

Ю. Е. ГЛАЗЫРИН, А. С. КИЧКАЙЛО

АПТАМЕРЫ — МОЛЕКУЛЯРНЫЕ «КЛЮЧИ» МЕДИЦИНЫ

Диагностические и терапевтические
олигонуклеотиды из Сибири

Как добиться технологического лидерства в медицинской сфере? В погоне за быстрым результатом гораздо проще, надежнее и дешевле брать за основу зарубежные, уже работающие прототипы, но при таком подходе лидерство недостижимо. Нужно отдавать себе отчет, что даже новые лекарства, медицинские сенсоры и другие высокотехнологичные изделия, по сути, уже устарели, так как были разработаны как минимум 10–20 лет назад. А поскольку частные компании, особенно фармацевтические, практически не рискуют связываться с инновационными продуктами, все новое у нас автоматически обречено на ожидание. Есть ли у нас шанс прервать этот порочный круг или мы так и будем ждать и догонять? Однозначный ответ на этот вопрос есть у молодого исследовательского коллектива Красноярского научного центра СО РАН, который занимается разработкой новых диагностических и терапевтических средств на основе аптамеров — «синтетических антител», созданных с помощью ДНК-технологий

Ключевые слова: олигонуклеотиды, антитела, аптамеры, селекция аптамеров, SELEX, биосенсоры, диагностика, терапия, Красноярский научный центр СО РАН.

Key words: oligonucleotides, antibodies, aptamers, aptamer selection, SELEX, biosensors, diagnostics, therapy, Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS

Клетки глиальной опухоли мозга человека помечены аптамером с флуоресцентной меткой, светящейся красным цветом при УФ-облучении (длина волны 410 нм). Клеточные ядра окрашены синим

В публикации использованы фото
Т. Филимоновой и Д. Вепринцева



ГЛАЗЫРИН Юрий Евгеньевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории цифровых управляемых лекарств и тераностики Красноярского научного центра СО РАН, научный сотрудник лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого. Автор и соавтор 49 научных работ и 3 патентов



КИЧКАЙЛО Анна Сергеевна — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник и заведующая лабораторией цифровых управляемых лекарств и тераностики Красноярского научного центра СО РАН, руководитель лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого. Автор и соавтор более 150 научных работ и 14 патентов

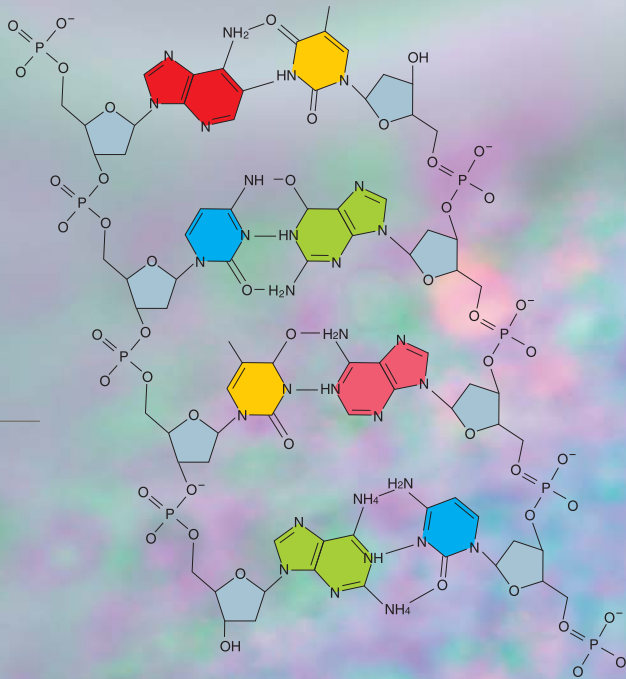
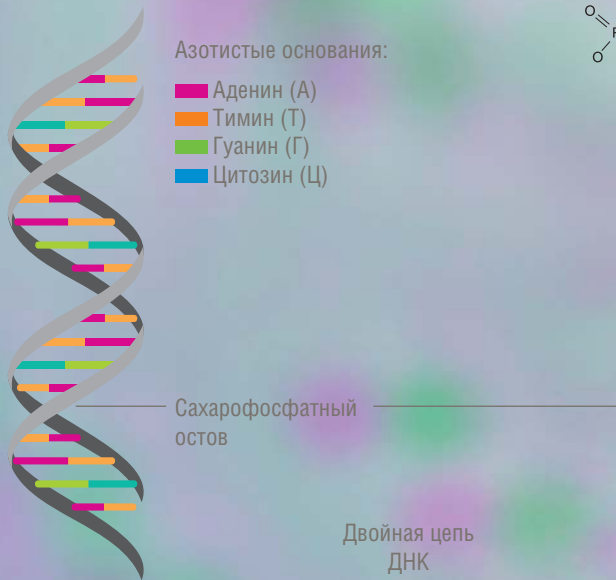
© Ю. Е. Глазырин, А. С. Кичкайло, 2025

Почему многоклеточный организм работает как одно целое? Как общаются клетки между собой? С тех пор, как сформировалась наука биохимия, стало ясно, что все в живом организме основано на взаимодействии молекул. Встреча двух особенных молекул может запустить необходимые для жизни реакции, например ускорить клеточный рост или, наоборот, заставить ненужные клетки умереть.

Такая взаимодействующая пара, которая образует молекулярный комплекс аналогично соединению «папа — мама» в электротехнике, состоит из молекул двух типов: «сигнального» *лиганда* и «принимającego» *рецептора*. Эти молекулы могут быть закреплены на поверхности клеток, находиться внутри них либо свободно распространяться в межклеточной среде и таких биологических жидкостях, как кровь и лимфа.

Рецепторные молекулы и некоторые лиганды представляют собой *белки* — длинные полимерные цепочки, состоящие из аминокислот 20 видов, составленных в ряд в самых различных комбинациях. В результате сложного распределения положительных и отрицательных зарядов на разных участках цепи они укладываются в трехмерные структуры уникальной формы, которая зависит не только от состава самой молекулы, но и от среды, в которой она находится.

Именно благодаря своей пространственной структуре белки-лиганды успешно связываются только с теми рецепторами, которые подходят им



Двухцепочечные структуры ДНК и РНК формируются за счет взаимодействия пар комплементарных нуклеотидов, расположенных определенным образом: напротив нуклеотидов А должны находиться Т, напротив Г – Ц. Фрагмент одной из цепей – олигонуклеотид – способен узнавать комплементарную ему последовательность в составе одноцепочечной нуклеиновой кислоты

по форме и распределению зарядов. Этот принцип часто сравнивают с универсальным для молекулярной биологии взаимодействием «ключ – замок». За счет специфического соединения ферментов с субстратами ускоряются биохимические реакции, что регулирует обмен веществ в организме, а реакции приобретенного иммунитета основаны на связывании чужеродных или токсичных молекул-антигенов с определенными защитными белками-антителами.

Примерно по тому же принципу, но гораздо менее избирательно действуют на рецепторы и созданные человеком лекарства. Повышение специфичности лекарственных средств становится сегодня краеугольным камнем для развития фармакологии, заинтересованной в точно нацеленных, более эффективных и менее токсичных препаратах. В идеале же ученые стремятся к созданию персонифицированных лекарств, учитывающих индивидуальные особенности каждого пациента.

