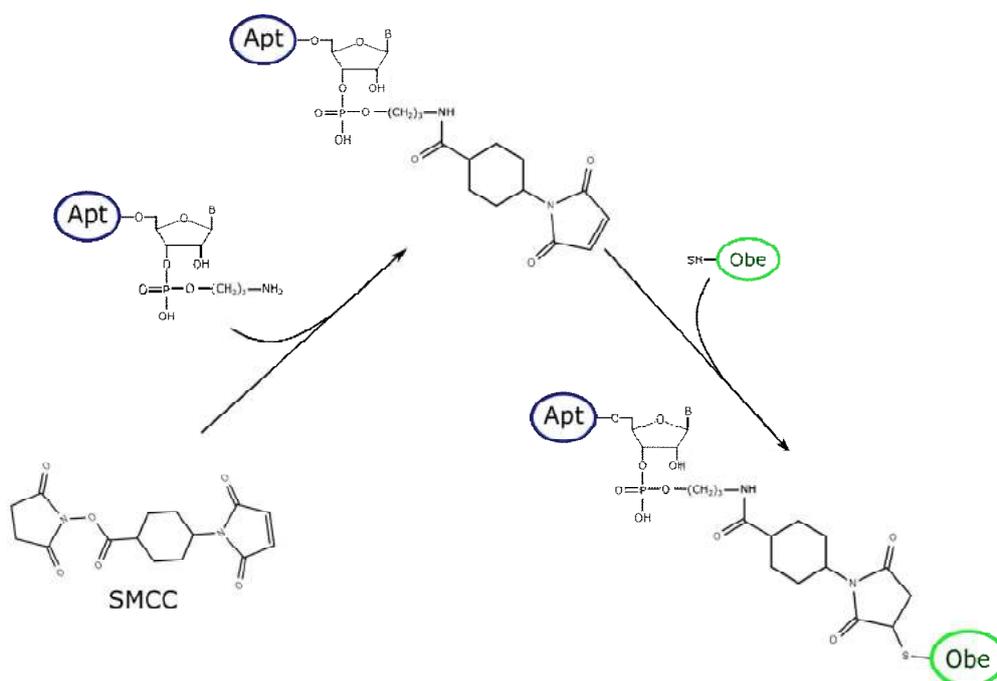


Рисунок 3.16. Схема синтеза ковалентных конъюгатов аптамеров с фотопротеином обелином. В – гетероциклическое основание.

При исследовании оптических свойств полученных конъюгатов было показано, что конъюгирование с аптамером незначительно влияет на биолюминесцентные свойства белка. Так, на примере конъюгата **II-9(57)** с обелином было показано, что его биолюминесцентная активность конъюгата составляет 85-90% от активности свободного обелина, профиль зависимости интенсивности биолюминесценции от времени был практически таким же, как у обелина дикого типа. Предел обнаружения для конъюгата аптамер-обелин (2.5 амоль) близок к пределу обнаружения обелина дикого типа (1.5–2 амоль). В спектре поглощения (рисунок 3.17) наблюдается максимум при 260 нм, относящийся к олигонуклеотидному компоненту с молярной экстинкцией $5.377 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. При этом относительно низкий коэффициент молекулярной экстинкции обелина

при 280 нм ($5.55 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$) вносит лишь незначительный вклад в спектр поглощения всего конъюгата.

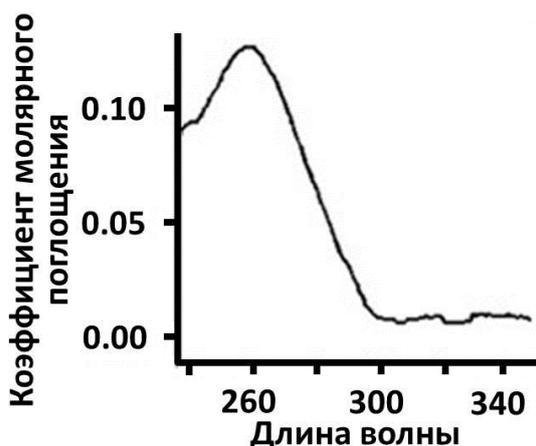


Рисунок 3.17. Спектр поглощения конъюгата 2'-F-РНК-аптамера II-9(57) с обелином.
*Данные получены к.б.н. Красицкой В. В. (ИБФ СО РАН).

Первый вариант сэндвич-системы для биолюминесцентной детекции анти-ОБМ антител содержал антитела к константным Fc-доменам человеческих IgG в качестве улавливающего компонента и ковалентный конъюгат аптамера II-9(57) или 12-2(26) с обелином в качестве репортерного компонента. Схема детекции показана на рисунке 3.18.

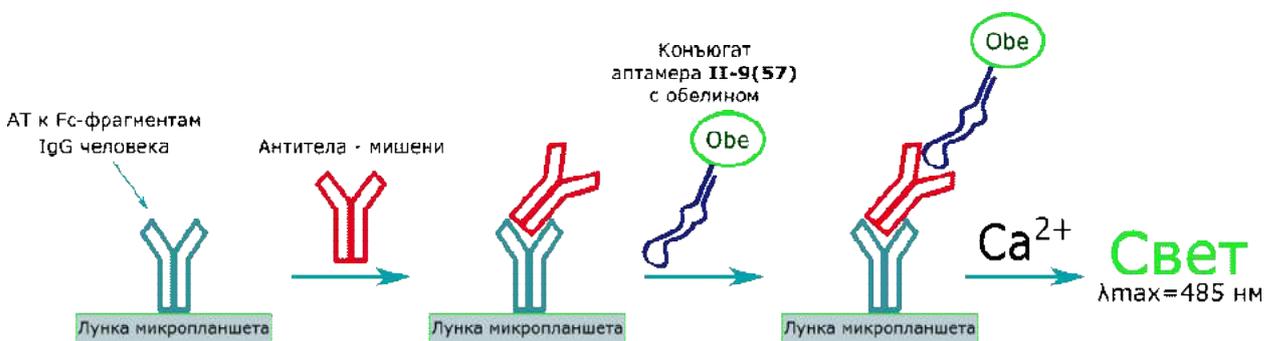


Рисунок 3.18. Схема биолюминесцентной детекции анти-ОБМ антител в микропланшетном формате с использованием сэндвич-пары антитело/аптамер.

В лунки микропланшета с нековалентно иммобилизованными моноклональными антителами мыши против Fc-фрагментов IgG человека, вносили аликвоты анти-ОБМ антител из крови больных РС. В качестве контроля были использованы аликвоты антител от здоровых доноров. После инкубации и отмывки несвязавшихся антител в лунки добавляли растворы репортерных компонентов - конъюгатов 2'-F-РНК-аптамеров II-9(57) или 12-2(26) с обелином (II-9(57)~Obe и 12-2(26)~Obe, соответственно), инкубировали в течение 40 минут и промывали. Сигнал, получаемый от образцов, измеряли на планшетном люминометре сразу после добавления раствора CaCl_2 .

Было показано, что использование в качестве репортерного компонента конъюгата **II-9(57)~Obe** обеспечивает высокую чувствительность и селективность детекции: сигнал, полученный от анти-ОБМ антител, увеличивался при увеличении количества мишени, в то время как величина сигнала от антител здоровых доноров была примерно на порядок ниже и практически не зависела от концентрации мишени (рисунок 3.19).

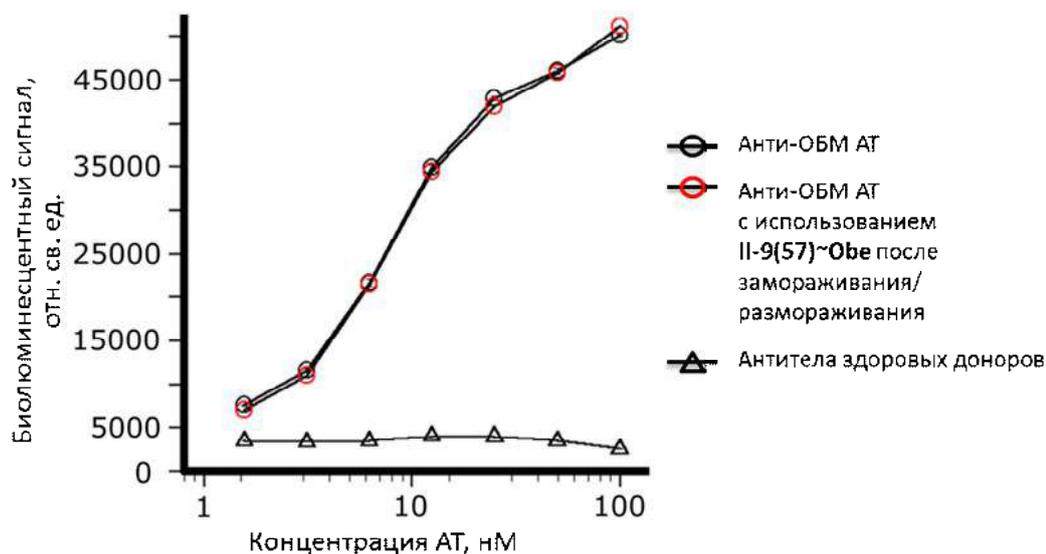


Рисунок 3.19. Анализ связывания анти-ОБМ антител (круги) и антител здоровых доноров (треугольники) с использованием конъюгата **II-9(57)~Obe***. Отн. св. ед. – относительные световые единицы.

*Данные получены к.б.н. Красицкой В. В. (ИБФ СО РАН).

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. Важно отметить, что конъюгат **II-9(57)~Obe** сохранял свою функциональную активность даже при замораживании/размораживании (на рисунке 3.19 соответствующие данные отмечены кругами красного цвета) и хранения при 8°C в течение трех недель. Этот факт указывает на то, что ковалентный конъюгат аптамер-обелин – стабильная молекула, подходящая для использования в качестве биоломинесцентной метки в гетерофазном анализе.

Аналогичные эксперименты были проведены при исследовании свойств конъюгата аптамера **12-2(26)** с обелином. При его использовании в качестве репортерного компонента в модельной системе, содержащей аффинно очищенные анти-ОБМ антитела больных РС либо суммарные антитела здоровых доноров, были получены близкие значения биоломинесцентного сигнала от целевых и контрольных антител (рисунок 3.20), при этом мы не наблюдали выраженной концентрационной зависимости сигналов. Мы предполагаем, что это может быть связано с меньшей длиной олигонуклеотидной цепи

аптамера **12-2(26)** и, соответственно, меньшим его размером (8.5 кДа) по сравнению с обелином (22.5 кДа). За счет этого обелин может стерически препятствовать корректному связыванию аптамера с мишенью, что приводит к неспецифическому взаимодействию конъюгата аптамера с модифицированной поверхностью планшета. Для сравнения, размер аптамера **II-9(57)** (18.1 кДа) сравним с размером обелина, что обеспечивает возможность его использования для создания репортерного конъюгата.

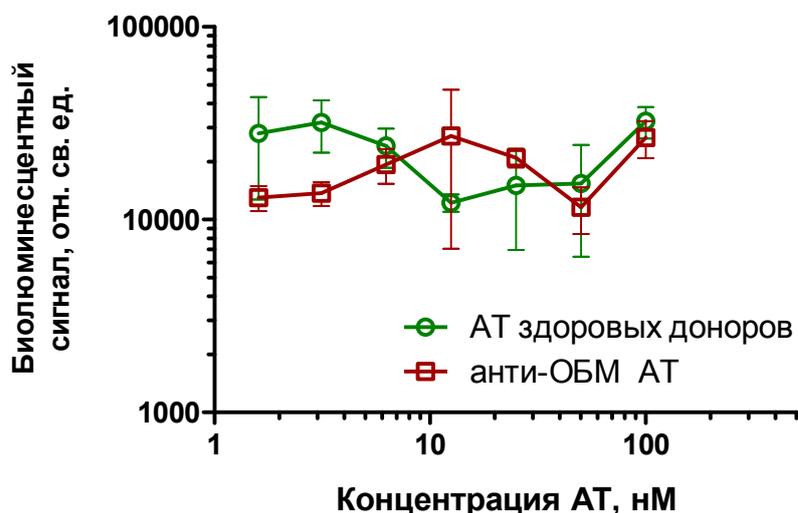


Рисунок 3.20. Зависимость биоломинесцентного сигнала, полученного при использовании конъюгата **12-2(26)~Обе** в качестве репортерного компонента, от концентрации аналита. Отн. св. ед. – относительные световые единицы.

Результаты данной серии экспериментов позволяют заключить, что из двух исследованных конъюгатов 2'-F-РНК-аптамеров с обелином конъюгат 2'-F-РНК-аптамера **II-9(57)** с обелином может быть использован в качестве репортерного компонента для биоломинесцентной детекции анти-ОБМ аутоантител в формате антитело/аптамер.

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

На следующем этапе конструирования аптасенсоров мы исследовали возможность использования созданных нами в данной работе 2'-F-РНК-аптамеров не только в качестве репортерного компонента сенсора, но и в качестве «улавливающего» мишень компонента, иммобилизованного в лунке планшета. Описанный выше формат детекции антитело/аптамер был протестирован на аффинно очищенном препарате анти-ОБМ антител. Однако использование антител к Fc-доменам человеческих IgG при анализе образцов из крови, содержащих огромное разнообразие IgG, очевидно, не позволит получить в данной системе селективный сигнал от иммуноглобулинов конкретной специфичности. Мы предположили, что замена Fc-специфичных моноклональных антител

на аптамеры, связывающие только характерные для РС анти-ОБМ антитела, при анализе смеси антител из крови пациентов позволит «обогатить» анализируемые пробы целевыми антителами, и, соответственно, даст возможность селективной детекции антител-мишеней в образцах из крови пациентов. Необходимо отметить, что создание сенсоров на основе пары аптамеров позволяет полностью исключить из конструкции антитела. В перспективе это делает сенсор более стабильным, значительно менее чувствительным к условиям транспортировки и хранения, а также обеспечивает более высокую степень воспроизводимости результатов. При этом на данный момент в литературе описаны лишь единичные примеры микропланшетных аптасенсоров на основе пары аптамеров, аналогичных распространенным сенсорам для ИФА-диагностики на основе антител (см., например, обзор [2]).

