БИОХИМИЯ, 2019, том 84, вып. 12, с. 1876 – 1885

УДК 577.11

ДНК-АПТАМЕРЫ К ЭКЗОСАЙТУ I ТРОМБИНА. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ВЗАИМОСВЯЗИ И АНТИТРОМБОТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ

© 2019 В.А. Спиридонова[1], Т.М. Новикова[1], В.А. Сизов[1], В.С. Шашковская[1], Е.В. Титаева[2], А.Б. Добровольский[2], Е.Б. Жарикова[2], А.В. Мазуров[2]*

[1] *НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия*

[2] *Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии, Министерство здравоохранения Российской Федерации, 121552 Москва, Россия; электронная почта: avmazurov@list.ru*

Поступила в редакцию 18.04.2019
После доработки 11.07.2019
Принята к публикации 11.07.2019

ДНК-аптамеры (олигонуклеотиды), взаимодействующие с экзосайтом I тромбина, имеют в своем составе структуру G-квадруплекса, две T-T- и одну T-G-T-петли. Они препятствуют связыванию экзосайта I с фибриногеном и рецепторами тромбина на поверхности тромбоцитов и благодаря этому подавляют стимулируемые тромбином образование фибрина из фибриногена и агрегацию тромбоцитов. Ранее мы синтезировали оригинальный антитромбиновый аптамер RE31 (5′-GTGACGTAGGTTGGTGTGGTTGGGGCGTCAC-3′), содержащий (кроме G-квадруплекса) шарнирную область, соединенную с шестью парами комплементарных оснований (дуплексная область). В настоящей работе сравнивали свойства аптамера RE31 с его аналогами, содержащими разное количество оснований в дуплексной области и вставки нуклеотидов в шарнирной области. Уменьшение количества нуклеотидов в дуплексной области на 1–4 пары (по сравнению с аптамером RE31) приводило к снижению стабильности структуры аптамеров (более низкие температуры плавления) и снижению их способности ингибировать стимулированное тромбином образование фибрина в плазме крови человека в тестах тромбинового, протромбинового и активированного частичного тромбопластинового времени. В то же время увеличение количества оснований на 1–2 пары не вызывало существенных изменений стабильности и антитромбиновой активности аптамеров. Вставки в шарнирной области аптамера RE31 приводили к снижению антитромбиновой активности. Исследование антитромботических свойств RE31 показало, что он: 1) замедляет образование тромбина в плазме крови человека (тест генерации тромбина), 2) ускоряет растворение фибринового сгустка тканевым активатором плазминогена в модели *in vitro*, и 3) подавляет артериальное тромбообразование в модели *in vivo*. На основании полученных данных аптамер RE31 может рассматриваться как потенциально эффективное антитромботическое соединение.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аптамеры, тромбин, тромбообразование, фибриноген, фибринолиз.

DOI: 10.1134/S032097251912011X

Аптамеры представляют собой однотяжевые ДНК- или РНК-олигонуклеотиды длиной до нескольких десятков оснований, которые, благодаря способности образовывать сложные пространственные конформации, могут специфически взаимодействовать с различными молекулами. Некоторые аптамеры могут также ингибировать функциональную активность своих мишеней. Первичные аптамеры получают методом SELEX (системная эволюция лигандов с помощью экспоненциального обогащения) путем их отбора из библиотеки случайно синтезированных последовательностей по способности к связыванию с исследуемой молекулой. Затем они могут быть усовершенствованы с помощью методов компьютерного моделирования и при необходимости химически модифицированы (например, для повышения стабильности и увеличения времени жизни в кровотоке человека и животных). Аптамеры являются функциональными химическими аналогами моноклональных антител. Однако (в отличие от антител) они мало иммуногенны и могут быть синтезированы химически без использования для их селекции и производства клеточных и/или бактериальных систем и экспериментальных животных. Аптамеры являются перспективными соединениями для разработки новых лекарственных препаратов, в экспериментальных исследованиях их используют в качестве молекулярных инструмен-

* Адресат для корреспонденции.

тов для изучения функционирования различных молекул [1–3].