Химические аналоги природных антител

Самые высокоспецифичные агенты, которые сегодня применяются для точной диагностики или адресного терапевтического воздействия, – это уже упомянутые антитела, обычно вырабатываемые иммунными клетками в ответ на присутствие чужеродных организму молекул-антигенов. Полученные с помощью клеточных технологий антитела, которые связываются исключительно со своими целевыми рецепторами, сегодня

применяют для адресного лечения аутоиммунных и онкологических заболеваний, а также во многих современных средствах диагностики.

И все же, несмотря на весомые преимущества, использование антител в медицине связано с рядом проблем. Невозможность простого химического синтеза длинных белковых молекул обуславливает высокую стоимость антител. И даже применение в производственном процессе сложных процедур очистки не исключает высокий риск иммунных реакций организма человека на «чужие» белки. К тому же сама белковая природа антител требует особых условий хранения и транспортировки препаратов и ограничивает срок их годности.

В поисках возможности обойти недостатки и ограничения, присущие как традиционным низкомолекулярным и малоспецифичным «химическим» лекарствам, так и дорогостоящим, сложным в производстве и применении антителам, ученые обратили внимание на промежуточный вариант, также основанный на принципе трехмерного взаимодействия биологических макромолекул.

	АНТИТЕЛА	АПТАМЕРЫ
Мишень	Небольшие молекулы, пептиды, белки, микроорганизмы	Небольшие молекулы, пептиды, белки, микроорганизмы, клетки, ткани
Стабильность	Низкая	Высокая
Побочные действия	Есть	Нет
Сроки производства	2–24 месяца	1–14 дней
Стоимость производства	\$ 300/г	до \$ 50/г
Срок годности	12 месяцев	20 лет
Особые условия транспортировки и хранения	Есть	Нет

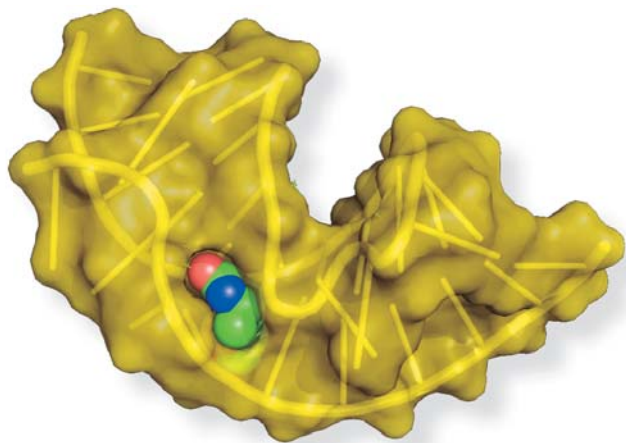
Аптамеры по сравнению с антителами имеют целый ряд преимуществ, в первую очередь безопасность, удобство в использовании и невысокую стоимость

Для адресной терапии в качестве специфического лиганда можно также использовать распознающие молекулы на основе коротких одноцепочечных синтетических нуклеиновых кислот, ДНК или РНК.

Как известно, цепочки каждого из этих природных полимеров собраны, как ожерелье, из 4 видов бусин-нуклеотидов. Синтетический олигонуклеотид – это короткий однонитевой фрагмент ДНК или РНК. При этом комплементарные (стремящиеся соединиться водородными (Н-Н) связями) участки цепи позволяют олигонуклеотиду сформировать свою уникальную компактную трехмерную структуру.

Благодаря пространственному соответствию мишени, распределению зарядов и возможности формировать водородные связи такие олигонуклеотиды, состоящие из нескольких десятков нуклеотидов, способны специфически связываться с определенными рецепторами. Поэтому их называли аптамерами (от лат. *aptus* – соответствовать и греч. *μερος* – часть чего-то).

С помощью технологии искусственной эволюции олигонуклеотидов (селекции в пробирке) аптамеры можно подобрать практически к любой мишени, а затем посредством секвенирования установить последовательность входящих в них нуклеотидов. На сегодня уже есть отработанные, простые и надежные технологии химического синтеза, модификации функциональными группами и очистки олигонуклеотидов, благодаря которым можно быстро получать нужные аптамеры в любых объемах.



Молекулярный комплекс из РНК-аптамера (выделен желтым цветом), специфически связанного с молекулой биотина (витамина В7). © CC BY-SA 3.0/Fdardel

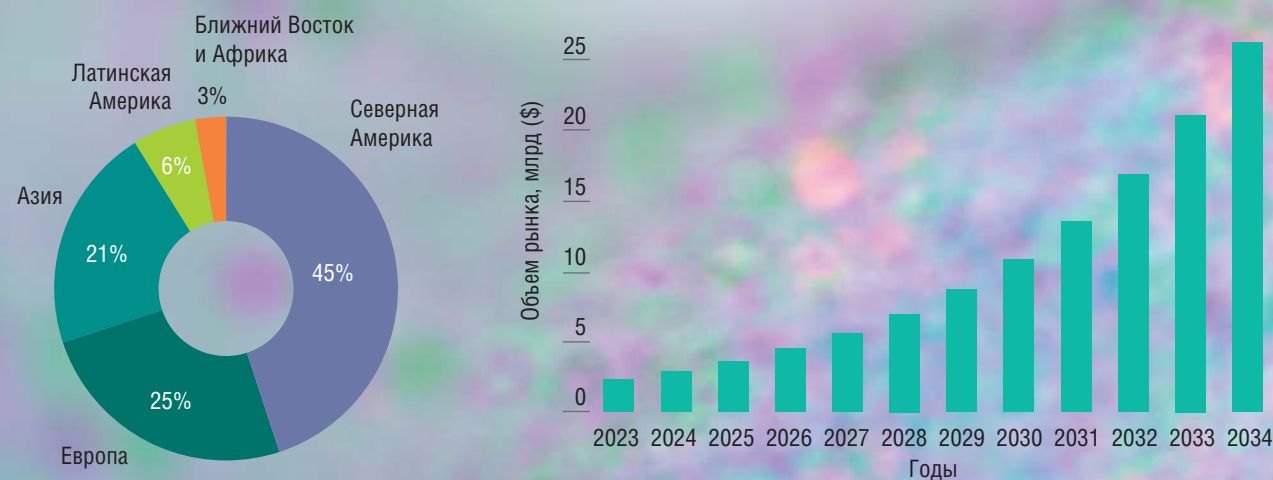
Стабильность и возможность восстановления исходных свойств при долгом хранении позволяет аптамерам стать более дешевой, универсальной и технологичной заменой антителам. По сравнению со многими лекарствами важными преимуществами аптамеров можно назвать их высокую селективность и аффинность (сродство), низкую токсичность и слабую иммуногенность (способность вызывать нежелательный иммунный ответ).

Эти распознающие молекулы могут использоваться в диагностических системах и сенсорах для избирательного и количественного анализа содержания искомого вещества. Таким способом можно выявлять белок-маркер заболевания и раковую клетку, вирус и бактерию, наркотик и взрывчатое или токсичное вещество.