Принципиальная схема оптического микропланшетного сенсора на основе пары аптамеров подразумевает иммобилизацию одного из них в лунках планшета, внесение анализа, отмывку 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 2'-F-РНК-аптамеров **П-9(57)** и **12-2(26)** с биотином - **П-9(57)~bio** и **12-2(26)~bio**, соответственно (**2.3.13**). Для этого химически синтезированные производные аптамеров, содержащие алифатическую аминогруппу на 3'-конце, были использованы в реакции с N-гидроксисукцинимидным эфиром биотина.

Клинические образцы сывороток крови содержат помимо антител и другие компоненты (белки, нуклеиновые кислоты, низкомолекулярные соединения, соли и др.), содержание которых различается у разных пациентов, а также может изменяться у одного пациента в разные моменты времени. Эти компоненты сыворотки крови могут влиять на аффинность аптамеров к мишеням [169,170]. Чтобы избежать такого влияния и стандартизировать рН и солевой состав индивидуальных образцов, мы проводили пробоподготовку сывороток крови. Для этого использовали очистку на колонках с белком А, иммобилизованном на агарозе. Такая пробоподготовка позволяет получить смесь антител с значительным преобладанием IgG и минорными количествами IgA и IgM. Поскольку дальнейшее развитие данного исследования подразумевало анализ большого количества образцов сывороток крови, а хроматографическая очистка (**2.3.10.1**) антител на колонках является достаточно времязатратной, мы предложили упрощенный протокол выделения антител с использованием спин-колонок с белком А (**2.3.10.1**). Предложенный нами вариант пробоподготовки образцов включает в себя нанесение образца сыворотки крови, 4х-кратно разбавленного буфером, промывку спин-колонок от неспецифического

связывания других компонентов сыворотки крови буфером, содержащим 1% Тритон X-100 и слабокислым буфером с pH 6.5, элюцию целевых антител 0.1 М Gly-HCl (pH 2.6) и нейтрализацию полученного раствора. Последовательность операций выделения антител по данному протоколу схематически представлена на рисунке 3.21.

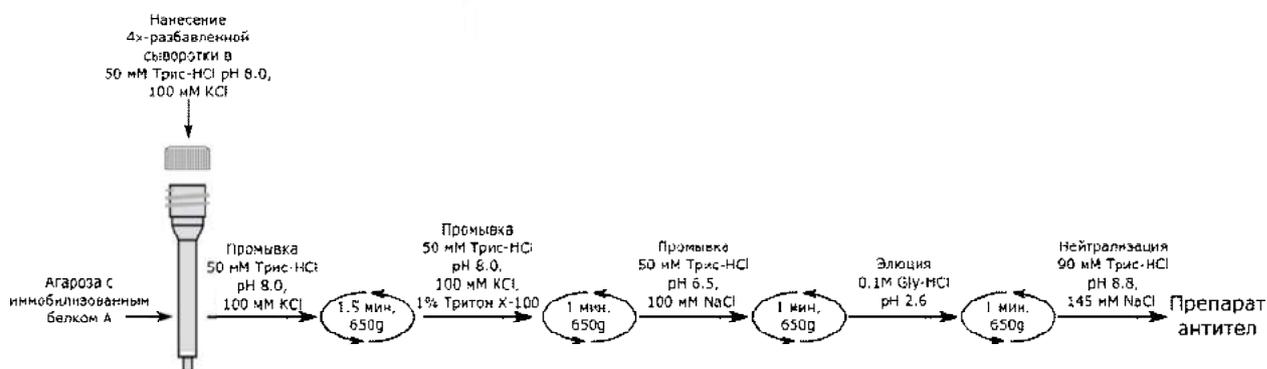


Рисунок 3.21. Схема протокола выделения антител на спин-колонках с использованием белка А, иммобилизованном на агарозе.

При выборе оптимальной конструкции билюминесцентного сенсора на основе пары 2'-F-РНК-аптамеров в качестве модельного анализита были использованы аффинно очищенные на ОБМ-сефарозе анти-ОБМ антитела из сывороток крови больных РС, а в качестве контроля селективности - коммерчески доступные человеческие IgG-антитела (hIgG). Кривые зависимости билюминесцентного сигнала от концентрации антител, полученные при использовании конъюгатов **II-9(57)~bio** и **12-2(26)~bio** в качестве первичных иммобилизованных в лунке планшета «узнающих» элементов, приведены на рисунке 3.22.А. При этом в качестве репортерного компонента во всех случаях был использован конъюгат 2'-F-РНК-аптамера **II-9(57)~Obe**.

Как видно из представленных данных, при иммобилизации на поверхности микропланшета каждого из аптамеров, билюминесцентный сигнал значительно возрастает с увеличением концентрации целевых антител-мишеней и практически не изменяется с увеличением концентрации контрольных антител. Величины отношения билюминесцентных сигналов «больной/здоровый», полученные при различных концентрациях антител, приведены на рисунке 3.22.Б.

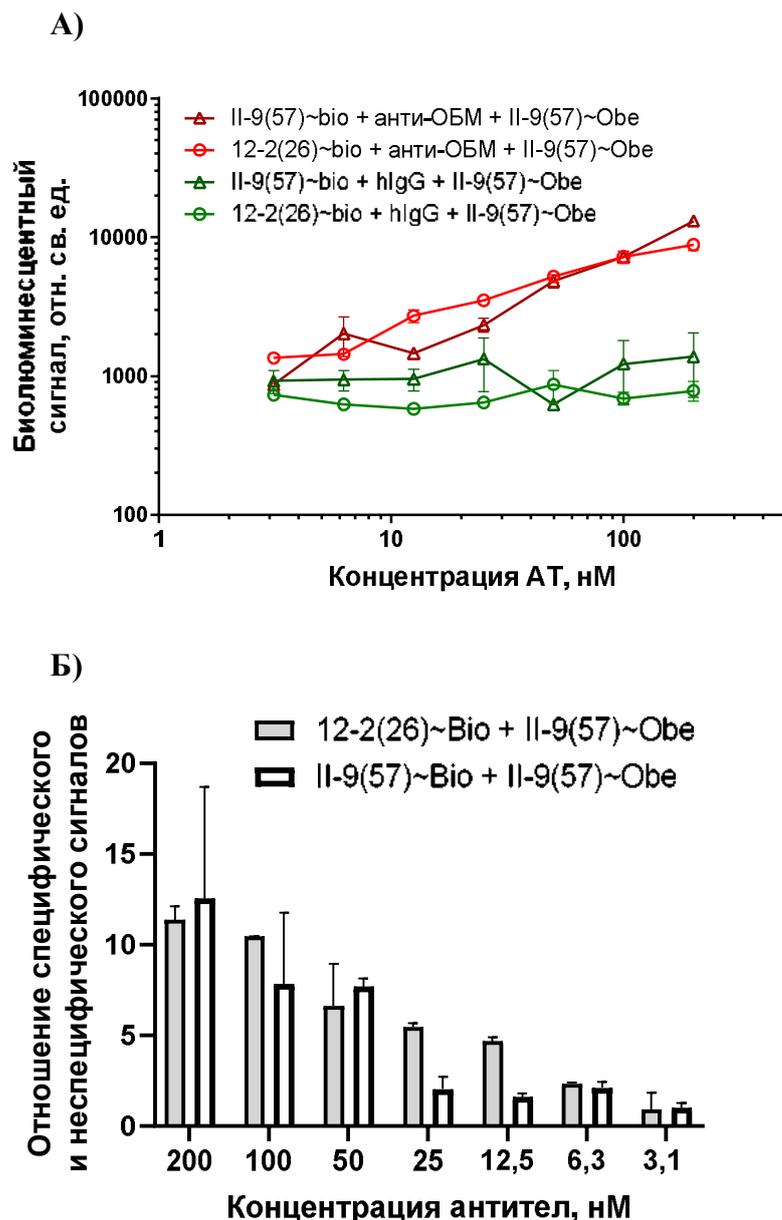


Рисунок 3.22. А) Зависимость величин билюминесцентных сигналов от концентрации анти-ОБМ АТ (красным цветом) и суммарных антител здоровых доноров hIgG (зеленым цветом) при использовании биотиновых конъюгатов 2'-F-РНК-аптамеров **II-9(57)-bio** (треугольники) и **12-2(26)-bio** (круги) в качестве «улавливающих» компонентов.

Б) Величины отношений сигналов от антител-мишеней и контрольных антител при использовании биотиновых конъюгатов аптамеров **II-9(57)-bio** и **12-2(26)-bio** в качестве «улавливающих» компонентов.

В качестве репортерного компонента – конъюгат 2'-F-РНК-аптамера с обелином **II-9(57)-Obe**. Отн. св. ед. – относительные световые единицы.

В большинстве случаев аптамер **12-2(26)** обеспечивал более высокое соотношение величин билюминесцентных сигналов от анти-ОБМ антител и контрольных антител здоровых доноров. Такой результат указывает на то, что в случае «сэндвича» из пары

аптамеров большей селективностью обладает аптасенсорная система, в которой конъюгат 2'-F-РНК-аптамера **12-2(26)** с биотином иммобилизован на поверхности, а конъюгат аптамера **II-9(57)** с обелином используется в качестве метки. Чтобы проверить, соблюдается ли эта закономерность не только для модельных растворов антител, но и для образцов более сложного состава, вышеописанным способом были проанализированы по одному образцу суммарных IgG-антител: от больного РС (пациент **PC55**) и от здорового донора (образец **зд47**). Полученные данные представлены на рисунке 3.23.

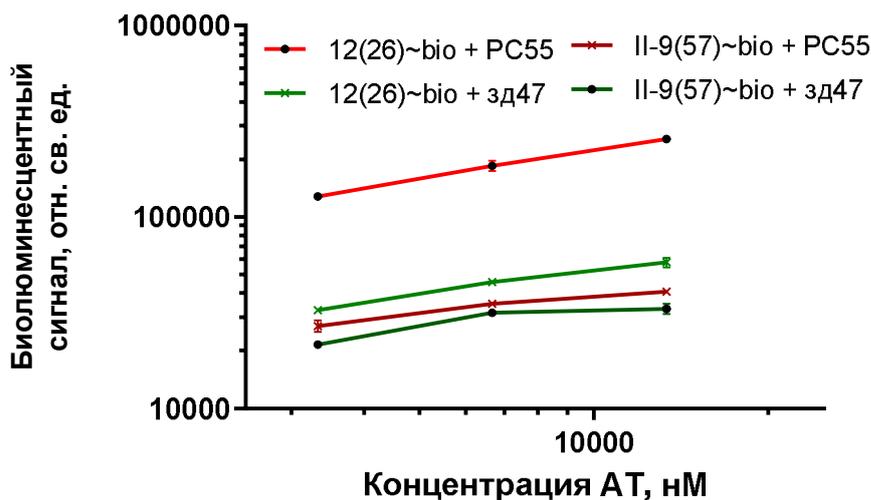


Рисунок 3.23. Билюминесцентные сигналы при анализе суммарных антител из крови пациента с РС (**PC55**) и из крови здорового донора (**зд47**) с использованием в качестве первичного компонента аптасенсора аптамеров **II-9(57)** или **12-2(26)**. В качестве репортерного компонента – конъюгат 2'-F-РНК-аптамера с обелином **II-9(57)~Обе**. Отн. св. ед. – относительные световые единицы.

Для аптамера **12-2(26)** была зафиксирована максимальная величина билюминесцентного сигнала, а также значительное различие сигналов от суммарных антител из крови больного РС и контрольных антител из крови здорового донора. На основании этих данных мы заключили, что аптамер **12-2(26)** является лучшим «улавливающим» компонентом сенсора по сравнению с аптамером **II-9(57)**. Использование аптамера **12-2(26)** в качестве первичного компонента аптасенсора приводит к появлению достоверно различимых сигналов «больной/здоровый».

Выбранная в результате оптимальная конструкция билюминесцентного аптасенсора на основе пары 2'-F-РНК-аптамеров включает в себя аптамер **12-2(26)**, иммобилизованный в лунке микропланшета за счет биотин-стрептавидинового взаимодействия, для селективного связывания аутоантител-мишеней из препарата суммарных IgG-антител. В качестве репортерного компонента аптасенсора выступает конъюгат 57-звенного аптамера **II-9(57)** с фотопротеином обелином (рисунок 3.24).

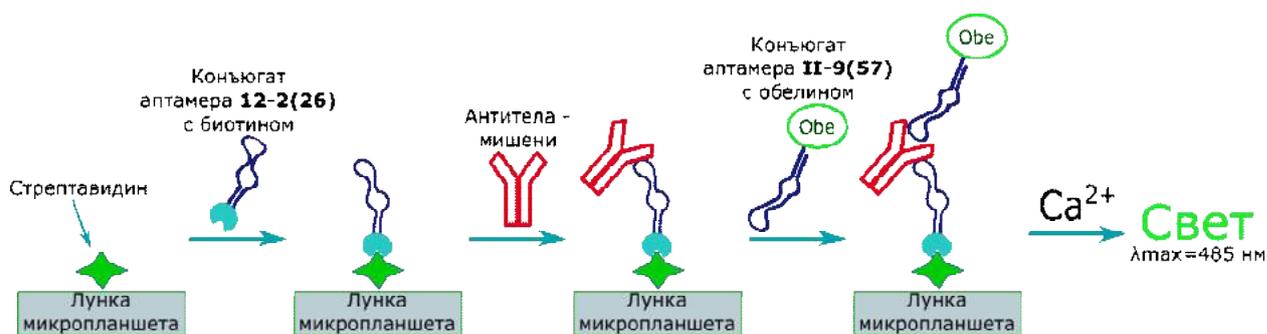


Рисунок 3.24. Схематическое изображение аптасенсора на основе пары 2'-F-РНК аптамеров к анти-ОБМ аутоантителам с использованием фотопротейна обелина в качестве репортерной группы.

Для дальнейшей оптимизации условий анализа в качестве аналита мы использовали смесь аффинно-очищенных анти-ОБМ антител, выделенных из сывороток крови шести пациентов РС. Это позволяет исключить на этапе оптимизации случайные факторы, связанные с индивидуальными особенностями антител от каждого конкретного донора. На рисунке 3.25 представлены кривые зависимости биоломинесцентного сигнала от концентрации аналита для смеси анти-ОБМ антител или для суммарных антител здоровых людей (hIgG).