Тромбин, главная протеаза системы свертывания крови [4], является одной из мишеней для аптамеров. Первый аптамер против тромбина – 15TBA (тромбин-связывающий аптамер, другие названия HD1, 15-mer) – был получен Bock et al. [5]. Этот аптамер представляет собой однотяжевой ДНК-олигонуклеотид из 15 оснований (5′-GGTTGGTGTGGTTGG-3′) со структурой G- квадруплекса, двумя T-T-петлями и одной T-G-T-петлей, который связывается с экзосайтом I тромбина с помощью двух малых T-T-петель [5–8]. Аптамер 15TBA ингибирует взаимодействие экзосайта I с субстратами тромбина – фибриногеном и PAR (рецепторы, активируемые протеазами) рецепторами тромбоцитов. Благодаря этому он подавляет две ключевые протромботические реакции тромбина – образование фибрина из фибриногена и индуцируемую тромбином агрегацию тромбоцитов, не влияя непосредственно на активный (каталитический) центр фермента [5, 9].

Ранее нами был синтезирован ДНК-аптамер с условным названием RE31 (5′-GTGACGTAGGTTGGTGTGGTTGGGGCGTCAC-3′) [10]. Этот аптамер состоит из 31 нуклеотида и, кроме G-квадруплексной структуры, содержит шарнирную область, соединенную с шестью парами комплементарных оснований (дуплексная область), симметрично расположенными относительно центрального квадруплекса (рис. 1). Изучение структуры комплекса RE31 с тромбином показало, что его связывание с белком идет по тому же механизму, что и 15TBA, – через малые T-T-петли и с участием тех же аминокислотных остатков тромбина [8]. Однако RE31 более стабилен, чем 15TBA [11], и существенно эффективнее, чем 15TBA, ингибирует индуцированное тромбином образование фибрина из фибриногена в тестах тромбиновое время, протромбиновое время и активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и индуцированную тромбином агрегацию тромбоцитов [9, 10, 12]. Таким образом, наличие шарнирного и дуплексного участка в RE31, очевидно, повышает эффективность связывания аптамера с тромбином и его способность ингибировать опосредованные тромбином протромботические реакции.

В настоящей работе мы сравнивали свойства аптамера RE31 с его аналогами, содержащими разное количество оснований в дуплексной области и вставки нуклеотидов в шарнирной области. Также мы исследовали антитромботические свойства RE31 в тесте генерации тромбина, в модели фибринолиза *in vitro* и в модели артериального тромбообразования *in vivo*.