Аптамеры, воздействуя на определенные рецепторы патологической клетки, могут использоваться в качестве самостоятельного лекарственного средства или переносчика других биоактивных компонентов для таргетной (адресной) терапии, доставляя лекарства в организм по конкретному «адресу».

К медицине будущего

Коснемся двух самых острых направлений применения аптамеров в медицине – точной диагностики и адресной терапии. И в том и в другом случае могут использоваться одни и те же олигонуклеотидные последовательности. Важно, чтобы они были высокоаффинны и высокоселективны, т.е. хорошо связывались

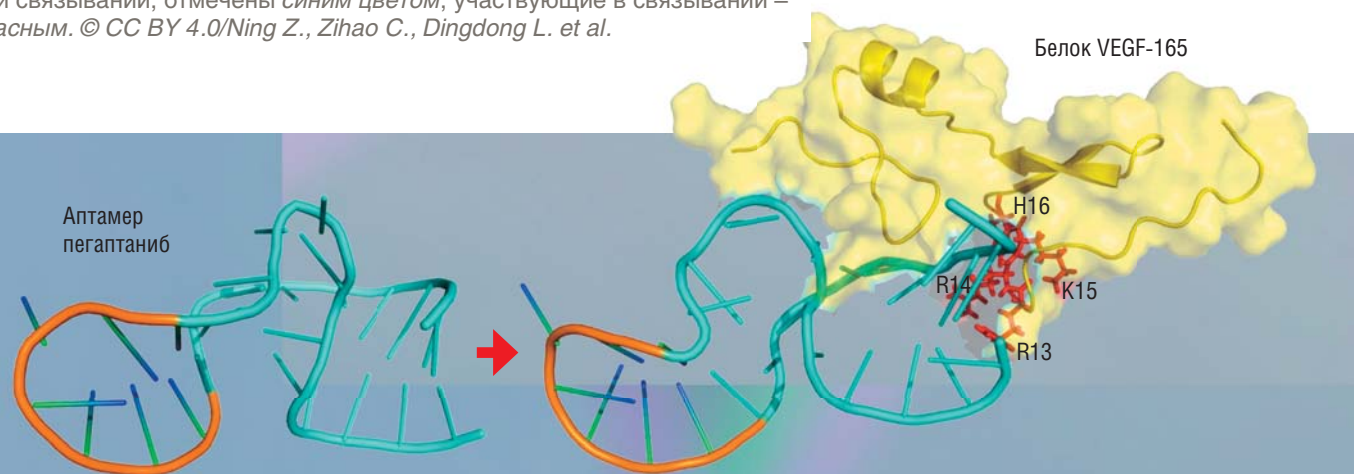


В 2023 г. наибольшая доля рынка препаратов аптамеров приходилась на Северную Америку (вверху), чему способствовал рост инвестиций. Так, в США в 2022 г. общий объем частных инвестиций в биотехнологии составил около 21,7 млрд долларов. Объем мирового рынка аптамеров, в 2024 г. составлявший около 2,9 млрд долларов, к 2034 г. может вырасти почти на порядок, достигнув 26,2 млрд (справа вверху). Росту рынка способствует как широкое распространение хронических заболеваний, так и увеличение исследований этой области и инвестиций в нее. Самый быстрорастущий рынок аптечных препаратов, по прогнозам, ожидается в ближайшие годы в Азиатско-Тихоокеанском регионе. По: <https://www.precedenceresearch.com/aptamers-market>

«Макуген» – первое лекарство на основе аптамера – используется в офтальмологии для лечения возрастной макулярной дегенерации. Внизу справа – аптамер пегаптаниб связывается с мишенью, белком VEGF-165 (фактором роста эндотелия сосудов А), дезактивируя его. Участки аптамера, претерпевающие конформационные изменения при связывании, отмечены синим цветом, участвующие в связывании – красным. © CC BY 4.0/Ning Z., Zihao C., Dingdong L. et al.

со своими мишенями и не связывались с другими, нецелевыми молекулярными объектами.

Со времени первой селекции аптамеров прошло уже 35 лет, однако они лишь недавно начали свой непростой путь из лабораторий в клинику. Произошло это отчасти потому, что их «ниша» была уже занята антителами, а выводить на рынок что-то новое очень затратно, если есть успешно работающие препараты. Свою роль в отставании сыграло и наличие «подводных камней» в технологиях селекции аптамеров.



Как и все новое, аптамеры вызывают недоверие. Чтобы доказать весь их потенциал, узнать природу и свойства, ученые публикуют результаты своих исследований в общедоступных научных журналах. И это, к сожалению, ограничивает дальнейшее применение аптамеров на практике, поскольку инновации раскрываются и становятся с финансовой стороны неинтересны фармацевтическому бизнесу.

С момента появления запатентованного препарата нужно быстро провести его доклинические и клинические исследования и начать продажи продукта, пока действие патента не закончилось и конкуренты не успели сделать аналог. А это – риски для производителя. Для ученых же, пусть и создавших самую «волшебную таблетку», найти, заинтересовать и вдохновить фармкомпанию в большинстве случаев почти нереально.

На этом фоне выделяется КНР: китайцы идут в фармацевтике своим, нестандартным путем, в частности активно развивая инновации в области селекции и синтеза олигонуклеотидов. Так что можно ожидать, что уже в ближайшем будущем препараты на основе аптамеров массово выйдут на фармацевтический рынок.

Первое лекарство на основе аптамера было одобрено для применения в 2004 г. Речь идет о препарате «Макуген», который представляет собой раствор для инъекций, предназначенный для лечения возрастной макулодистрофии и других



В масштабном междисциплинарном проекте *The good hope next project* по созданию с помощью компьютерного моделирования (*in silico*) и испытанию аптамеров к S-белку коронавируса, начатом в 2020 г., участвовали, помимо ученых из Красноярского научного центра СО РАН, специалисты из 28 научно-исследовательских организаций РФ, Канады, США, Финляндии, Италии, КНР, Тайваня, Японии и Республики Кореи

заболеваний сетчатки глаза. Активное вещество препарата – олигонуклеотид *пегаптаниб* – блокирует действие белкового фактора, способствующего росту, увеличению проницаемости и воспалению кровеносных сосудов.

Сейчас, после более чем двадцатилетнего перерыва, на разных стадиях клинических испытаний находятся более 50 аптамеров и адресных препаратов на их основе, предназначенных для лечения различных типов рака, инсульта, сахарного диабета, гемофилии и других заболеваний (Cesarini, Appleton, de Franciscis et al., 2025). А недавно в Китае начали использовать в клиниках уже второй радиофармпрепарат на основе аптамеров.

Разработкой аптамеров для медицинских приложений начали заниматься и в нескольких отечественных научных центрах. Одни из первых в России экспериментов по созданию и испытанию таких аптамеров были проведены в 2011 г. в лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий Красноярского медицинского университета и в Институте химии и химической технологии Красноярского научного центра СО РАН (КНЦ СО РАН). В 2019 г. для развития этого направления в КНЦ СО РАН была создана молодежная лаборатория цифровых и управляемых лекарств и тераностики. Сейчас в Красноярске организуется уже вторая молодежная лаборатория, что закономерно, ведь кому и продвигать инновации, как не молодым и энергичным.