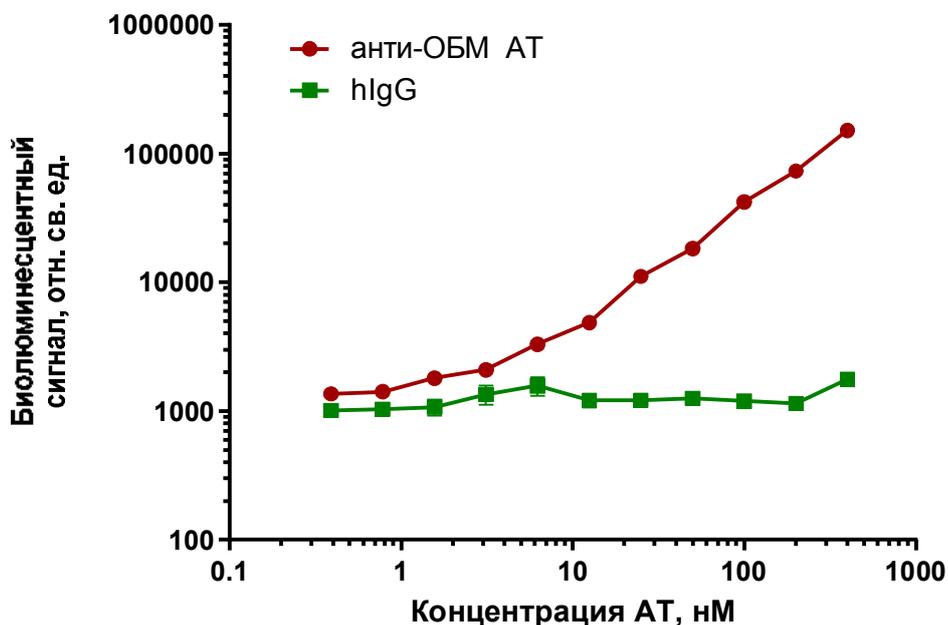


Рисунок 3.25. Зависимость биоломинесцентных сигналов от концентрации анти-ОБМ антител (красная кривая) и hIgG (зеленая кривая) при анализе связывания в системе на основе пары 2'-F-РНК-аптамеров. Отн. св. ед. – относительные световые единицы.

Как видно из приведенных данных, биоломинесцентные сигналы, полученные от анти-ОБМ антител, увеличиваются с ростом концентрации аналита, в то время как сигналы от контрольных антител примерно одинаково низки и не имеют четко

выраженной концентрационной зависимости. При концентрации антител-мишеней 6.3 нМ биолюминесцентный сигнал превышал сигнал от антител здоровых доноров в 2.1 раза, эта концентрация может быть рассмотрена как чувствительность данного метода анализа.

Поскольку доля целевых анти-ОБМ антител в суммарном пуле иммуноглобулинов невысока (0.2 - 3%), представляло интерес исследовать способность созданного аптасенсора детектировать целевые антитела в присутствии большого избытка антител того же типа. Для этого был использован модельный раствор, который содержал антитела здоровых доноров hIgG, допированные различными количествами анти-ОБМ антител (0 – 5%), при этом общая концентрация антител во всех случаях составляла 1.5 мг/мл (рисунок 3.26).

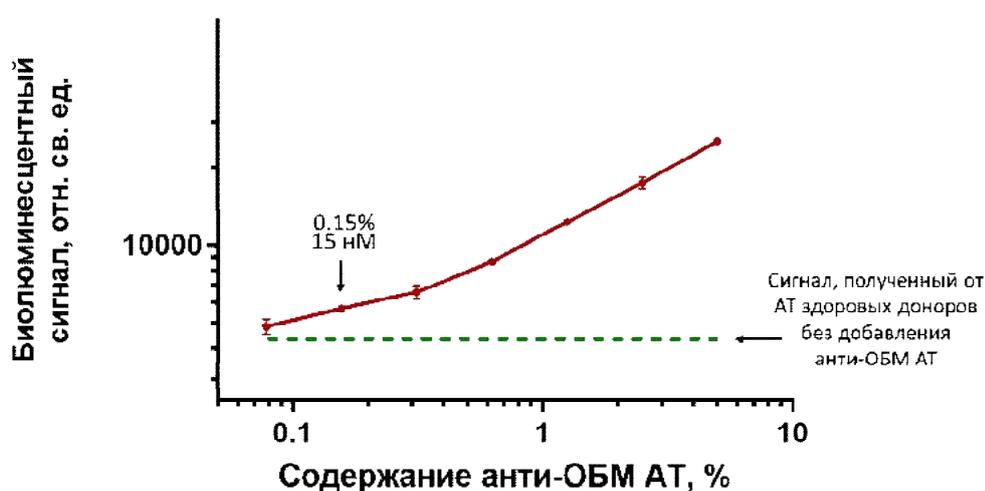


Рисунок 3.26. Зависимость величины биолюминесцентного сигнала аптасенсора на основе пары 2'-F-РНК-аптамеров от доли анти-ОБМ аутоантител в смеси с контрольными антителами здоровых доноров hIgG. Отн. св. ед. – относительные световые единицы.

Из полученных данных было определено, что сенсор на основе пары 2'-F-РНК-аптамеров способен детектировать до 0.15% (15 нМ) содержание анти-ОБМ антител в смеси с другими антителами. При меньшем содержании антител-мишеней не было достоверного различия между сигналами, полученными от смеси антител, и от контрольных антител здоровых доноров.

Для использования разрабатываемой нами аптасенсорной системы при анализе клинических образцов в других лабораторных условиях необходимы калибровочные стандарты с заведомо положительным и отрицательным сигналами. В нашем случае в качестве отрицательного контроля могут выступать коммерчески доступные IgG-антитела человека, которые выделены из крови здоровых доноров и с высокой степенью вероятности не содержат анти-ОБМ антител. Более сложной является ситуация с положительным контролем. Ещё на стадии отбора аптамеров в качестве мишени была

использована смесь анти-ОБМ аутоантител, выделенных из крови от различных пациентов с РС. С одной стороны, такой подход повысил шансы отобрать аптамеры к эпитомам белка, общим для всех ассоциированных с РС анти-ОБМ аутоантител. С другой стороны, на стадии создания аптасенсоров он усложнил выбор единого калибровочного стандарта для положительного контроля работы системы. В качестве наиболее доступного на данном этапе положительного контроля можно использовать описанный выше модельный раствор – смесь hIgG с анти-ОБМ антителами, выделенными из сывороток крови нескольких пациентов с рассеянным склерозом. Важно отметить, что пулы поликлональных анти-ОБМ антител, полученные от разных доноров, неоднородны по своему составу и свойствам. Чтобы нивелировать эти различия и получить воспроизводимые результаты калибровки, необходимо использовать смесь анти-ОБМ аутоантител от максимально возможного числа больных РС

3.9. 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 и количества каждого из основных компонентов системы, а именно конъюгатов аптамеров **12-2(26)~bio**, **II-9(57)~Obe** и суммарных IgG-антител, вносимых в анализ.

Для определения оптимального количества аптамера при иммобилизации в лунках планшета было проведено сравнение значений биолюминесцентного сигнала, полученных с использованием различных концентраций аптамерного конъюгата **12-2(26)~bio** (25 – 100 нМ). В качестве аналита использовали образец суммарных антител от больных РС и здоровых доноров в одинаковой концентрации. Отношения полученных сигналов «больной/здоровый» представлены на рисунке 3.27.

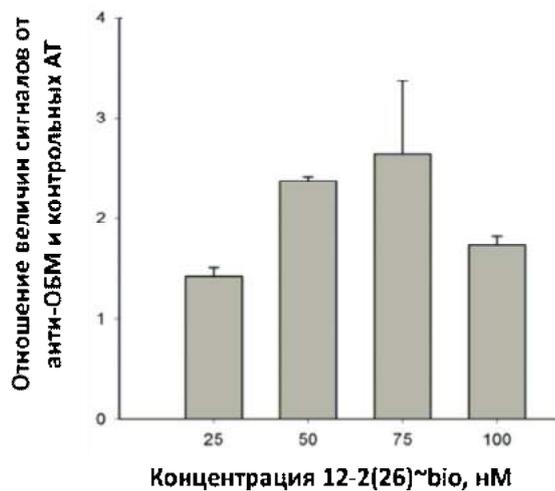


Рисунок 3.27. Зависимость отношения величин биоломинесцентных сигналов от анти-ОБМ антител и контрольных антител от количества иммобилизованного в лунке планшета конъюгата 2'-F-РНК-аптамера 12-2(26)~bio.

Из полученных результатов можно заключить, что при иммобилизации 12-2(26)~bio из раствора с концентрацией 75 нМ наблюдается наибольшее различие сигналов «больной/здоровый».

Как уже было отмечено выше, препараты суммарных антител, выделенные из индивидуальных образцов крови пациентов с РС, характеризуются различным содержанием анти-ОБМ аутоантител. Поэтому необходимо было выбрать концентрацию суммарных антител из крови, которая обеспечит максимальное различие между сигналами от образцов, полученных от больных РС и от здоровых доноров. При низких концентрациях суммарных антител целевые антитела сложно детектировать, и различие между сигналами «больной/здоровый» не является диагностически значимым, что приводит к ложноотрицательному результату анализа. С другой стороны, при анализе реальных образцов сывороток крови слишком высокие концентрации суммарных антител могут ухудшить селективность детекции за счет неспецифического связывания аптамер-антител и привести к появлению ложноположительных результатов. Для определения оптимальной концентрации антител в анализируемых пробах была исследована серия образцов суммарных антител от больных РС при различных концентрациях: РС16, РС18, РС11 и РС8. На рисунке 3.28 представлено соотношение сигналов, полученных от образцов суммарных антител пациентов с РС и от контрольных антител здоровых людей (hIgG). Максимальное соотношение между специфическим и неспецифическим сигналами для большинства образцов достигалось при концентрации 11.5 мкМ, что соответствует 1.5 мг/мл.

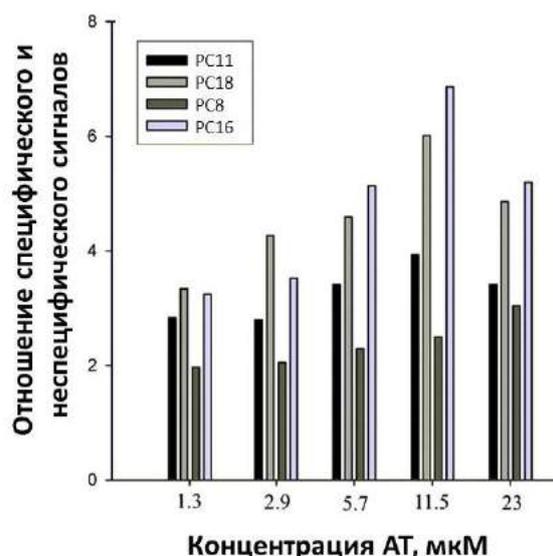


Рисунок 3.28. Зависимость соотношения величин биолюминесцентных сигналов при анализе образцов от больных РС и от здоровых доноров от общей концентрации антител в пробе с использованием аптасенсора на основе пары 2'-F-РНК-аптамеров.

Следующим шагом в разработке протокола биолюминесцентной детекции с использованием сенсора на основе пары 2'-F-РНК-аптамеров стало определение оптимальной концентрации репортерного компонента, несущего фотопротейн. Для этого была проведена серия анализов с использованием различных концентраций конъюгата аптамера **II-9(57)~Obe** (0.0125 – 0.2 нМ). Было показано, что повышение концентрации репортерного компонента более 0.025 нМ не оказывает значительного влияния на соотношение сигналов от образцов от больных РС и здоровых доноров (рисунок 3.29), поэтому в дальнейших экспериментах конъюгат **II-9(57)~Obe** использовали в концентрации 0.025 нМ.

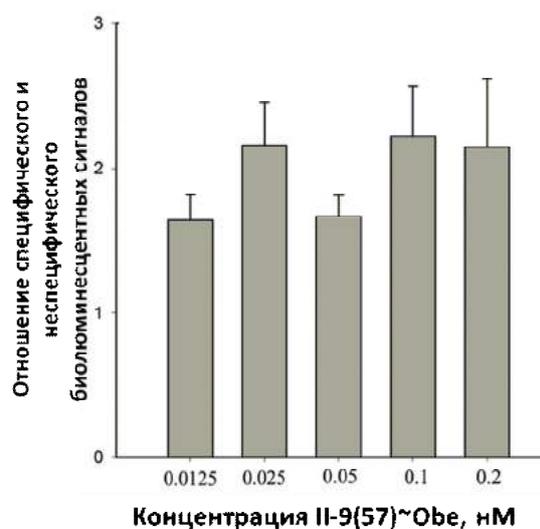


Рисунок 3.29. Зависимость соотношения величин биолюминесцентных сигналов при анализе образцов от больных РС и от здоровых доноров от концентрации репортерного компонента **II-9(57)~Obe** аптасенсора.

Чтобы оценить воспроизводимость разрабатываемого метода детекции, анализ четырех различных проб (три образца больных РС и один контрольный образец антител от здорового донора) был повторен последовательно в течение трех дней, при этом каждый повтор начинали с пробоподготовки образца сыворотки. Коэффициенты вариации, полученные при повторных анализах образцов, составили 1.6 % для образца от здорового донора, и 14.3, 11.9 и 15.6 % от образцов от больных РС с высоким, средним и низким содержанием анти-ОБМ антител, соответственно (рисунок 3.30).