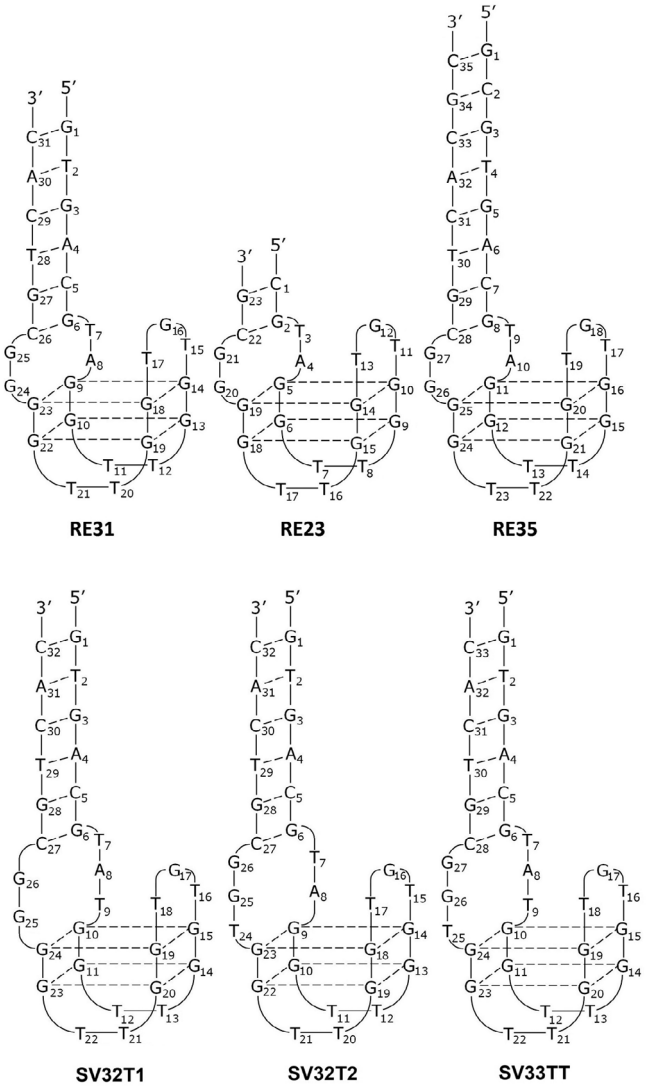

Рис. 1. Вторичные структуры аптамеров RE31, RE23 (минимальная длина дуплексной области), RE35 (максимальная длина дуплексной области), SV32T1 (вставка тимидина (T9) в шарнирную область), SV32T2 (вставка тимидина (T24) в шарнирную область), SV33TT (вставка двух тимидинов (T9 и T25) в шарнирную область)

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Аптамеры. В работе использовали следующие антитромбиновые аптамеры:

RE31 5′-GTGACGTAGGTTGGTGTGGTTGGGGCGTCAC-3′
RE35 5′-GCGTGACGTAGGTTGGTGTGGTTGGGGCGTCACGC-3′
RE33 5′-CGTGACGTAGGTTGGTGTGGTTGGGGCGTCACG-3′
RE29 5′- TGACGTAGGTTGGTGTGGTTGGGGCGTCA-3′
RE27 5′- GACGTAGGTTGGTGTGGTTGGGGCGTC-3′
RE25 5′- ACGTAGGTTGGTGTGGTTGGGGCGT-3′
RE23 5′- CGTAGGTTGGTGTGGTTGGGGCG-3′
SV32T1 5′-GTGACGTATGGTTGGTGTGGTTGGGGCGTCAC-3′
SV32T2 5′- GTGACGTAGGTTGGTGTGGTTGGTGGCGTCAC-3′
SV33TT 5′- GTGACGTATGGTTGGTGTGGTTGGTGGCGTCAC-3′.

Структуры аптамера сравнения RE31 и его аналогов – аптамеров RE23 (минимальная длина дуплексной области), RE35 (максимальная длина дуплексной области), SV32T1, SV32T2 и SV33TT (вставки тимидина в шарнирную область) представлены на рис. 1. При исследовании эффектов аптамера RE31 в модели артериального тромбоза *in vivo* использовали его модифицированный вариант – NH2-RE31-PEG, содержащий NH_2-группу и низкомолекулярный (300 Д) полиэтиленгликоль (PEG) на 3′- и 5′-концах олигонуклеотида соответственно. Такая модификация защищает концевые нуклеотиды от действия нуклеаз и удлиняет время жизни аптамера в кровотоке без существенного изменения его антитромбиновой активности [13]. Все аптамеры были синтезированы и очищены в ЗАО «Синтол». Аптамеры стандартно растворяли в буфере, содержащем 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 20 мМ HEPES, pH 7,4. Наличие G-квадруплексной структуры в синтезированных аптамерах подтверждали спектрами кругового дихроизма, которые регистрировали в спектрометре Chirascan («Applied Photophysics Ltd», Великобритания). Спектры имели характерный для антипараллельных G-квадруплексов максимум при 294 нм [14] (данные не представлены).

Температура плавления аптамеров. Стабильность структуры G-квадруплексов в аптамерах изучали, измеряя температуру плавления олигонуклеотидных образцов [15]. Измерения проводили на двулучевом спектрофотометре Hitachi U-2900 UV/Visible Spectrophotometer (Япония) в термостатируемом кюветном отделении, снабженном термоконтроллером Temperature Controller SPR-10. Конформационные переходы регистрировали при 294 нм (характеристическая длина волны для G-квадруплексных структур, при которой процесс денатурации сопровождается гипохромным эффектом); скорость нагревания составляла 0,5 °C в мин. УФ-поглощение аптамерных образцов при 260 нм варьировало от 0,6 до 0,7. Температура плавления образца соответствовала температуре, при которой 50% G-квадруплекса находится в денатурированном состоянии (точка перегиба на кооперативной кривой плавления).