Ниже мы познакомим читателей с примерами конкретных исследований, которые были выполнены красноярскими специалистами совместно с российскими и зарубежными коллегами из Канады, Финляндии, Италии, Китая и Тайваня.

ЭВОЛЮЦИЯ В ПРОБИРКЕ

Важнейшей вехой в истории аптамеров считается 1990 г., когда две американские лаборатории, возглавляемые биохимиками Л. Голдом и будущим нобелевским лауреатом Д. Шостаком, независимо друг от друга разработали метод получения высокоспецифичных РНК-олигонуклеотидов. Голд назвал метод SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения), а ученик Шостака Э. Элигтон ввел термин «аптамер».

Эта технология селекции включает смешивание в одной пробирке одноцепочечной библиотеки ДНК или РНК,

состоящей из большого числа случайных последовательностей олигонуклеотидов одинаковой длины, вместе с молекулярными мишенями, к которым подбирается аптамер. Олигонуклеотиды, не связавшиеся с мишенями, удаляются, а присоединившиеся к мишеням копируются в большом количестве с помощью *полимеразной цепной реакции* (ПЦР). При этом они копируются с некоторыми ошибками, благодаря чему появляются мутации, увеличивающие изменчивость.

После десятка подобных циклов селекции в растворе остаются только те нуклеотидные последовательности,

которые очень хорошо связываются со своими мишенями. Таким образом, происходит отбор лучших вариантов, напоминающий естественную эволюцию в природе.

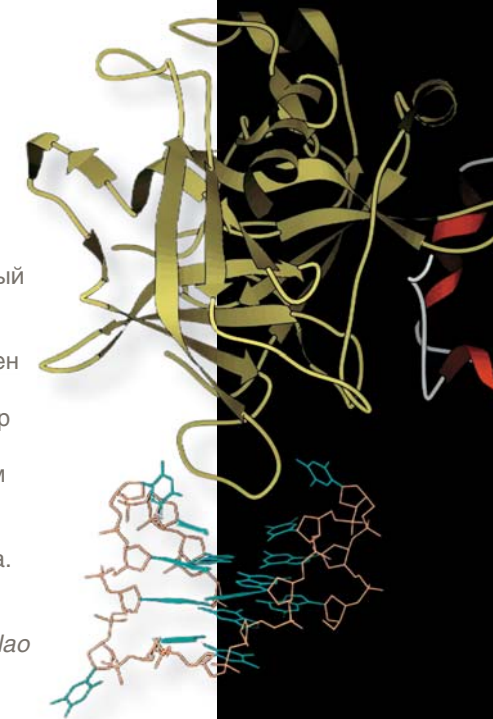
Циклы положительной селекции обязательно должны чередоваться с «отрицательными» раундами, когда уже обогащенная библиотека инкубируется с нежелательными мишенями, с которыми аптамеры не должны связываться. При этом все связавшиеся варианты олигонуклеотидов удаляются, а остальные проходят дальнейшую селекцию.

Для получения более универсальных аптамеров можно чередовать раунды с разными положительными мишенями, а для более высокоспецифичных – использовать больше разнообразных отрицательных мишеней.

Обычно для достижения цели достаточно 10–15 циклов селекции, при этом после каждого раунда олигонуклеотиды тестируются на качество связывания с мишенями. Результаты лучших раундов *секвенируют*, точно определяя нуклеотиды во всех эволюционировавших последовательностях. Далее с помощью биоинформационного анализа лучшие варианты аптамеров отбираются, синтезируются и тестируются на чувствительность и специфичность к мишени.

Модификаций методов молекулярной селекции множество. В зависимости от типа мишеней ее проводят с помощью магнитных наночастиц, капиллярного электрофореза, хроматографии, приборов-сортеров клеток, микрофлюидных систем. Существует даже *in vivo* селекция, проводимая непосредственно в живых организмах

Первый антитромбиновый аптамер TBA с антикоагулянтной активностью был получен с помощью технологии SELEX в 1992 г. Аптамер способен ингибировать индуцированную белком тромбином агрегацию тромбоцитов и формирование тромба. Справа – комплекс TBA с тромбином.
© CC BY-SA 3.0/Sima.yhlao

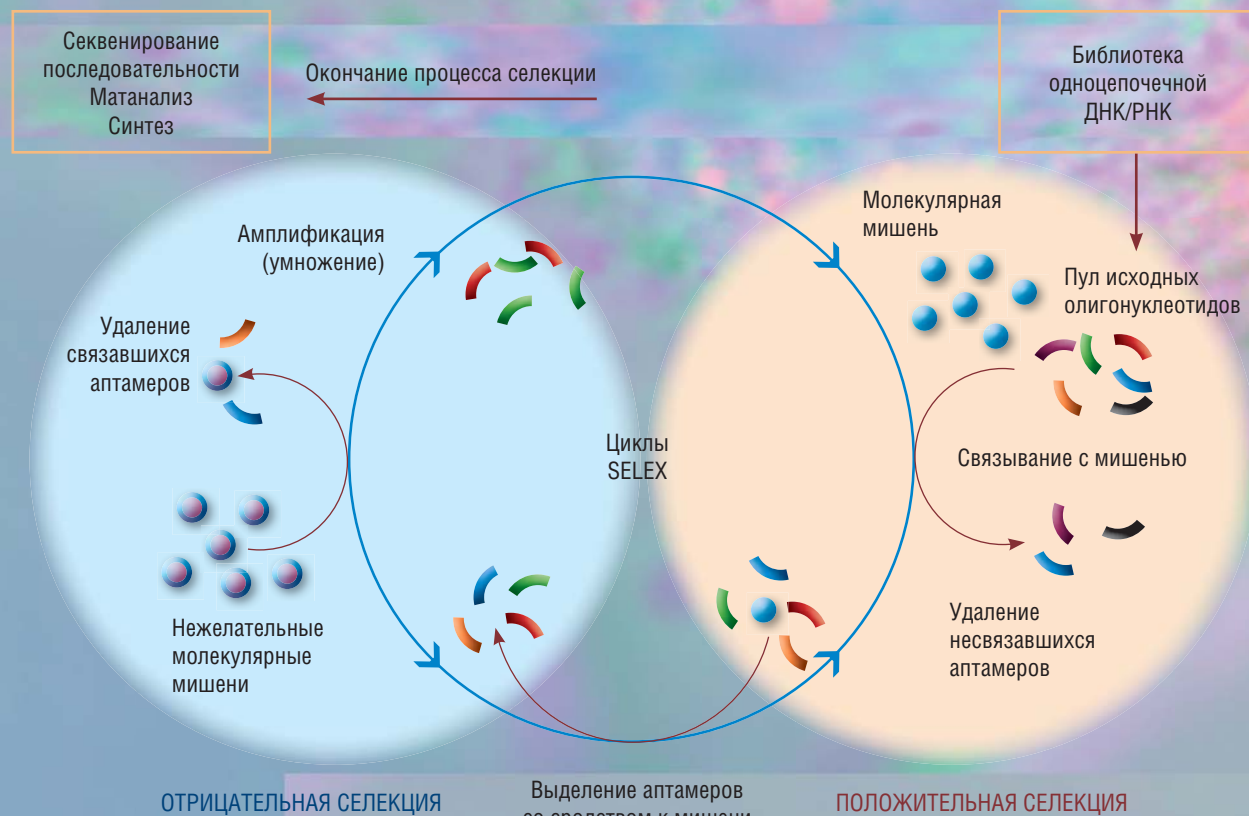


С помощью метода молекулярной селекции были отобраны тысячи аптамеров, образующие специфические комплексы с самыми различными органическими соединениями и биологическими молекулами, включая факторы роста, ферменты, антитела, рецепторы, вирусные белки. Можно даже получить аптамеры к целому организму, например к определенной бактерии: в этом случае аптамеры будут связываться с различными структурами на ее поверхности. Многие из таких аптамеров были получены для решения конкретных практических задач