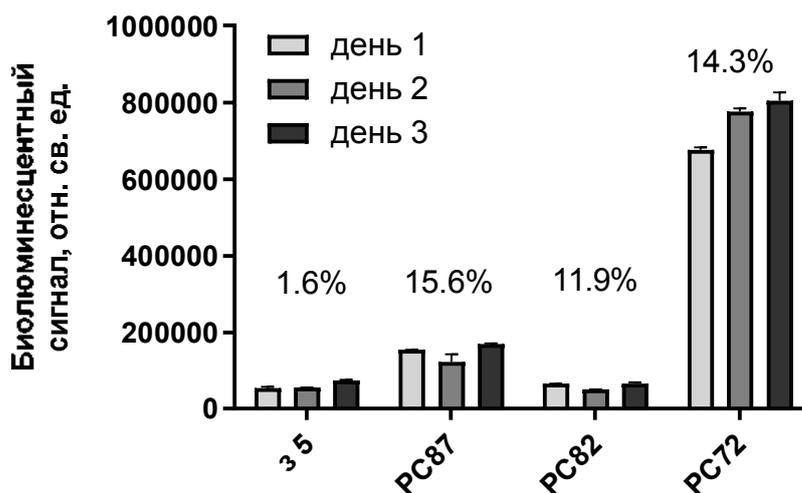


Рисунок 3.30. Воспроизводимость результатов анализа с использованием сенсора на основе пары 2'-F-PHK-аптамеров. В течение трех дней были независимо проанализированы три препарата от больных РС (PC87, PC82, PC72) и препарат от здорового донора (35). В процентах указаны коэффициенты вариации. Отн. св. ед. – относительные световые единицы.

Считается, что чем больше значение коэффициента вариации, тем относительно больший разброс и меньшая выравненность исследуемых значений. По условной классификации вариабельности выборки принято, если CV менее 10%, то изменчивость вариационного ряда считается незначительной, от 10% до 20% – выборка вариабельна средне, при значении CV больше 20% - изменчивость вариационного ряда значительна, что говорит о неоднородности информации [171]. В нашем случае вариация значений, полученных при анализе образца от здорового донора (1.6%) считается незначительной, а для серии образцов от больных с РС (11.9% – 15.6%) – изменчивость вариабельна в среднем диапазоне.

3.10. 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 широкой 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. Всего были исследованы 177 образцов: 91 образец сывороток крови пациентов с клинически подтверждённым диагнозом РС согласно критериям Макдональда [171] (в возрасте 19 – 62 лет, средний возраст 36 лет (30; 46)), 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 (24;40)). 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 3.10. Средний уровень прогрессирования заболевания по расширенной шкале степени инвалидизации (EDSS) – 2.5 (1.5;3.6). Средняя продолжительность болезни – 6 лет (3;10).

Таблица 3.10. Состав пациентов с различным типом течения РС, участвующих в эксперименте

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

Пробоподготовку образцов сывороток производили единообразно по оптимизированному нами протоколу с использованием спин-колонок с белком А, иммобилизованном на агарозе, за 24 часа до проведения анализа. Результаты, полученные при анализе всех серологических образцов, представлены на рисунке 3.31А: каждое значение сигнала от индивидуальной пробы изображено в виде точки на графике, сигналы от пациентов с РС и от контрольной группы сгруппированы отдельно. Было 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. Пороговая кривая была определена автоматически в программном пакете Statistica по оптимальным соотношениям вычисляемых значений чувствительности и специфичности метода. Величину биолюминесцентного сигнала в 70670 отн. св. ед. мы принимаем за минимальное положительное значение при РС при анализе этой выборки данных.

Для определения чувствительности и специфичности метода был использован ROC-анализ (Receiver Operator Characteristic) – график для анализа качества моделей. ROC-анализ представляет собой графическую методику оценки эффективности моделей с помощью двух показателей — чувствительности и специфичности. Значения чувствительности и специфичности показывают, сколько положительных и отрицательных исходов, соответственно, будут выявлены классификатором. ROC-кривая показывает зависимость количества верно классифицированных положительных (истинно положительных) примеров от количества неверно классифицированных отрицательных (ложноотрицательных) примеров. Использование этого статистического метода предполагает, что существует некоторый порог, при варьировании которого общая выборка объектов будет разделяться на два класса: верно и ошибочно классифицированный объект. Для количественной интерпретации результатов ROC-анализа используют показатель AUC (Area Under Curve) — площадь, ограниченная ROC-кривой и осью доли ложноположительных классификаций. Важно отметить, чем выше показатель AUC, тем качественнее классификатор и выше вероятность получения верно-классифицированного значения. Значение $AUC = 1$ означает, что классификатор безошибочно разделяет классы: доля истинно положительных случаев составляет 100%, а доля ложноположительных примеров равна нулю [172–174].

Для оценки результатов, полученных после анализа индивидуальных образцов с использованием созданного биолюминесцентного аптасенсора, в программном пакете Statistica была построена ROC-кривая (рисунок 3.31Б), которая показывает зависимость количества истинно-положительных сигналов от количества ложноотрицательных. В нашем случае истинно-положительным результатом считается больной РС с положительным диагнозом, ложноположительным результатом – здоровый пациент с положительным диагнозом, истинно-отрицательный результат – здоровый пациент с отрицательным диагнозом, ложноотрицательный результат – больной РС с отрицательным диагнозом. Метод построения ROC-кривой базируется на вычислении чувствительности и специфичности для каждого значения порога отсечения, которое меняется от 0 до 1. В итоге получается набор значений порога отсечения и соответствующие ему значения чувствительности и специфичности. По полученным

данным строится ROC-кривая – по оси абсцисс откладываются значения «100%-Специфичность», а по оси ординат – «Чувствительность». При этом ось ординат будет соответствовать вероятности истинно положительных решений, ось абсцисс – вероятности ложноположительных решений. Модель с высокой чувствительностью часто дает истинный результат при наличии положительного исхода (обнаруживает положительные примеры). Наоборот, модель с высокой специфичностью чаще дает истинный результат при наличии отрицательного исхода (обнаруживает отрицательные примеры). Специфичный диагностический тест диагностирует только доподлинно больных.

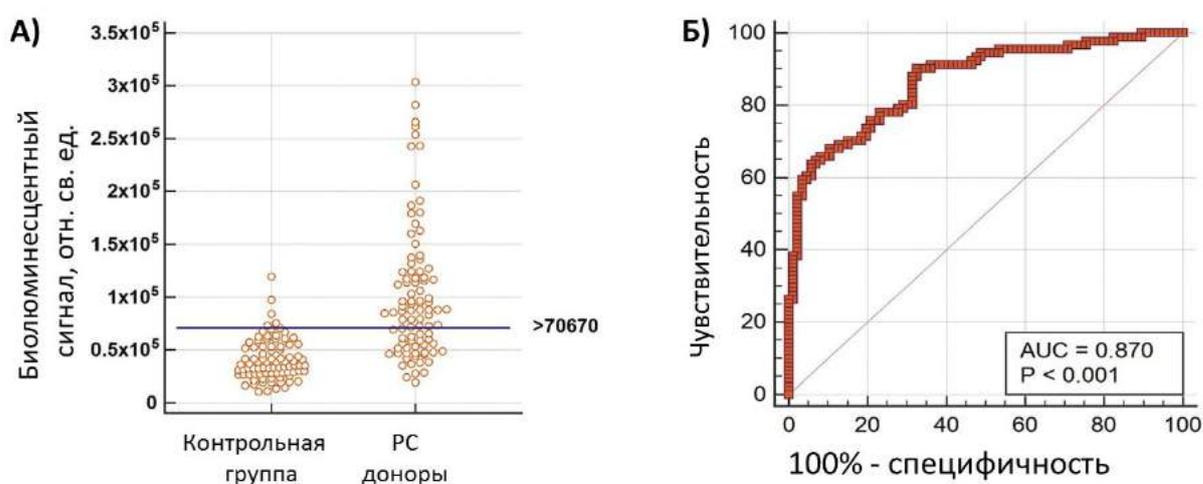


Рисунок 3.31. А) Величины биолюминесцентных сигналов от препаратов суммарных антител из клинических образцов от больных РС и контрольной группы. Б) ROC-кривая, оценивающая разработанный метод.

В нашем случае при оптимальном значении порогового классификатора чувствительность метода составила 63%, а специфичность – 94.2%. Численный показатель площади под кривой AUC составил 0.87, что указывает на очень хорошее различие между двумя группами.

Положительно-прогностическое значение (PPV) в 52% указывает на долю пациентов с подтвержденным диагнозом РС и положительным результатом анализа. Отрицательно-прогностическое значение (NPV) в 96.2% соответствует доле пациентов, которые не имеют заболевания, и с отрицательным результатом анализа. PPV рассчитывается как количество истинно положительных сигналов к общему числу положительных сигналов, NPV – отношение количества истинно отрицательных сигналов к общему числу отрицательных сигналов. Отношение правдоподобия (отношение вероятности получения конкретного результата диагностического теста у пациента с

наличием заболевания, к вероятности такого же результата у пациента без заболевания) – 10.96 позволяет считать анализ диагностически значимым.

Таким образом, на заключительном этапе данной работы была продемонстрирована возможность использования созданного биолюминесцентного аптасенсора на основе пары 2'-F-РНК-аптамеров для анализа клинических образцов на примере большой выборки серологических образцов от больных РС и здоровых доноров. Использование созданного аптасенсора может с высокой долей вероятности исключить диагноз РС у пациентов с отрицательным значением сигнала (отрицательно-прогностическое значение – 96.3%), что может быть использовано при дифференциальной постановке диагноза. Данные характеристики позволяют рассматривать созданный аптасенсор как потенциальное средство для количественной оценки уровня анти-ОБМ антител в крови пациентов с РС и установления диагностической и прогностической значимости этого маркера.

Заключение

Таким образом, в результате проделанной работы химико-ферментативным методом получена серия новых индивидуальных 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров к анти-ОБМ IgG-аутоантителам из крови больных РС. Проведено сравнительное исследование сродства полученных аптамеров и обогащенной 2'-F-РНК-библиотеки к анти-ОБМ IgG-антителам из крови больных РС и к антителам из крови здоровых доноров. Показано, что наибольшим сродством к мишени, сравнимым со сродством обогащенной библиотеки, обладает аптамер **II-9**, при этом обогащенная РНК-библиотека и аптамер **II-9** связываются с патогенными антителами значительно эффективнее, чем с антителами из крови здоровых доноров. Была предложена стратегия минимизации нуклеотидной последовательности аптамера **II-9** – последовательное удаление нуклеотидов из 3'-концевого неструктурированного фрагмента, соответствующего константному участку библиотеки. С использованием автоматического твердофазного фосфитамидного метода были синтезированы укороченные аптамеры **II-9(66)**, **II-9(61)**, **II-9(57)**, а также полноразмерный вариант **II-9(71)**, длиной 66, 61, 57 и 71 нуклеотидов, соответственно. Были исследованы параметры связывания полученных аптамеров с анти-ОБМ антителами больных РС и суммарными IgG-антителами здоровых доноров. Было определено, что удаление 3'-концевого фрагмента аптамера **II-9** повышает как сродство аптамера к патогенным аутоантителам, так и селективность связывания. Оптимальным соотношением сродства и селективности обладал 57-звенный 2'-F-РНК-аптамер **II-9(57)**.

Были проведены дополнительные раунды отбора 2'-F-РНК-аптамеров, включающие стадию контрселекции на антитела здоровых доноров, определены первичные последовательности аптамеров в полученной обогащенной библиотеке и частоты их встречаемости. Химическим твердофазным методом была синтезирована серия 2'-F-РНК-аптамеров, наиболее представленных в новой библиотеке. На основании данных скрининга сродства и селективности был выбран аптамер, обладающий наибольшим сродством к анти-ОБМ антителам больных РС – аптамер **12-2(71)**. По аналогии с описанным выше рациональным дизайном нуклеотидной последовательности аптамера **II-9** была предложена стратегия минимизации нуклеотидной последовательности, проведен химический синтез минимизированных аналогов аптамера **12-2**: аптамеры **12-2(48)** и **12-2(26)** длиной 48 и 26 нуклеотидов, соответственно. Показано, что, при удалении 3'-концевых фрагментов сродство аптамеров к антителам-мишеням увеличивается. При сравнении свойств полученных нами двух негомологичных 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров **II-9(57)** и **12-2(26)** было показано, что оба 2'-F-РНК-

аптамера обладают высоким сродством к анти-ОБМ антителам, характерным при РС, и способны селективно узнавать антитела-мишени в присутствии широкого разнообразия других аналогичных антител. С учетом такого сочетания характеристик полученные 2'-F-РНК-аптамеры были использованы в качестве молекулярных «узнающих» элементов при создании биосенсоров для детекции ассоциированных с РС анти-ОБМ антител.

В данной работе впервые было предложено и реализовано сочетание 2'-F-РНК-аптамеров и Ca^{2+} -регулируемого фотопротейна обелина для конструирования биolumинесцентных аптасенсоров. Была показана возможность использования конъюгата аптамера **II-9(57)** с фотопротейном обелином в качестве сигнального компонента при биolumинесцентной детекции в планшетном варианте, а аптамера **12-2(26)** – в качестве иммобилизованного в лунках планшета «улавливающего» аналит компонента. На основе пары аптамеров **II-9(57)** и **12-2(26)** был впервые создан биolumинесцентный аптасенсор для детекции характерных для РС анти-ОБМ аутоантител в препаратах из сыворотки крови и оптимизированы все стадии протокола анализа. В частности, разработанный способ анализа включает в себя простой протокол пробоподготовки образцов сыворотки крови, позволяющий анализировать образцы в одинаковых условиях, что позволяет избежать недостоверных результатов, обусловленных непостоянством состава сывороток. Была продемонстрирована возможность использования созданного биolumинесцентного аптасенсора на основе пары аптамеров для анализа клинических образцов на примере большой выборки серологических образцов от больных РС и здоровых доноров. Использование созданного аптасенсора может с высокой долей вероятности исключить диагноз РС у пациентов с отрицательным значением сигнала (отрицательно-прогностическое значение – 96.3%), что может быть использовано при дифференциальной постановке диагноза.

Разработанная система детекции может быть использована в дальнейшем для исследования взаимосвязей между уровнем анти-ОБМ антител в крови пациентов и стадией заболевания, типом течения заболевания, откликом на терапию и другими клиническими параметрами РС.

* * *

Работа выполнена совместно с лабораторией фотобиологии Института биофизики СО РАН (ФИЦ «Красноярский научный центр») и кафедрой неврологии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. Войно-Ясенецкого.

Исследования выполнялись в рамках проектов РФФИ №№ 11-04-01014, 14-04-01611, 17-315-50027 и проекта базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210021-7.

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., Ilminskaya 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., Веняминова 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., Веняминова А.Г. РНК-аптамер, обладающий способностью узнавать аутоантитела, характерные для рассеянного склероза. Патент РФ № 2644229, 2017 г.

Тезисы конференций

1. Novopashina D., Vorobjeva M., Timoshenko V., Popovetskaya A., Fokina A., Bezuglova A., Nevinsky G., Venyaminova A. RNA aptamers against anti-MBP autoantibodies associated with multiple sclerosis. XX International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (August 5 - 9, 2012, Montreal, Canada). Abstracts. P.216.
2. Vorobjeva M., Timoshenko V., Popovetskaya A., Fokina A., Timofeeva A., Nevinsky G., Venyaminova A. Selection and properties of 2'-modified RNA aptamers against MBP-specific autoantibodies from patients with multiple sclerosis. *FEBS Journal*. 2013. V. 280 (Suppl. 1). P. 334.
3. Vorobjeva M., Timoshenko V., Krasitskaya V., Nevinsky G., Frank L., Venyaminova A. 2'-Modified RNA aptamer against autoantibodies associated with multiple sclerosis and bioluminescent probe on its basis». 1st International Symposium «Aptamers 2014». (March 24 - 25, 2014, Oxford, UK). Abstracts. P.35.
4. Timoshenko V. V., Vorobjeva M. A., Nevinsky G. A., Frank L. A., Venyaminova A. G. RNA aptamers against autoantibodies related to multiple sclerosis as a basis for detection probes. *FEBS Journal*. 2015. V. 282 (Suppl. 1). P. 174.
5. Тимошенко В. В. РНК-аптамеры к аутоантителам, характерным для рассеянного склероза, как основа для создания биосенсоров. Материалы VIII всероссийского с международным участием конгресса молодых ученых – биологов «Симбиоз 2015». С. 20.

6. Vorobyeva M. A., Timoshenko V. V., Krasitskaya V. V., Kabilov M. R., Nevinsky G. A., Frank L. A., Venyaminova A. G. RNA aptamers against autoantibodies associated with multiple sclerosis: selection, design and prospects of application. *Химическая биология. Материалы международной конференции, посвященной 90-летию академика Д. Г. Кнорре*. 2016. С. 159.
7. М.А. Воробьева, В.В. Тимошенко, В.В. Красицкая, А.С. Давыдова, М.Р. Кабилов, Г.А. Невинский, Л.А. Франк, А.Г. Веняминова. РНК-аптамеры как основа для конструирования биолюминесцентных аптасенсоров на характерные для рассеянного склероза аутоантитела *Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM. — ACTA NATURAE Спецвыпуск Т. 2. — 2016. — с. 134.*
8. Воробьева М.А., Чаукина В.В., Давыдова А.С., Красицкая В.В., Башмакова Е.Е., Воробьев П.Е., Кабилов М.Р., Невинский Г.А., Аброськина М.В., Ильминская А.А., Франк Л.А., Веняминова А.Г. 2'-F-РНК-аптамеры к белковым биомаркерам: селекция и биоаналитическое применение. *Материалы Всероссийской конференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, 29 июня – 2 июля 2019 г.)*. С.65.
9. Vorobyeva M., Chaukina V., Davydova A., Krasitskaya V., Bashmakova E., Vorobjev P., Kabilov M., Nevinsky G., Abroskina M., Ilminskaya A., Frank L., Venyaminova A. 2'-F-RNA aptamers to blood protein biomarkers: development and bioanalytical applications. *1st International Conference «Aptamers in Russia 2019». Book of Abstracts. Mol. Ther.* 2019. V. 17. Suppl. 1. P.16. doi 10.1016/j.omtn.2019.07.010.

Список используемой литературы

1. Maier, K., Levy, M. From selection hits to clinical leads: progress in aptamer discovery // *Mol. Ther. Methods. Clin. Dev.* – 2016. – V. 5. – P. 16014.
2. Seo, H., Gu, M.B. Aptamer-based sandwich-type biosensors // *J. Biol. Eng.* – 2017. – 11.
3. Ilgu, M., Nilsen-Hamilton, M. Aptamers in analytics // *Analyst.* – 2016. – V. 141. – N 5. – P. 1551-1558.
4. Zhuo, Z., Yu, Y., Wang, M., Li, J., Zhang, Z., Liu, J., Wu, X., Lu, A., Zhang, G., Zhang, B. Recent advances in SELEX technology and aptamer applications in biomedicine // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – V. 18. – N 10. – P. 2142.
5. Zhang, H., Zhou, L., Zhu, Z., Yang, C. Recent Progress in Aptamer-Based Functional Probes for Bioanalysis and Biomedicine // *Chemistry - A European Journal.* – 2016. – V. 22. – N 29. – P. 9886-9900.
6. Hu, Z., Deng, A. Autoantibodies in pre-clinical autoimmune disease // *Clin. Chim. Acta.* – 2014. – V. 437. – P. 14-18.
7. ШМИДТ Т.Е., ЯХНО Н.Н. Рассеянный склероз. – М: Медицина, 2003.
8. Guzel, I., Mungan, S., Oztekin, Z., Ak, F. Is there an association between the Expanded Disability Status Scale and inflammatory markers in multiple sclerosis? // *J. Chin. Med. Assoc.* – 2016. – V. 79. – N 2. – P. 54-57.
9. Losy, J. Is MS an inflammatory or primary degenerative disease? // *J. Neural. Transm.* – 2013. – V. 120. – N 10. – P. 1459-1462.
10. Karussis, D. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: A critical review // *J. Autoimmun.* – 2014. – V. 48-49. – P. 134-142.
11. Awad, A., Hemmer, B., Hartung, H., Kieseier, B., Bennett, J., Stuve, O. Analyses of cerebrospinal fluid in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis // *J. Neuroimmunol.* – 2010. – V. 219. – N 1-2. – P. 1-7.
12. El Ayoubi, N., Khoury, S. Blood Biomarkers as Outcome Measures in Inflammatory Neurologic Diseases // *Neurotherapeutics.* – 2017. – V. 14. – N 1. – P. 135-147.
13. Harris, V., Tuddenham, J., Sadiq, S. Biomarkers of multiple sclerosis: current findings // *Degener. Neurol. Neuromuscul. Dis.* – 2017. – V. 7. 19-29.
14. Kalinina, E.V., Ponomarenko, N.A., Durova, O.M., Paleev, F.N., Vorob'ev, I.I., Kekenadze, N.N., Shogenov, Z.S., Zemtsova, M.E., Gnuchev, N.V., Gabibov, A.G. Catalytic autoantibodies in autoimmune myocarditis: clinical and pathogenetic implications // *J. Immunol. Meth.* – 2002. – V. 269. – N 1-2. – P. 197-211.
15. Polosukhina, D.I., Kanyshkova, T.G., Doronin, B.M., Tyshkevich, O.B., Buneva, V.N.,

- Boiko, A.N., Gusev, E.I., Favorova, O.O., Nevinsky, G.A. Hydrolysis of myelin basic protein by polyclonal catalytic IgGs from the sera of patients with multiple sclerosis // *J. Cell. Mol. Med.* – 2004. – V.8. – N 3. – P. 359-368.
16. Comabella, M., Montalban, X. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis // *The Lancet. Neurol.* – 2014. – V.13. – N 1. – P. 113-126.
 17. Tsai, D.E., Kenan, D.J., Keene, J.D. In vitro selection of an RNA epitope immunologically cross-reactive with a peptide. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1992. – V.89. – N 19. – P. 8864-8868.
 18. Blind, M., Blank, M. Aptamer Selection Technology and Recent Advances // *Mol. Ther. Nucleic. Acids.* – 2015. – V.4. – N 1. – e223.
 19. Yuce, M., Ullah, N., Budak, H. Trends in Aptamer Selection Methods and Applications // *Analyst.* – 2015. – V.140. – N 16. – P. 5379-5399.
 20. Szeitner, Z., András, J., Gyurcsányi, R., Mészáros, T. Is less more? Lessons from aptamer selection strategies // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2014. – V.101. – P. 58-65.
 21. Wiegand, T., Williams, P., Dreskin, S., Jouvin, M., Kinet, J., Tasset, D. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I // *J. Immunol.* – 1996. – V.157. – N 1. – P. 221-230.
 22. Gong, M., Wehmeyer, K., Limbach, P., Heineman, W. Frontal analysis in microchip CE: A simple and accurate method for determination of protein-DNA dissociation constant // *Electrophoresis.* – 2007. – V.28. – N 5. – P. 837-842
 23. Turgeon, R., Fonslow, B., Jing, M., Bowser, M. Measuring aptamer equilibria using gradient micro free flow electrophoresis // *Anal. Chem.* – 2010. – V. 82. – N 9. – P. 3636-3641.
 24. Hu, J., Easley, C.J. A simple and rapid approach for measurement of dissociation constants of DNA aptamers against proteins and small molecules via automated microchip electrophoresis // *Analyst.* – 2011. – V. 136. – N 17. – P. 3461-3468.
 25. Bai, Y., Li, Y., Zhang, D., Wang, H., Zhao, Q. Enhancing the Affinity of Anti-Human α -Thrombin 15-mer DNA Aptamer and Anti-Immunoglobulin e Aptamer by PolyT Extension // *Anal. Chem.* – 2017. – V. 89. – N 17. – P. 9467-9473.
 26. Katilius, E., Flores, C., Woodbury, N.W. Exploring the sequence space of a DNA aptamer using microarrays // *Nucleic. Acids. Res.* – 2007. – V. 35. – N 22. – P. 7626-7635.
 27. Mendonsa, S., Bowser, M. In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis // *Anal. Chem.* – 2004. – V. 76. – N 18. – P. 5387-5392.
 28. Jing, M., Bowser, M.T. Isolation of DNA aptamers using micro free flow electrophoresis

- // Lab. Chip. – 2011. – V. 11. – N 21. – P. 3703-3709.
29. Tang, Z., Shangguan, D., Wang, K., Shi, H., Sefah, K., Mallikratchy, P., Chen, H., Li, Y., Tan, W. Selection of aptamers for molecular recognition and characterization of cancer cells // *Anal. Chem.* – 2007. – V. 79. – N 13. – P. 4900-4907.
 30. Mallikaratchy P, Tang Z, Kwame S, Meng L, Shangguan D, Tan W. Aptamer directly evolved from live cells recognizes membrane bound immunoglobulin heavy mu chain in Burkitt's lymphoma cells // *Mol. Cell. Proteomics.* – 2007. – V. 6. – N 12. – P. 2230-2238.
 31. Mallikaratchy, P., Ruggiero, A., Gardner, J., Kuryavyi, V., Maguire, W., Heaney, M., McDevitt, M., Patel, D., Scheinberg, D. A multivalent DNA aptamer specific for the B-cell receptor on human lymphoma and leukemia // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – V. 39. – N 6. – P. 2458-2469.
 32. Zumrut H, Ara M, Fraile M, Maio G, Mallikaratchy P. Ligand-Guided Selection of Target-Specific Aptamers: A Screening Technology for Identifying Specific Aptamers Against Cell-Surface Proteins // *Nucleic Acid Ther.* – 2016. – V. 26. – N 3. – P. 190-198.
 33. Zumrut, H., Batool, S., Van, N., George, S., Bhandari, S., Mallikaratchy, P. Structural optimization of an aptamer generated from Ligand-Guided Selection (LIGS) resulted in high affinity variant toward mIgM expressed on Burkitt's lymphoma cell lines // *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.* – 2017. – V. 1861. – N 7. – P. 1825-1832.
 34. Yoshida, Y., Sakai, N., Masuda, H., Furuichi, M., Nishikawa, F., Nishikawa, S., Mizunod, H., Waga, I. Rabbit antibody detection with RNA aptamers // *Anal. Biochem.* – 2008. – V. 375. – N 2. – P. 217-222.
 35. Hamm, J. Characterisation of antibody-binding RNAs selected from structurally constrained libraries // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – V. 24. – N 12. – P. 2220-2227.
 36. Lakamp, A., Ouellette, M. A ssDNA aptamer that blocks the function of the anti-FLAG M2 antibody // *J. Nucleic Acids.* – 2011. – V. 2011. – P. 720798.
 37. Sakai N, Masuda H, Akitomi J, Yagi H, Yoshida Y, Horii K, Furuichi M, Waga I. RNA aptamers specifically interact with the Fc region of mouse immunoglobulin G. // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf).* – 2008. – N 52. – P. 487-488.
 38. Ma, J., Wang, M., Mao, A., Zeng, J., Liu, Y., Wang, X., Ma, J., Tian, Y., Ma, N., Yang, N., Wang, L., Liao, S. Target replacement strategy for selection of DNA aptamers against the Fc region of mouse IgG // *Genet. Mol. Res.* – 2013. – V. 12. – N 2. – P. 1399-1410.
 39. Miyakawa, S., Nomura, Y., Sakamoto, T., Yamaguchi, Y., Kato, K., Yamazaki, S., Nakamura, Y. Structural and molecular basis for hyperspecificity of RNA aptamer to human immunoglobulin G // *RNA.* – 2008. – V. 14. – N 6. – P. 1154-1163.