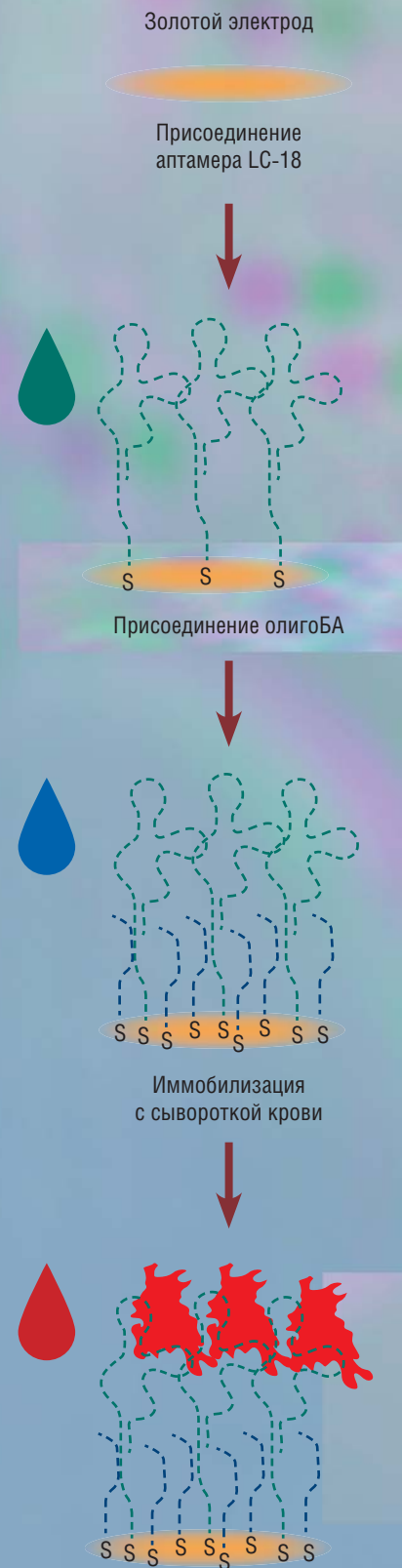
Аптамеры для диагностики и контроля рака

Диагностический потенциал аптамеров очень широк. Их можно использовать в самых разных диагностических системах: от экспресс-тестов с помощью простейших бумажных тест-полосок до сложных томографов, помогающих получить послойные изображения патологий, контрастируемых аптамерами в тканях и органах.

Аптамеры могут заменить *диагностические зонды* (непосредственно распознающие молекулы) в уже существующих системах визуализации пораженных участков. К примеру, их можно использовать вместо антител для точного установления диагноза по окраске срезов тканей вместо низкомолекулярных красителей или для визуализации опухолей непосредственно во время хирургических операций. А также для того, чтобы повысить специфичность накопления контрастных или радиофармацевтических препаратов.



Принцип молекулярной селекции прост: сначала синтезируют несколько миллиардов молекул олигонуклеотидов – нуклеиновых кислот одной длины, но разного состава, составляющих библиотеку одноцепочечных молекул ДНК/РНК. Из этого множества в нескольких циклах селекции отбирают олигонуклеотиды с нужными свойствами, способные эффективно связываться только с молекулами-«мишенями». Такие аптамеры можно выделить и затем амплифицировать (размножить) с помощью ПЦР



Один из самых перспективных, простых и быстрых методов экспресс-диагностики по крови различных типов рака базируется на использовании *электрохимического сенсора* – устройства, где аналитический сигнал определяется ходом электрохимического процесса. Принцип действия этого чувствительного прибора основан на изменении электрических параметров электродов, находящихся в контакте с электролитом в присутствии определяемого вещества.

Исследователи и врачи из Красноярска вместе с коллегами из Томска предложили использовать для диагностики *рака легкого* аптамер LC-18, способный специфически взаимодействовать с опухолевыми белковыми биомаркерами из крови пациентов. Молекулы аптамера закрепляются на поверхности золотого электрода, который затем помещается в тестируемую плазму крови. В случае активного заболевания присутствующие в крови

Принципиальная схема подготовки аптасенсора для определения опухолевых биомаркеров в крови (слева). Молекулы аптамера LC-18 иммобилизуют на специально подготовленном золотом дисковом электроде. Затем на нем иммобилизуют короткие молекулы «блокирующего» агента (БА, например, тиолированного олигонуклеотида с неродственной последовательностью – олигоБА), заполняющие дефекты (непокрытую поверхность) в слое аптамера. БА не препятствуют связыванию активного центра, расположенного на вершине аптамера, с целевым белком. Следующий этап – анализ сыворотки крови пациента. По: (Shabalina, Sharko, Glazyrin et al., 2021)

белки-биомаркеры рака присоединяются к аптамерам, и характеристики тока, проходящего через электрическую цепь, меняются. Степень изменения сигнала будет пропорциональна количеству опухолевого белка в плазме крови, что дает возможность оценить стадию развития болезни (Shabalina, Sharko, Glazyrin et al., 2021).

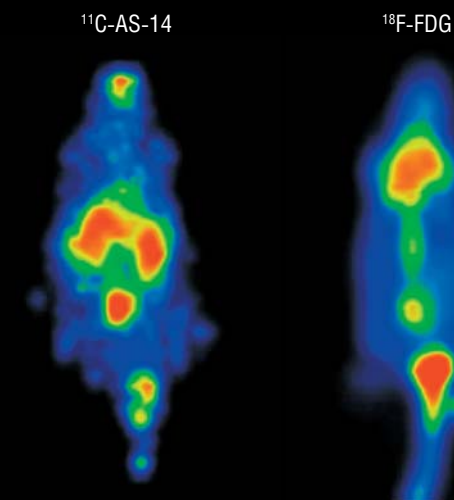
Злокачественная опухоль может высвобождать клетки в кровь и лимфатическую систему на разных стадиях своего развития, вплоть до очень ранних. Как показано в экспериментах на животных, опухоль размером 1 см может выделять в кровь до 1 млн клеток в сутки. У многих пациентов с поздними стадиями рака циркулирующие в крови раковые клетки обнаруживаются даже при отсутствии распространения первичной опухоли. Хотя большинство таких «мигрантов» погибает, некоторые из них проникают в ткани, формируя там вторичные раковые очаги (*метастазы*) (Gale, 2004).