40. Nomura, Y., Sugiyama, S., Sakamoto, T., Miyakawa, S., Adachi, H., Takano, K., Murakami, S., Inoue, T., Mori, Y., Nakamura, Y., Matsumura, H. Conformational plasticity of RNA for target recognition as revealed by the 2.15Å crystal structure of a human IgG-aptamer complex // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – V. 38. – N 21. – P. 7822-7829.
41. Pat. WO2007004748. Nucleic acid capable of binding to immunoglobulin G and use thereof / Nakamura Y., Miyakawa S.; - 11.01.2007, RIBOMIC Inc. - 67 pp.
42. Inomata, E., Tashiro, E., Miyakawa, S., Nakamura, Y., Akita, K. Alkaline-tolerant RNA aptamers useful to purify acid-sensitive antibodies in neutral conditions // *Biochimie.* – 2018. – V. 145. – P. 113-124.
43. Muharemagic, D., Labib, M., Ghobadloo, S., Zamay, A., Bell, J., Berezovski, M. Anti-Fab aptamers for shielding virus from neutralizing antibodies // *J. Am.Chem. Soc.* – 2012. — V. 134. – N 41. – P. 17168-17177.
44. Muharemagic, D., Zamay, A., Ghobadloo, S., Evgin, L., Savitskaya, A., Bell, J., Berezovski, M. Aptamer-facilitated Protection of Oncolytic Virus from Neutralizing Antibodies. // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* – 2014. — V. 3. – P. e167.
45. Rosman, Z., Shoenfeld, Y., Zandman-Goddard, G. Biologic therapy for autoimmune diseases: an update // *BMC Med.* – 2013. — V. 11. – N 1. – P. 88.
46. Lyons, R., Narain, S., Nichols, C., Satoh, M., Reeves, W. Effective use of autoantibody tests in the diagnosis of systemic autoimmune disease // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2005. – V. 1050. – P. 217-228.
47. Doudna, J.A., Cech, T.R., Sullenger, B.A. Selection of an RNA molecule that mimics a major autoantigenic epitope of human insulin receptor // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1995. — V. 92. – N 6. – P. 2355-2359.
48. Lee S.W., Sullenger B.A. Isolation of a nuclease-resistant decoy RNA that selectively blocks autoantibody binding to insulin receptors on human lymphocytes. // *J. Exp. Med.* – 1996. — V. 184. – N 2. – P. 315-324.
49. Jang, Y., Sanford, D., Chung, H., Baek, S., Stollar, B. The structural basis for DNA binding by an anti-DNA autoantibody // *Mol. Immunol.* – 1998. – V. 35. – N 18. – P. 1207-1217.
50. Kim, Y., Choi, K., Jang, Y., Yu, J., Jeong, S. Specific modulation of the anti-DNA autoantibody-nucleic acids interaction by the high affinity RNA aptamer // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – V. 300. – N 2. – P. 516-523.

51. Missailidis, S., Thomaidou, D., Borbas, K., Price, M. Selection of aptamers with high affinity and high specificity against C595, an anti-MUC1 IgG3 monoclonal antibody, for antibody targeting // *J. Immunol. Meth.* – 2005. – V. 296. – N 1-2. – P. 45-62.
52. Lee, S., Sullenger, B. Isolation of a nuclease-resistant decoy RNA that can protect human acetylcholine receptors from myasthenic antibodies // *Nat. Biotechnol.* – 1997. – V. 15. – P. 41-45.
53. Seo, H., Lee, S. In vitro selection of the 2'-F-2'-deoxyribonucleotide decoy RNA inhibitor of myasthenic autoantibodies // *Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – V. 10. – N 5. – P. 707-713.
54. Hwang, B., Lee, S. Improvement of RNA aptamer activity against myasthenic autoantibodies by extended sequence selection // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – V. 290. – N 2. – P. 656-652.
55. Hwang, B., Han, K., Lee, S.W. Prevention of passively transferred experimental autoimmune myasthenia gravis by an in vitro selected RNA aptamer // *FEBS Lett.* – 2003. – V. 548. – N 1-3. – P. 85-89.
56. Cho, J.-S., Lee, S.-W. Sequence and structural features of RNA aptamer against myasthenic autoantibodies. // *Oligonucleotides.* – 2009. – V. 19. – N 3. – P. 273-280.
57. Haberland, A., Wallukat, G., Schimke, I. Aptamer binding and neutralization of β 1-adrenoceptor autoantibodies: basics and a vision of its future in cardiomyopathy treatment // *Trends Cardiovasc. Med.* – 2011. – V. 21. – N 6. – P. 177-182.
58. Haberland, A., Wallukat, G., Dahmen, C., Kage, A., Schimke, I. Aptamer neutralization of beta1-adrenoceptor autoantibodies isolated from patients with cardiomyopathies // *Circ. Res.* – 2011. – V. 109. – N 9. – P. 986-992.
59. Skovsgaard, M., Mortensen, M., Palmfeldt, J., Gothelf, K. Aptamer-Directed Conjugation of DNA to Therapeutic Antibodies // *Bioconjug. Chem.* – 2019. – V. 30. – N 8. – P. 2127-2135.
60. Wallukat, G., Haberland, A., Berg, S., Schulz, A., Freyse, E., Dahmen, C., Kage, A., Dandel, M., Vetter, R., Salzsieder, E., Kreutz, R., Schimke, I. The first aptamer-apheresis column specifically for clearing blood of beta1-receptor autoantibodies. // *Circ. J.* – 2012. – V. 76. – N 10. – P. 2449-2445.
61. Haberland, A., Wallukat, G., Berg, S., Schulz, A., Freyse, E., Vetter, R., Salzsieder, E., Müller, J., Kreutz, R., Schimke, I. Neutralization of pathogenic beta1-receptor autoantibodies by aptamers in vivo: The first successful proof of principle in spontaneously hypertensive rats // *Mol. Cell. Biochem.* – 2014. – V. 393. – N 1-2. – P. 177-180.

62. Спиридонова, В. А., Левашов, П. А., Овчинникова, Е. Д., Афанасьева, О. И., Глинкина, К. А., Адамова, И. Ю., Покровский, С. Н. Аффинные сорбенты на основе ДНК-аптамеров для сорбции IgE человека // *Биоорган. химия.* – 2014. – Т. 40. – N 2. – С. 166-169.
63. Cole, J., Dick, L., Morgan, E., McGown, L. Affinity capture and detection of immunoglobulin E in human serum using an aptamer-modified surface in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. // *Anal. Chem.* – 2007. – V. 79. – N 1. – P. 273-279.
64. Lin, L., Wang, H., Liu, Y., Yan, H., Lindsay, S. Recognition imaging with a DNA aptamer // *Biophys. J.* – 2006. – V. 90. – N 11. – P. 4236-4238.
65. Liu, R., Zhai, J., Liu, L., Wang, Y., Wei, Y., Jiang, X., Gao, L., Zhu, H., Zhao, Y., Chai, Z., Gao, X. Spatially marking and quantitatively counting membrane immunoglobulin M in live cells via Ag cluster-aptamer probes // *Chem. Commun.* – 2014. – V. 50. – N 27. – P. 3560-3563.
66. Strehlitz, B., Nikolaus, N., Stoltenburg, R. Protein detection with aptamer biosensors // *Sensors.* – 2008. – V. 8. – N 7. – P. 4296-4307.
67. Yoshida, Y., Horii, K., Sakai, N., Masuda, H., Furuichi, M., Waga, I. Antibody-specific aptamer-based PCR analysis for sensitive protein detection // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2009. – V. 395. – N 4. – P. 1089-1096.
68. Hiep, H., Saito, M., Nakamura, Y., Tamiya, E. RNA aptamer-based optical nanostructured sensor for highly sensitive and label-free detection of antigen-antibody reactions // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2010. – V. 396. – N 7. – P. 2575-2581.
69. Jiang, Y., Zhu, C., Ling, L., Wan, L., Fang, X., Bai, C. Specific aptamer-protein interaction studied by atomic force microscopy // *Anal. Chem.* – 2003. – V. 75. – N 9. – P. 2112-2116.
70. Wang, J., Lv, R., Xu, J., Xu, D., Chen, H. Characterizing the interaction between aptamers and human IgE by use of surface plasmon resonance // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2008. – V. 390. – N 4. – P. 1059-1065.
71. Wang, Z., Wilkop, T., Xu, D., Dong, Y., Ma, G., Cheng, Q. Surface plasmon resonance imaging for affinity analysis of aptamer-protein interactions with PDMS microfluidic chips // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2007. – V. 389. – N 3. – P. 819-825.
72. Wang, J., Munir, A., Li, Z., Zhou, H. Aptamer-Au NPs conjugates-enhanced SPR sensing for the ultrasensitive sandwich immunoassay // *Biosens. Bioelectron.* – 2009. – V. 25. – N 1. – P. 124-129
73. Kim, Y., Kim, J., Han, S., Sim, S. Aptamer biosensor for label-free detection of human

- immunoglobulin E based on surface plasmon resonance // *Sensor. Actuat. B Chem.* – 2009. – V. 139. – N 2. – P. 471-475.
74. Kim, S., Lee, J., Lee, S., Lee, H. Ultra-sensitive detection of IgE using biofunctionalized nanoparticle-enhanced SPR // *Talanta.* – 2010. – V. 8. – N 4-5. – P. 1755-1759.
75. Sim, H., Wark, A., Lee, H. Attomolar detection of protein biomarkers using biofunctionalized gold nanorods with surface plasmon resonance // *Analyst.* – 2010. – V. 135. – N 10. – P. 2528-2532.
76. Wang, J., Zhu, Z., Munir, A., Zhou, H. Fe₃O₄ nanoparticles-enhanced SPR sensing for ultrasensitive sandwich bio-assay // *Talanta.* – 2011. – V. 84. – N 3. – P. 783-788.
77. Wu, Z., Lu, H., Liu, X., Hu, R., Zhou, H., Shen, G., Yu, R. Inhibitory effect of target binding on hairpin aptamer sticky-end pairing-induced gold nanoparticle assembly for light-up colorimetric protein assay // *Anal. Chem.* – 2010. – V. 82. – N 9. – P. 3890-8389.
78. Chang, C., Chen, C., Zhao, X., Wu, T., Wei, S., Lin, C. Label-free colorimetric aptasensor for IgE using DNA pseudoknot probe // *Analyst.* – 2014. – V. 139. – N 13. – P. 3347-3351.
79. Pollet, J., Strych, U., Willson, R.C. A peroxidase-active aptazyme as an isothermally amplifiable label in an aptazyme-linked oligonucleotide assay for low-picomolar IgE detection // *Analyst.* – 2012. – V. 137. – N 24. – P. 5710-5712.
80. Jiang, Y., Fang, X., Bai, C. Signaling aptamer/protein binding by a molecular light switch complex // *Anal. Chem.* – 2004. – V. 76. – N 17. – P. 5230-5235.
81. Gokulrangan, G., Unruh, J., Holub, D., Ingram, B., Johnson, C., Wilson, G. DNA aptamer-based bioanalysis of IgE by fluorescence anisotropy // *Anal. Chem.* – 2005. – V. 77. – N 7. – P. 1963-1970.
82. Wang, H.-Q., Wu, Z., Tang, L.-J., Yu, R.-Q., Jiang, J.-H. Fluorescence protection assay: a novel homogeneous assay platform toward development of aptamer sensors for protein detection // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – V. 39. – N 18. – P. 122.
83. Feng, K., Kong, R., Zhang, S., Qu, F. A universal amplified strategy for aptasensors: enhancing sensitivity through allostery-triggered enzymatic recycling amplification // *Biosens. Bioelectron.* – 2012. – V. 38. – N 1. – P. 121-125.
84. He, J.-L., Wu, Z.-S., Zhang, S.-B., Shen, G.-L., Yu, R.-Q. Novel fluorescence enhancement IgE assay using a DNA aptamer // *Analyst.* – 2009. – V. 134. – N 5. – P. 1003-1007.
85. Wu, Z.-S., Hu, P., Zhou, H., Shen, G., Yu, R. Fluorescent oligonucleotide probe based on G-quadruplex scaffold for signal-on ultrasensitive protein assay // *Biomaterials.* – 2010. – V. 31. – N 7. – P. 1918-1924.

86. Stadtherr, K., Wolf, H., Lindner, P. An aptamer-based protein biochip // *Anal. Chem.* – 2005. – N 77. – P. 3437-3443.
87. Cho, E., Collett, J., Szafranska, A., Ellington, A. Optimization of aptamer microarray technology for multiple protein targets // *Analyt. Chim. Acta.* – 2006. – V. 564. – N 1. – P. 82-90.
88. Wei, X., Li, H., Li, Z., Vuki, M., Fan, Y., Zhong, W., Xu, D. Metal-enhanced fluorescent probes based on silver nanoparticles and its application in IgE detection // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – V. 402. – N 3. – P. 1057-1063.
89. Hu, K., Yang, H., Zhou, J., Zhao, S., Tian, J. Aptasensor for amplified IgE sensing based on fluorescence quenching by graphene oxide // *Luminescence.* – 2013. – V. 28. – N 5. – P. 662-666.
90. Peng, Q., Cao, Z., Lau, C., Kai, M., Lu, J. Aptamer-barcode based immunoassay for the instantaneous derivatization chemiluminescence detection of IgE coupled to magnetic beads // *Analyst.* – 2011. – V. 136. – N 1. – P. 140-147.
91. Li, H., Qiang W., Vuki, M., Xu, D., Chen H.-Y. Fluorescence enhancement of silver nanoparticle hybrid probes and ultrasensitive detection of IgE // *Anal. Chem.* – 2011. – V. 83. – N 23. – P. 8945-8952.
92. Sun, Y., Cai, S., Cao, Z., Lau, C., Lu, J. Aptameric system for the highly selective and ultrasensitive detection of protein human serum based on non-stripping gold nanoparticles. // *Analyst.* – 2011. – V. 136. – N 20. – P. 4144-4151.
93. Wang, Y., Xu, D., Chen, H.Y. Aptamer-based silver nanosensor for multiple protein detection // *Lab Chip.* – 2012. – N 12. – P. 3184-3189.
94. Kim, J.P., Park, C.H., Sim, S.J. Aptamer Biosensors for Label-Free Colorimetric Detection of Human IgE Based on Polydiacetylene (PDA) Supramolecules // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2011. – V. 11. – N 5. – P. 4269-4274.
95. Kim, J.P., Kwon, I.K., Sim, S.J. The strategy of signal amplification for ultrasensitive detection of hIgE based on aptamer-modified poly(di-acetylene) supramolecules // *Biosens. Bioelectron.* – 2011. – V. 26. – N 12. – P. 4823-4827.
96. Xu, D., Xu, D., Yu, X., Liu, Z., He, W., Ma, Z. Label-free electrochemical detection for aptamer-based array electrodes // *Anal. Chem.* – 2005. – V. 77. – N 16. – P. 5107-5113.
97. Tran, D., Vermeeren, V., Grieten, L., Wenmackers, S., Wagner, P., Pollet, J., Janssen, K., Michiels, L., Lammertyn, J. Nanocrystalline diamond impedimetric aptasensor for the label-free detection of human IgE // *Biosens. Bioelectron.* – 2011. – V. 26. – N 6. – P. 2987-2993.

98. Wu, Z.-S., Zheng, F., Shen, G., Yu, R.-Q. A hairpin aptamer-based electrochemical biosensing platform for the sensitive detection of proteins // *Biomaterials*. – 2009. – V. 30. – N 15. – P. 2950-2955.
99. Li, H., Wang, C., Wu, Z., Lu, L., Qiu, L., Zhou, H., Shen, G., Yu, R. An electronic channel switching-based aptasensor for ultrasensitive protein detection // *Anal. Chim. Acta*. – 2013. – V. 758. – P. 130-137.
100. Xiao, Y., Uzawa, T., White, R., DeMartini, D., Plaxco, K. On the signaling of electrochemical aptamer-based sensors: Collision- and folding-based mechanisms // *Electroanalysis*. – 2009. – V. 11. – P. 1267-1271.
101. Lee, C.-Y., Wu, K.-Y., Su, H.-L., Hung, H.-Y., Hsieh, Y.-Z. Sensitive label-free electrochemical analysis of human IgE using an aptasensor with cDNA amplification // *Biosens. bioelectron.* – 2009. – V. 39. – N 1. – P. 133-138.
102. Cao, J., Wang, H., Liu, Y. Petal-like CdS nanospheres-based electrochemiluminescence aptasensor for detection of IgE with gold nanoparticles amplification // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2015. – V. 151. – P. 274-279.
103. Wang, Y., Cui, M., Jiao, M., Luo, X. Antifouling and ultrasensitive biosensing interface based on self-assembled peptide and aptamer on macroporous gold for electrochemical detection of immunoglobulin E in serum // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2018. – V. 410. – N 23. – P. 5871-5878.
104. Jiang, B., Li, F., Yang, C., Xie, J., Xiang, Y., Yuan, R. Aptamer pseudoknot-functionalized electronic sensor for reagentless and single-step detection of immunoglobulin e in human serum // *Anal. Chem.* – 2015. – V. 87. – N 5. – P. 3094-3098.
105. Wang, J., Munir, A., Li, Z., Zhou, H. Aptamer-Au NPs conjugates-accumulated methylene blue for the sensitive electrochemical immunoassay of protein. // *Talanta*. – 2010. – V. 81. – N 1-2. – P. 63-67.
106. Feng, K., Kang, Y., Zhao, J.-J., Liu, Y.-L., Jiang, J.-H., Shen, G.-L., Yu, R.-Q. Electrochemical immunosensor with aptamer-based enzymatic amplification // *Anal. Biochem.* – 2008. – V. 378. – N 1. – P. 38-42.
107. Salimi, A., Khezrian, S., Hallaj, R., Vaziry, A. Highly sensitive electrochemical aptasensor for immunoglobulin e detection based on sandwich assay using enzyme-linked aptamer // *Anal. Biochem.* – 2014. – V. 466. – P. 89-97.
108. Nam, E., Kim, E., Wark, A., Rho, S., Kim, H., Lee, H. Highly sensitive electrochemical detection of proteins using aptamer-coated gold nanoparticles and surface enzyme reactions // *Analyst*. – 2012. – V. 137. – N 9. – P. 2011-2016.

109. Khezrian, S., Salimi, A., Teymourian, H., Hallaj, R. Label-free electrochemical IgE aptasensor based on covalent attachment of aptamer onto multiwalled carbon nanotubes/ionic liquid/chitosan nanocomposite modified electrode // *Biosens. Bioelectron.* – 2013. – V. 43. – N 1. – P. 218-225.
110. Song, W., Li, H., Liu, H., Wu, Z., Qiang, W., Xu, D. Fabrication of streptavidin functionalized silver nanoparticle decorated graphene and its application in disposable electrochemical sensor for immunoglobulin E // *Electrochem. Commun.* – 2013. – V. 31. – P. 16-19.
111. Luo, X., Lee, I., Huang, J., Yun, M., Cui, X. Ultrasensitive protein detection using an aptamer-functionalized single polyaniline nanowire. // *Chem. Commun. (Camb).* – 2011. – V. 47. – N 22. – P. 6368-6370.
112. Huang, J., Luo, X., Lee, I., Hu, Y., Cui, X., Yun, M. Rapid real-time electrical detection of proteins using single conducting polymer nanowire-based microfluidic aptasensor // *Biosens. Bioelectron.* – 2011. – V. 30. – N 1. – P. 306-309.
113. Kim, J.P., Hong, S., Sim, S.J. Apta-Biosensors for Nonlabeled Real Time Detection of Human IgE Based on Carbon Nanotube Field Effect Transistors // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2011. – V. 11. – N 5. – P. 4182-4187.
114. Ding, S., Gao, C., Gu, L.-Q. Capturing single molecules of immunoglobulin and ricin with an aptamer-encoded glass nanopore. // *Anal. Chem.* – 2009. – V. 81. – N 16. – P. 6649-6655.
115. Maehashi, K., Matsumoto, K. Label-free electrical detection using carbon nanotube-based biosensors // *Sensors.* – 2009. – V. 9. – N 7. – P. 5368-5378.
116. Ohno, Y., Maehashi, K., Matsumoto, K. Label-free biosensors based on aptamer-modified graphene field-effect transistors. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – V. 132. – N 51. – P. 18012-18013.
117. Maehashi, K., Katsura, T., Kerman, K., Takamura, Y., Matsumoto, K., Tamiya, E. Label-free protein biosensor based on aptamer-modified carbon nanotube field-effect transistors // *Anal. Chem.* – 2007. – V. 79. – N 2. – P. 782-787.
118. German, I., Buchanan, D.D., Kennedy, R.T. Aptamers as ligands in affinity probe capillary electrophoresis // *Anal. Chem.* – 1998. – V. 70. – N 21. – P. 4540-4545.
119. Cheow, L.F., Han, J. Continuous signal enhancement for sensitive aptamer affinity probe electrophoresis assay using electrokinetic concentration // *Anal. Chem.* – 2011. – V. 83. – N 18. – P. 7086-7093.
120. Hecht, A., Sommer, G., Durland, R., Yang, X., Singh, A., Hatch, A. Aptamers as affinity reagents in an integrated electrophoretic lab-on-a-chip platform // *Anal. Chem.* – 2010. –

- V. 82. – N 21. – P. 8813-8820.
121. Liss, M., Petersen, B., Wolf, H., Prohaska, E. An aptamer-based quartz crystal protein biosensor // *Anal. Chem.* – 2002. – V. 74. – N 17. – P. 4488-4495.
 122. Yao, C., Qi, Y., Zhao, Y., Xiang, Y., Chen, Q., Fu, W. Aptamer-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE // *Biosens. Bioelectron.* – 2009. – V. 24. – N 8. – P. 2499-2503.
 123. Yao, C., Zhu, T., Qi, Y., Zhao, Y., Xia, H., Fu, W. Development of a Quartz Crystal Microbalance Biosensor with Aptamers as Bio-recognition Element // *Sensors.* – 2010. – V. 10. – N 6. – P. 5859-5871.
 124. Snejdárková, M., Svobodová, L., Polohová, V., Hianik, T. The study of surface properties of an IgE-sensitive aptasensor using an acoustic method // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2009. – V. 390. – N 4. – P. 1087-1091.
 125. Amarasekera M. Immunoglobulin E in health and disease // *Asia Pac. Allergy.* – 2011. – V. 1. – P. 12.
 126. Prabowo, B.A., Purwidyantri, A., Liu, K.C. Surface Plasmon Resonance Optical Sensor: A Review on Light Source Technology // *Biosensors.* – 2018. – V. 8. – N 3.
 127. El-Sagheer, A., Sanzone, A., Gao, R., Tavassoli, A., Brown, T. Biocompatible artificial DNA linker that is read through by DNA polymerases and is functional in *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2011. – V. 108. – N 28. – P. 11338-11343.
 128. Borer, P. Optical properties of nucleic acids, absorption, and circular dichroism spectra // *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* / Ed. D. Fasman. - CRC Press, 1975. – V.1. – P. 589.
 129. Fitzwater, T., Polisky, B. A SELEX primer // *Meth. Enzymol.* - 1996. - V. 267. - P. 275-301.
 130. Panitch, H.S., Hooper, C.J., Johnson, K.P. CSF Antibody to Myelin Basic Protein: Measurement in Patients With Multiple Sclerosis and Subacute Sclerosing Panencephalitis // *Arch. Neurol.* – 1980. – V. 37. – P. 206-209.
 131. Berger, T., Rubner, P., Schautzer, F., Egg, R., Ulmer, H., Mayringer, I., Dilitz, E., Deisenhammer, F., Reindl, M. Antimyelin Antibodies as a Predictor of Clinically Definite Multiple Sclerosis after a First Demyelinating Event // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – V. 349. – N 2. – P. 139-145.
 132. Rauer, S., Euler, B., Reindl, M., Berger, T. Antimyelin antibodies and the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* – 2006. – V. 77. – N 6. – P. 739-142.
 133. Tomassini, V., De Giglio, L., Reindl, M., Russo, P., Pestalozza, I., Pantano, P., Berger,

- T., Pozzilli, C. Anti-myelin antibodies predict the clinical outcome after a first episode suggestive of MS // *Mult. Scler.* – 2007. – V. 13. – N 9. – P. 1086-1094.
134. Derkus, B., Emregul, E., Yucesan, C., Cebesoy Emregul K. Myelin basic protein immunosensor for multiple sclerosis detection based upon label-free electrochemical impedance spectroscopy // *Biosens. Bioelectron.* – 2013. – V. 46. – P. 53-60.
135. Chamczuk, A., Ursell, M., O'Connor, P., Jackowski, G., Moscarello, M. A rapid ELISA-based serum assay for myelin basic protein in multiple sclerosis // *J. Immunol. Methods.* – 2002. – V. 262. – N 1-2. – P. 21-27.
136. Nevinsky, G.A. Autoimmune Processes in Multiple Sclerosis: Production of Harmful Catalytic Antibodies Associated with Significant Changes in the Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Proliferation // In: *Trending Topics in Multiple Sclerosis.* – Ed. A. Gonzalez-Quevedo. – InTech. - 2015. – P. 99-147, doi 10.5772/63824.
137. Ponomarenko, N., Durova, O., Vorobiev, I., Belogurov, A., Kurkova, I., Petrenko, A., Telegin, G., Suchkov, S., Kiselev, S., Lagarkova, M., Govorun, V., Serebryakova, M., Avale, B., Tornatore, P., Karavanov, A., Morse H., Thomas, D., Friboulet, A., Gabibov A. Autoantibodies to myelin basic protein catalyze site-specific degradation of their antigen // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2006. – V. 103. – N 2. – P. 281-286.
138. Kuhle, J., Pohl, C., Mehling, M., Edan, G., Freedman, M., Hartung, H., Polman, C., Miller, D., Montalban, X., Barkhof, F., Bauer, L., Dahms, S., Lindberg, R., Kappos, L., Sandbrink, R. Lack of Association between Antimyelin Antibodies and Progression to Multiple Sclerosis // *N. Engl. J. Med.* – 2007. – V. 356. – N 4. – P. 371-378.
139. Wenzel, K., Schulze-Rothe, S., Müller, J., Wallukat, G., Haberland, A. Difference between beta1-adrenoceptor autoantibodies of human and animal origin—Limitations detecting beta1-adrenoceptor autoantibodies using peptide based ELISA technology // *PLoS One.* – 2018. – V. 13. – N 2.
140. Lee, S., Sullenger, B. Isolation of a nuclease-resistant decoy RNA that can protect human acetylcholine receptors from myasthenic antibodies // *Nat. Biotechnol.* – 1997. – V. 15. – P. 41-45.
141. Behlke, M.A. Chemical modification of siRNAs for *in vivo* use // *Oligonucleotides.* – 2008. – V. 18. – N 4. – P. 305-319.
142. Тиванова, А.С. Безуглова, А.М. Фокина А.А. РНК-аптамеры как перспективные средства диагностики и лечения рассеянного склероза. 2010.
143. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31. – N 13. – P. 3406-3415.
144. Hall, K.B., Kranz, J.K. Nitrocellulose filter binding for determination of dissociation

- constants // *Methods Mol. Biol.* – 1999. – V. 118. – P. 105-114.
145. Jing, M., Bowser, M.T. Methods for measuring aptamer-protein equilibria: A review // *Anal. Chim. Acta.* – 2011. – V. 686. – N 1-2. – P. 9-18.
 146. Sharma, T.K., Bruno, J.G., Dhiman, A. ABCs of DNA aptamer and related assay development // *Biotechnology Advances.* – 2017. – V. 35. – N 2. – P. 275-301.
 147. Kalra, P., Dhiman, A., Cho, W., Bruno, J., Sharma, T. Simple methods and rational design for enhancing aptamer sensitivity and specificity // *Front. Mol. Biosci.* – 2018. – V. 5. – P. 41.
 148. Vorobyeva, M., Davydova, A., Vorobjev, P., Pyshnyi, D., Venyaminova, A. Key aspects of nucleic acid library design for in vitro selection // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – V. 19. – N 2.
 149. Hansen, A., Hiepe, F., Dörner, T. Developments in lupus 2006 // *Arthritis Res. Ther.* – 2007. – V. 9. – N 4.
 150. Bezuglova, A., Konenkova, L., Doronin, B., Buneva, V., Nevinsky, G. Affinity and catalytic heterogeneity and metal-dependence of polyclonal myelin basic protein-hydrolyzing IgGs from sera of patients with systemic lupus erythematosus // *J. Mol. Recognit.* – 2011. – V. 24. – N 6. – P. 960-974.
 151. Sassolas, A., Blum, L.J., Leca-Bouvier, B.D. Optical detection systems using immobilized aptamers. // *Biosens. Bioelectron.* – 2011. – V. 26. – N 9. – P.3725-3736.
 152. Wang, G., Wang, Y., Chen, L., Choo, J. Nanomaterial-assisted aptamers for optical sensing // *Biosens. Bioelectron.* – 2010. – V. 25. – N 8. – P.1859-1868.
 153. Iliuk, A.B., Hu, L., Tao, W.A. Aptamer in Bioanalytical Applications // *Anal. Chem.* – 2011. – V. 83. – N 12. – P.4440-4452.
 154. Markova, S. V., Vysotski, E. S., Blinks, J. R., Burakova, L. P., Wang, B-C., Lee, J. Obelin from the bioluminescent marine hydroid *Obelia Geniculata*: cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca^{2+} -regulated photoproteins // *Biochemistry* – 2002. – V. 41. – N 7. – P.2227-2236.
 155. Liu, Z., Vysotski, E., Vysotski, E., Chen, C., Rose, J., Lee, J., Wang, B. Structure of the Ca^{2+} -regulated photoprotein obelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure // *Protein Sci.* – 2000. – V. 9. – N 11. – P.2085-2093.
 156. Frank, L.A., Borisova, V. V., Vysotski, E.S. Calcium-regulated photoprotein Obelin as a label in immunoassay: An outlook for applications // *Bioluminescence and Chemiluminescence: Progress and Perspectives* (Tsuji, A., Matsumoto, M., Maeda, M., Kricka, L.J., and Stanley, P.E.). World Scientific Publishing Co., 2005. P. 463–466.
 157. Frank, L.A., Petunin, A.I., Vysotski, E.S. Conjugates of the Ca^{2+} -regulated photoprotein