Ученые из Красноярского государственного медицинского университета, КНЦ СО РАН вместе с врачами-онкологами из Красноярского краевого клинического онкологического диспансера разрабатывают набор реагентов для количественного анализа циркулирующих в крови клеток рака легких, *рака молочной железы* и *глиобластомы* головного мозга (Kolovskaya, Zyuzukina, Dassie et al., 2023). Так, исследователи предложили детектировать циркулирующие в крови раковые клетки *трижды негативного типа рака молочной железы* (ТНРМЖ), агрессивного и склонного к рецидивам, с помощью РНК-аптамера MDA231.

Комплексы частиц с аптамерами помещают в пробу крови пациента, где к ним присоединяются находящиеся там опухолевые клетки. Затем частицы извлекают магнитом

Использование радиофармпрепарата на основе аптамера AS-14, меченого радионуклидом ^{11}C , для визуализации с помощью ПЭТ/КТ первичной и вторичных опухолей у мышей с асцитной карциномой Эрлиха позволило выявить у них метастатические поражения по всему телу, включая сердце, легкие, кишечник, тимус и ребра. В отличие от стандартного радиоактивного индикатора на основе глюкозы (^{18}F -FDG), этот препарат не накапливается в метаболически активных органах, таких как сердце. Его можно применять для высокоспецифичной и высококонтрастной визуализации раковых клеток, а также для доставки лекарств в терапии рака.

По: (Ozerskaya, Zamay, Kolovskaya et al., 2022)



и наносят на предметное стекло, чтобы с помощью микроскопа произвести подсчет опасных «сгустков». Число клеток можно оценить и с использованием метода *проточной цитометрии* по сигналам рассеивания/свечения клеточной суспензии, проходящей через проточную ячейку. Чтобы аптамер в этом случае был хорошо виден, в его структуру встраивают флуоресцентную метку на основе красителя Cyanine3, светящегося ярким оранжевым цветом в ответ на возбуждение лазером.

Обычно для контроля качества лечения онкобольных и поиска возможных вторичных метастазов используется метод *позитронно-эмиссионной компьютерной томографии* (ПЭТ-КТ). Пациенту внутривенно вводят препарат *глюкозы*, в молекулы которой встроена радиоактивная метка – радиоизотоп с коротким периодом распада. Раковые клетки потребляют больше глюкозы, чем нормальные, и их скопления можно обнаружить в организме с помощью томографа. Однако глюкозу накапливают и любые метаболически активные органы, к примеру мышцы после физической нагрузки, воспаленные ткани и др., что затрудняет диагностику.

Чтобы увеличить специфичность накопления радиофармпрепарата в опухолях, исследователи ввели радиометку в виде короткоживущего изотопа углерода ^{11}C не в глюкозу, а в аптамер AS-14, специфичный к *асцитной карциноме Эрлиха* (экспериментальной модели рака, при которой во внутрибрюшинной полости образуется жидкость-асцит, богатая свободными опухолевыми клетками). Этот препарат позволяет успешно выявлять не только основную опухоль, но и двухмиллиметровые метастазы в органах экспериментальных мышей. Метод может быть с успехом применен и для диагностики у человека (Ozerskaya, Zamay, Kolovskaya et al., 2022).

В помощь хирургам и терапевтам

Во время операции по удалению опухолей хирург ориентируется визуально, полагаясь на свой опыт. При операциях на головном мозге очень важно не повредить жизненно важные здоровые области и при этом не оставить даже мельчайшие скопления злокачественных клеток, которые могут вызвать рецидив.

Самые опасные опухоли мозга – *глиомы*, образующиеся из вспомогательных *глиальных клеток* мозга, – распространяются далеко в окружающие их здоровые ткани, что затрудняет определение границ опухоли и удаление ее хирургическим путем.

В помощь хирургам красноярские ученые и врачи совместно с томскими, дальневосточными и канадскими коллегами создали препарат в виде спрея, который наносится на опухоль во время операций на головном мозге. Он позволяет визуально отличить злокачественные ткани от здоровых за счет специфического связывания аптамера с клетками глиомы. Закрепленная на аптамере флуоресцентная метка светится при облучении от подсветки операционного микроскопа, помогая хирургу видеть границы опухоли.

Флуоресцентный спрей уже был успешно протестирован на человеческих глиомах, выращенных из клеточных культур и трансплантированных в мозг кроликов и мышей (Zamay, Koshmanova, Narodov et al., 2024).

Во время хирургической операции аптамеры в комплексе с магнитными наночастицами способны под действием слабого переменного магнитного поля механически разрушать недоступные скальпелю хирурга микроскопические скопления опухолевых клеток там, где опухоль визуально трудно различима. Разрушенные клетки вместе с частицами затем смывают.

Специалисты из Красноярска вместе с коллегами из Иркутска, Томска, Москвы, Японии и Канады разработали комплекс из специфичных к раковым клеткам аптамеров и магнитных наночастиц, покрытых природным полисахаридом *арабиногалактаном*, повышающим биодоступность препарата. Введенный внутривенно мышам с асцитной карциномой Эрлиха, этот комплекс накапливался в опухоли, что было доказано с помощью МРТ. Локальное переменное магнитное поле низкой частоты и интенсивности заставляло магнитные частицы колебаться, механически разрушая опухолевые ткани и внеклеточный матрикс (Kolovskaya, T.N. Zama, G. S. Zama *et al.*, 2020).

Некоторые аптамеры могут непосредственно оказывать терапевтический эффект. Например, они способны специфически связываться с сигнальными рецепторами, запуская *апоптоз* (программируемую клеточную смерть) либо *пролиферацию* (деление клеток). Но есть и более сложные варианты.

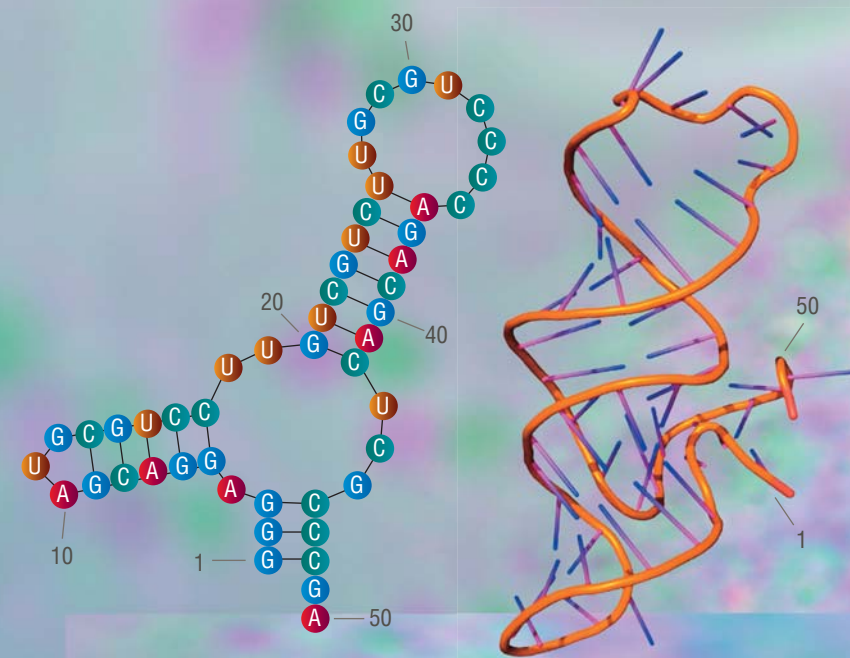
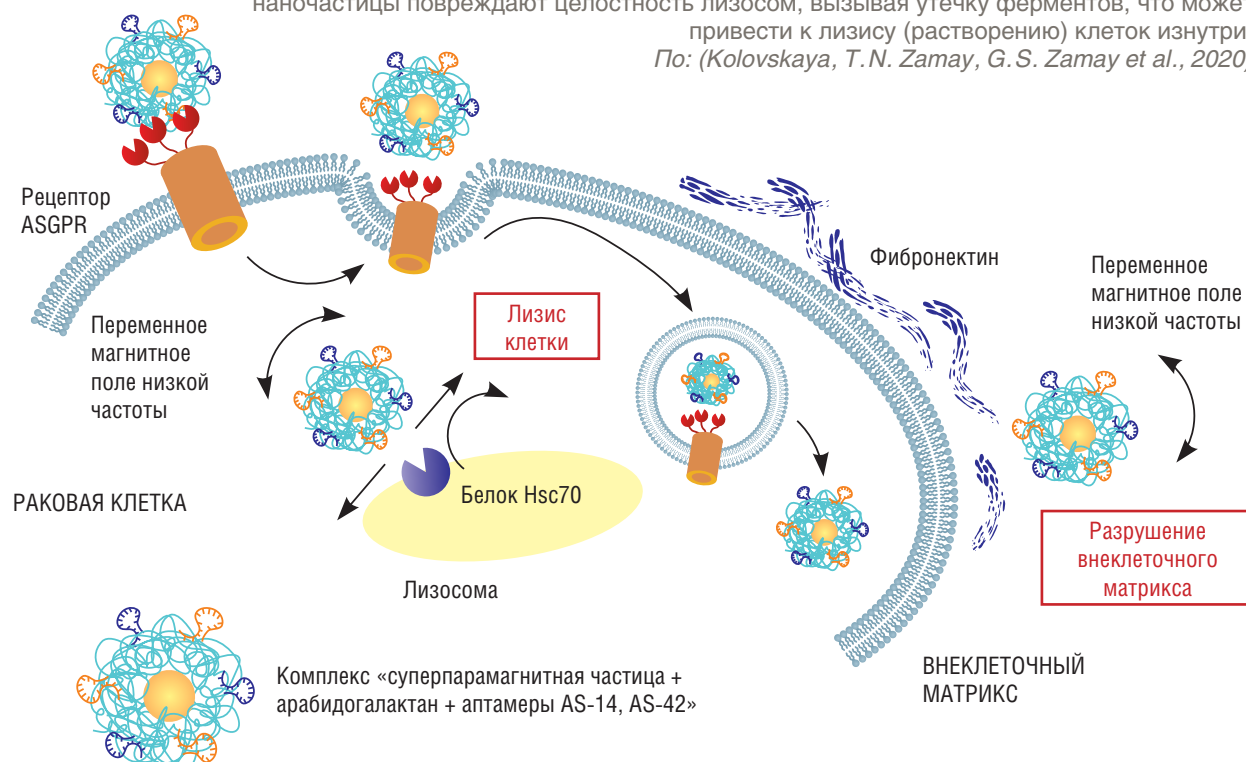
Как известно, химиопрепараты, эффективные для уничтожения раковых клеток, токсичны и для всех быстро делящихся здоровых клеток. Среди негативных побочных эффектов – повреждение волосяных луковиц, угнетение кишечного эпителия и др. Для адресной доставки часто применяемых химиопрепаратов к клеткам опухоли можно использовать аптамеры, что позволит одновременно уменьшить дозу и повысить эффективность лечения.

Красноярские химики и биологи создали комплекс из ДНК-аптамеров, способных распознавать и присоединяться к раковым клеткам, и *цисплатина* – широко применяемого противоопухолевого препарата, эффективного, но очень токсичного в больших концентрациях. В комплекс также входит арабиногалактан, повышающий всасываемость комплекса.

Применение таких конъюгатов для лечения у мышей асцитной карциномы Эрлиха позволило накопить препарат непосредственно в раковой опухоли. В результате удалось в 15 раз понизить терапевтическую дозу,

Комплексы из парамагнитных наночастиц железа, связанных с аптамерами и покрытых полисахаридом арабиногалактаном, воздействуют на раковую опухоль двумя путями. Аптамер AS-14 связывается с белком фибронектином внеклеточного матрикса, в который погружены клетки опухоли. Низкочастотное (50 Гц) переменное магнитное поле заставляет частицы колебаться, что нарушает клеточную адгезию («слипание») и разрушает сами клетки. С помощью арабиногалактана наночастицы также проникают внутрь клеток через асиалогликопротеиновые рецепторы (ASGPR). Аптамер AS-42 связывается с белком теплового шока (Hsc70), который находится в цитоплазме и в лизосомах – органеллах с протеолитическими ферментами. Колеблющиеся под действием магнитного поля наночастицы повреждают целостность лизосом, вызывая утечку ферментов, что может привести к лизису (растворению) клеток изнутри.

По: (Kolovskaya, T. N. Zama, G. S. Zama *et al.*, 2020)



С помощью молекулярно-динамического моделирования удалось понять, как выглядит наиболее вероятная в растворе пространственная структура РНК-аптамера MDA231, используемого для распознавания клеток рака молочной железы. «Стебель» аптамера (константный участок, не участвующий в молекулярных взаимодействиях) образует две функциональные петли, самая большая из которых богата азотистыми основаниями цитозинами. По: (Kolovskaya, Zyuzukina, Dassie *et al.*, 2023)

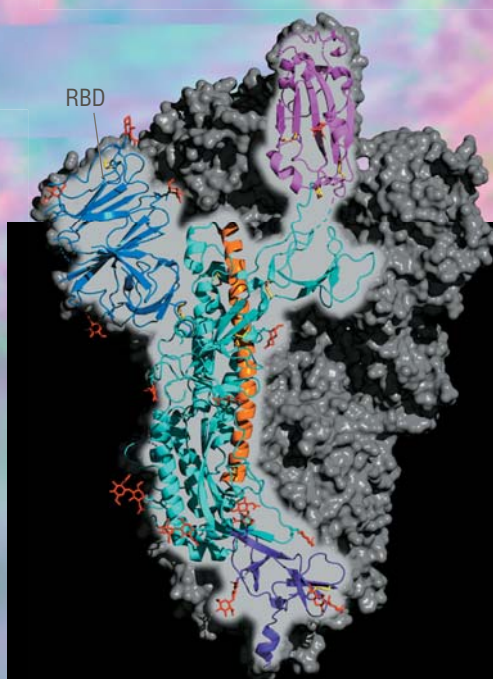
СЕЛЕКЦИЯ IN SILICO

Пандемия коронавирусной инфекции заставила ученых ускорить разработку вакцин и противовирусных препаратов. При этом большей части из них пришлось прекратить свои исследования в лабораториях, перейдя на удаленную работу. Вынужденная изоляция принесла не только неудобства, но и плоды, подстегнув мировое научное сообщество. Так появились решения для проектирования новых лекарств исключительно с помощью компьютерного дизайна.