- obelin with immunoglobulins: Synthesis and use as labels in bioluminescent immunoassay // *Bioorg. Khim.* – 2004. – V. 30. – N 4. – P.327-331.
158. Frank, L.A., Illarionova, V.A., Vysotski, E.S. Use of proZZ-obelin fusion protein in bioluminescent immunoassay // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – V. 219. – N 2. – P.475-479.
 159. Frank, L.A. Recent trends and advancements in bioassay based on bioluminescent technologies // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* – 2015. – V. 18. – N 10. – P.918.
 160. Illarionov, B., Frank, L., Illarionova, V., Bondar, V., Vysotski, E., Blinks, J. Recombinant obelin: Cloning and expression of cDNA, purification, and characterization as a calcium indicator // *Methods Enzymol.* – 2000. – V. 305. – P.223-249.
 161. Krasitskaya, V., Burakova, L., Komarova, A., Bashmakova, E., Frank, L. Mutants of Ca²⁺-regulated Photoprotein Obelin for Site-specific Conjugation // *Photochem. Photobiol.* – 2017. – V. 93. – N 2. – P.553-557.
 162. Frank, L.A., Petunin, A.I., Vysotski, E.S. Bioluminescent immunoassay of thyrotropin and thyroxine using obelin as a label // *Anal. Biochem.* – 2004. – V. 325. – N 2. – P. 240-246.
 163. Krasitskaya, V., Burakova, L., Pyshnaya, I., Frank, L. Bioluminescent reporters for identification of gene allelic variants // *Bioorg. Khim.* – 2012. – V. 38. – N 3. – P. 298-305.
 164. Frank, L., Markova, S., Remmel, N., Vysotski, E., Gitelson, I. Bioluminescent signal system: Bioluminescence immunoassay of pathogenic organisms // *Luminescence.* – 2007. – V. 22. – N 3. – P. 215-220.
 165. Bashmakova, E., Krasitskaya, V., Bondar, A., Kozlova, A., Ruksha, T., Frank, L. Bioluminescent assay to detect melanocortin-1 receptor (MC1R) polymorphisms (R160W, R151C, and D294H) // *Mol. Biol. (Mosk).* – 2015. – V. 49. – N 6. – P. 953-958.
 166. Bashmakova, E., Krasitskaya, V., Bondar, A., Kozlova, A., Ruksha, T., Frank, L. A bioluminescent assay for detecting melanocortin-1 receptor (MC1R) gene polymorphisms R160W, R151C, and D294H // *Mol. Biol. (Mosk).* – 2015. – V. 49. – N 6. – P. 852-857.
 167. Bashmakova, E., Krasitskaya, V., Zamay, G., Zamay, T., Frank, L. Bioluminescent aptamer-based solid-phase microassay to detect lung tumor cells in plasma // *Talanta.* – 2019. – V. 199. – P. 674-678.
 168. Krasitskaya, V., Korneeva, S., Kudryavtsev, A., Markova, S., Stepanyuk, G., Frank, L. Ca²⁺-triggered coelenterazine-binding protein from *Renilla* as an enzyme-dependent label for binding assay // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – V. 401. – N 8. – P. 2573-2579.
 169. Zhou, W., Jimmy Huang, P., Ding, J., Liu, J. Aptamer-based biosensors for biomedical

- diagnostics // *Analyst*. – 2014. – V. 139. – N 11. – P. 2627-2640.
170. Shigdar, S., Macdonald, J., O'Connor, M., Wang, T., Xiang, D., Shamaileh, H., Qiao, L., Wei, M., Zhou, S., Zhu, Y., Kong, L., Bhattacharya, S., Li, C., Duan, W. Aptamers as theranostic agents: Modifications, serum stability and functionalisation // *Sensors (Basel)*. – 2013. – V. 13. – N 10. – P. 13624-13637.
171. Polman, C., Reingold, S., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A., Waubant, E., Weinshenker, B., Wolinsky, J. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria // *Ann. Neurol.* – 2011. – V. 69. – N 2. – P. 292-302.
172. Zweig, M.H., Campbell, G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: A fundamental evaluation tool in clinical medicine // *Clin. Chem.* – 1993. – V. 39. – N 4. – P. 561-577.
173. Mumford, D.B. ROC analysis // *Br. J.Psychiatry*. – 1990. – V. 157. – N 8. – P. 301.
174. Fawcett, T. An introduction to ROC analysis // *Pattern Recognit. Lett.* – 2006. – V. 27. – N 8. – P. 861-874.

Приложения

Приложение 1. Последовательности рандомизированных участков клонов после 10 раундов отбора (данные получены Фокиной А. А. и Поповецкой А. С.)

I-1 CACGGTAGCGAGGTGCTCTCATTGGGAAGTTGGGTTGAGA
I-2 GCCACGGAGTTTAGGTTCCATGTTTCCGCTGTATGACGAT
I-3 GGCAGCACCCGAACGAGAGCGCGAGACTGAGGATTGCCCT
I-4 GCGGCAGGATCAGGAATTGATTAGAAGTTCTTACTCCGTT
I-5 GCGCACCAAGCTCGTGGCCTCGGTTGAGGTGAATGCCAAA
I-6 CACATGTCTTAGCATGCTCGTTACACTTTCGGCGAGAACT
I-7 CAGGGCTGCGACCGAACCTGACTGAACAGGTTACATCGAA
I-8 GCCAGGAGAGCTAGGTGAGGGACACGTTTCATGGCCGGGCA
I-9 GGGCGAATGATTCAGCGCCAATAGCACATGTCGTTGGCTA
I-10 GCCCAGAAGCCAAGCTAAGGCGATGTGAAACCTTTGGCTG
I-11 GCCAAAGTGGTTCGGCACAAAATCTGCTACGGTGCTGATA
I-12 GCCAACCAACGGGACAACATTGCTGATCGAACATGGATGA
I-13 GGGACTACAGTGCCATGACGGTTAGCGTATGTGTTTAGGT
I-14 GGGAGTGTGAACATGCGCGGTTGACGTATGGTTGGTGCTT
II-1 GCACGGGCAGGGGATACGAGTGACGTTGGCGTCAACACTA
II-2 CAGGGGAGAGGATAATGTTTCAGCTAGACCGGGCTTCAATC
II-3 TGGGTAAACGAGGGTGGGGCAGAGATGTA CT CAGAAAACA
II-4 CACGATAGTGGTGAGGCCGGGGCATGTGTGGGTATGCTTAA
II-5 CAGGGTGAACAAGGGTGGGGCAGAGATGTA CT CAGAAAACA
II-6 GGGGGCATACTGGAAACTCAGCTTGCCTTCAAGCTCTGA
II-7 GGCACACTGGTTTCTACGTGCAAAAGTCACAGTTTAATGA
II-8 GGCAGCACCCGAACGAGGAGCGCGAGACTGAGGATTGCCCT
II-9 GGGGTAAACAAGGGTGGGGCAGAGATGTA CT CAGAAAACA
II-10 CACGGAACAACAAGCAGGTTACGCGACTCTTCGGTGCTAC
II-11 CGGGTAGACAAGGGTGGGGCAGAGATGTA CT CAGAAAACA
II-12 GGGCAACACGGAGACGACGAGCGTGCTATGTTGCTACTCA
II-13 GGCACGAACCGAAGAGGTTGAGAAGACCTCGGTGGCTTCA
II-14 GGGCACGAGCCACACCAGCAGATGTTTCGGCTCATCACTTG
II-15 GGCACGAGCAGCTGAGAAGGCAGAGAAAGAAGTCGAACGAT
III-1 GGCATAATGAGCCACAGGTTGGAAGTATTGCTTCACTTGG
III-2 GCTCGAGCTAGGCTGTGCATTCGCAACCACTCACATCGAA
III-3 GGCACGCGGAAAGACGACGAGCCGTGGCATCGTAGCTCAA
III-4 GGGAGGGGAGTAGCTTTTCCGATGGAGACTGAATGCTCCA
III-5 GCGGGGGCCGCGGCAGGCATGAACGATGCAACTCATCAGA
III-6 CGGGTAAACAAGGGTGGGGCAGAGATGTA CT CAGAAAACA
III-7 TGGGTAAACAAGGGTGGGGCAGAGATGTA CT CAGAAAACA
III-8 GCCAAGCAGTGGGACGGGCAATGACTTCGGAAAGTCGATC
III-9 GGCAGCACCCGAACGAGGAGCGCGAGACTGAGGATTGCCCT
III-10 CACGGGCATAGTGGTGACAACCAACGTCAACTACGCGTTT
III-11 CAGGGACGAACGAGCACGGTGACCTCCGTTTGGTTCGCTTA

III-12 GCCAGGAATCAGCGGCATTGAGCATACTGGCTCCTTACTT
III-13 GGCAGCAGCGAGCGCGGCATCGTCCACCTTCGGGCTGATC
III-14 GGGACAACAATCACTGGGCCGAAACGCCACTATTCTCGTG
III-15 GCCACAACGCGAAAAGAATCGACTGAGGTGGTCGCCGAT

Приложение 2. Последовательности индивидуальных 2'-F-РНК аптамеров, полученных после 12 раундов отбора

Шифр	Сиквенс 5'→3'	Встречаемость, %
12-1	GGGAGGACGAUGCGG C CCAUCGAAUJUCGCUACAUGCCCUUCUUCGGUGCCCCG CAGACGACUCGCGCGA	3,8
12-2	GGGAGGACGAUGCGG UC AAUJACCUGAGAGCAGGAGUACAAUCUUGGCCGCGUG CAGACGACUCGCGCGA	1,6
12-3	GGGAGGACGAUGCGG UUGAGCUCGAUGCCACGGCUCGUCUCUJUCGCGUGCCC CAGACGACUCGCGCGA	1,2
12-4	GGGAGGACGAUGCGG AGGGCAAUCCUCAGUCUCGCGCUCUCCUGUUCGGGUGCUGCC CAGACGACUCGCGCGA	0,6
12-5	GGGAGGACGAUGCGG CCUUUCUCAAUJCGCCCGUACAGCGCCAUCGAUUCGCGCG CAGACGACUCGCGCGA	0,5
12-6	GGGAGGACGAUGCGG UGUUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUCGUUUACCCA CAGACGACUCGCGCGA	0,5
12-7	GGGAGGACGAUGCGG UGUUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUUGUUUACCCG CAGACGACUCGCGCGA	0,4
12-8	GGGAGGACGAUGCGG AUGAUCGGUGCUGAUCGUGCGCGCUCGUGGCUUGGCC CAGACGACUCGCGCGA	0,4
12-9	GGGAGGACGAUGCGG UAGCUCUGGUGACGGCGAAUCGAUUGAUGUCGUUCUUG CAGACGACUCGCGCGA	0,3
12-10	GGGAGGACGAUGCGG GACCUCUGUGGAUJUCGGUCCAUCAGGACCCCUUCUCUG CAGACGACUCGCGCGA	0,3
12-11	GGGAGGACGAUGCGG UCCAAGCGCAGUGGCACUUGGCACUACUUCGCCGUGUGUG CAGACGACUCGCGCGA	0,3
12-12	GGGAGGACGAUGCGG CCUUUCUCAAUJUGGCCGUAACAGCGCCAUCGAUUCGCGCG CAGACGACUCGCGCGA	0,3
12-13	GGGAGGACGAUGCGG UGUUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUUGUUCACCCUG CAGACGACUCGCGCGA	0,3
12-14	GGGAGGACGAUGCGG AAUCUCGAAGUUCUUAUACUACACUACGUACGCCGUG CAGACGACUCGCGCGA	0,3
12-15	GGGAGGACGAUGCGG UGUUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUUGUUUACCC CAGACGACUCGCGCGA	0,2
12-16	GGGAGGACGAUGCGG UUGAUCGGUGGUCACUGCUCGUCGUAUUGUCUCGUGCC CAGACGACUCGCGCGA	0,2
12-17	GGGAGGACGAUGCGG UUGAUCGGUGGUCACUGCUCGUCGUAUUGUCUCGUGCC CAGACGACUCGCGCGA	0,1
12-18	GGGAGGACGAUGCGG AAAGCAACGAGUGACAGCUCACACCGCUUGGUCUGUGCC CAGACGACUCGCGCGA	0,1
12-19	GGGAGGACGAUGCGG UGUUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUCGUUUACCC CAGACGACUCGCGCGA	0,1
12-20	GGGAGGACGAUGCGG UCAUCGACGUGUGGUGACTUGGCUACGUUCCUGCCGUGUG CAGACGACUCGCGCGA	0,1
12-21	GGGAGGACGAUGCGG AAUGAUCGAGUUCGUUCGUUCUCAUCGGCUAUCCAUGGC CAGACGACUCGCGCGA	0,1
12-22	GGGAGGACGAUGCGG UGUUUUCUGAGUACAUCUCUGCCCCACCCUCGUUUACCC CAGACGACUCGCGCGA	0,1
12-23	GGGAGGACGAUGCGG AUUCGAUGAGCCUGCCUCGACCAACCCGCUUCCUGUGGC CAGACGACUCGCGCGA	0,1
12-24	GGGAGGACGAUGCGG UC AAUJACCUGAGAGCAGGAGUACAAUCUUGGCCGUGUG CAGACGACUCGCGCGA	0,1