Схема селекции аптамеров *in silico* («в кремнии», т.е. полностью с применением компьютерных технологий, по аналогии с *in vivo*, т.е. «в живом») в принципе похожа на классическую экспериментальную, которую проводят *in vitro* («в пробирке»). Только в этом случае отбор проводят с использованием комплекса методов молекулярной динамики и квантовой химии.

Чем больше будут теоретически рассчитанные энергии связывания молекул, тем лучше аптамеры будут образовывать реальные комплексы с белками. С помощью такого алгоритма был разработан аптамер, способный эффективно связываться с рецептор-связывающим доменом (участком) поверхностного белка-«шипа» (*S-белка*) коронавируса SARS-CoV-2. Взаимодействие этого белкового домена с клеточными рецепторами – начальный этап внедрения вируса в человеческую клетку, и его блокировка может остановить развитие инфекции.

Экспериментальное подтверждение эффективности связывания синтетического аптамера с вирусным белком «в пробирке» было доказано тремя различными методами. Такие полностью смоделированные на компьютере аптамеры можно использовать и в диагностических тест-системах, и в терапевтических целях (Mironov, Shchugoreva, Artyushenko *et al.*, 2022)



Поверхностный S-белок SARS-CoV-2 состоит из трех мономеров. В каждом мономере имеется особый участок – рецептор-связывающий домен RBD – характерный только для этого коронавируса. Вверху – молекулярная структура одного мономера. © CC0 1.0 Universal/ 5-HT2AR



Переходу к персонализированной медицине и высокотехнологичному здравоохранению способствуют центры коллективного пользования и сотрудничество с бизнесом. Центр развития биомедицинских технологий с использованием аптамеров, который планируется открыть на базе ФИЦ КНЦ СО РАН, сможет предоставлять такие услуги, как селекция аптамеров и разработка продуктов на их основе, синтез и модификация олигонуклеотидов, суперкомпьютерное моделирование и др. Сейчас подобные услуги оказывает ООО «АПТАМЕРЛАБ», созданное сотрудниками лаборатории

достаточную для подавления роста опухоли у животных (Zamay, Starkov, Kolovskaya *et al.*, 2022).

Сочетание высокой селективности и чувствительности к мишеням на молекулярном уровне, стабильности и способности к восстановлению структуры и свойств, безопасности для организма с автоматизированным и масштабируемым синтезом, а также с простотой внесения химических модификаций раскрывает перед аптамерами безграничные перспективы для применения в медицине. Важное конкурентное преимущество аптамеров – это неприхотливость к условиям транспортировки и хранения препаратов на их основе.

Но несмотря на такие очевидные преимущества аптамеров, их широкому внедрению в медицинскую практику мешает ряд ограничений различного характера. Так, аптамеры, структура и состав которых сходны с природными олигонуклеотидами, подвержены атакам естественных защитных агентов организма – ферментов *нуклеаз*, расщепляющих ДНК. Из-за этого эффекта их действие в организме может

быть не таким долгим, как хотелось. Чтобы обойти это ограничение, приходится применять различные химические модификации нуклеотидов, защищающие аптамеры от распада.

Действие аптамеров в организме может быть ограничено и их быстрой фильтрацией через почки из-за относительно небольших размеров молекул. Чтобы противодействовать этому, аптамеры соединяют с более высокомолекулярными веществами – *полиэтиленгликолем*, другими различными полимерами или с наночастицами.

Наконец, существуют экономические и политические причины, препятствующие быстрому внедрению аптамеров в медицину. Большие масштабы инвестиций, уже вложенных в рынок терапевтических антител, вынуждают фармкомпании препятствовать выводу на рынок новых, более дешевых и доступных лекарственных препаратов. Тем не менее любые ограничения в развитии технологий всегда временны, и активные биологические агенты на основе синтетических олигонуклеотидов, безусловно, будут играть немаловажную роль в медицине будущего.

В международной конференции «Aptamers in Russia – 2019» в Красноярске участвовали ведущие мировые специалисты по аптамерам, в том числе создатель технологии SELEX Л. Голд (четвертый справа)

Литература

- Лахин А.В., Тарантул В.З., Генинг Л.В. Аптамеры: проблемы, пути их решения и перспективы // *Acta Naturae*. 2013. Т. 5, № 14 (19). С. 37–48.
- Cesarini V., Appleton S.L., de Franciscis V. The recent blooming of therapeutic aptamers // *Mol Aspects Med*. 2025 Apr. V. 102. P. 101350.
- Kolovskaya O. S., Zamay T. N., Zamay G. S. *et al.* Aptamer-Conjugated Superparamagnetic Ferroarabinogalactan Nanoparticles for Targeted Magnetodynamic Therapy of Cancer // *Cancers (Basel)*. 2020. Jan 15. V. 12 (1). P. 216.
- Mironov V., Shchugoreva I.A., Artyushenko P. V. *et al.* Structure and interaction Based Design of Anti-SARS-CoV-2 Aptamers // *Chem. A Eur. J.* 2022. Feb 24. V. 28 (12). e202104481.
- Ozerskaya A. V., Zamay T.N., Kolovskaya O.S. *et al.* 11C-radiolabeled aptamer for imaging of tumors and metastases using positron emission tomography- computed tomography // *Mol. Therapy – Nucleic Acids*. 2021. V. 26. P. 1159–1172.
- Shabalina A. V., Sharko D. O., Glazyrin Yu. E. *et al.* Development of electrochemical aptasensor for lung cancer diagnostics in human blood // *Sensors*. 2021. V. 21. P. 7851.
- Kolovskaya O. S., Zyzyukina A. V., Dassie J. P. *et al.* Monitoring of breast cancer progression via aptamer-based detection of circulating tumor cells in clinical blood samples // *Front Mol. Biosci.* 2023. Jun 8. V. 10. P. 1184285.
- Tuerk C., Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase // *Science*. 1990. Aug 3. V. 249 (4968). P. 505–510.
- Zamay T.N., Starkov A.K., Kolovskaya O.S. *et al.* Nucleic Acid Aptamers Increase the Anticancer Efficiency and Reduce the Toxicity of Cisplatin-Arabinogalactan Conjugates In Vivo // *Nucleic Acid Ther.* 2022. V. 32 (6). P. 497–506.
- Zamay G., Koshmanova A., Narodov A. *et al.* Visualization of Brain Tumors with Infrared-Labeled Aptamers for Fluorescence-Guided Surgery // *J. Am. Chem. Soc.* 2024. Sep 11. V. 146 (36). P. 24989–25004.