Коагуляционные тесты. Влияние аптамеров на активацию системы свертывания крови и образование фибрина исследовали, измеряя тромбиновое время, протромбиновое время и АЧТВ в пуле плазм здоровых доноров, как подробно описано ранее [9]. Измерения выполняли на анализаторе «STA-Compact» с использованием наборов реактивов «STA Neoplastin Plus», «STA APTT», «STA Thrombin» и «Pool Norm» (анализатор и реактивы «Diagnostica Stago», Франция). Во всех тестах объем плазмы составлял 1/3 от объема реакционной смеси, к которой были добавлены разные аптамеры в указанных концентрациях. Эффекты аптамеров оценивали по отношению времени свертывания образцов, содержащих аптамеры, ко времени свертывания контрольных образцах без аптамеров.

Тест генерации тромбина. Влияние аптамера RE31 на динамику образования и инактивации тромбина в пуле плазм здоровых доноров исследовали с помощью теста генерации тромбина с использованием набора реактивов «PPP-Reagent» производства «Thrombinoscope» (Нидерланды). В ячейки 96-луночной плашки вносили по 80 мкл плазмы, содержащей аптамер в диапазоне концентрации до 5 мкМ, добавляли по 20 мкл «триггерного» реактива, содержащего рекомбинантный человеческий тканевой фактор и фосфолипиды (конечные концентрации 5 пкМ и 4 мкМ соответственно). Для калибровки флуоресцентного сигнала в контрольные ячейки вместо «триггерного» раствора вносили по 20 мкл калибратора, содержащего комплекс тромбин-α_2-макроглобулин (730 нМ). Плашку помещали в планшетный флюориметр «Fluoroscan Ascent» производства «Thermolabsystems OY» (Финляндия) и после инкубации (10 мин при 37 °C) реакцию инициировали добавлением 20 мкл HEPES-буфера (pH 7,35), содержащего субстрат тромбина Z-Gly-Gly-Arg-AMC и $CaCl_2$. Реакцию регистрировали в течение 30 мин. Анализ результатов проводили с помощью программы Thrombinoscope (версия 3.0.0.29).

Модель фибринолиза *in vitro*. Для исследования профибринолитического действия аптамера RE31 использовали модификацию предложенного ранее турбидиметрического метода регистрации образования и лизиса сгустков плазмы *in vitro* [16]. В ячейки 96-луночного планшета вносили 60 мкл раствора аптамера (конечная концентрация от 0 до 1 мкМ) или ингибитор карбоксипептидазы из картофеля (PCI) («Sigma», США) (конечная концентрация – 20 мкг/мл), и 70 мкл тромбопластина («Bade Behring», Германия), разбавленного 1 : 500 раствором 25 мМ $CaCl_2$, содержащим 5 мМ KCl. Плашку инкубировали 10 мин при 37 °C в планшетном термостате-шейкере «Elmi» (Латвия). Реакцию инициировали добавлением 70 мкл пула плазм здоровых доноров, к которому был добавлен тканевой активатор плазминогена (тАП) («Boehringer Ingelheim», Германия) в конечной концентрации 25 нг/мл. Плашку помещали в термостатируемый при 37 °C планшетный фотометр Multiscan Go «Thermo Scientific» (Финляндия) и с интервалом в 1 мин регистрировали измене-

ния оптической плотности (A_{450}) в течение 60 мин.

Активация TAFI (активируемый тромбином ингибитор фибринолиза). Активацию TAFI из плазм доноров экзогенным комплексом тромбин-тромбомодулин исследовали, оценивая уменьшение поглощения при 405 нм пептидного хромогенного субстрата (CBS 02.98) с использованием набора реактивов «STA Stachrom TAFI» («Diagnostica Stago», Франция) в соответствии с рекомендациями производителя. Эффекты аптамера RE31 на эту реакцию изучали, добавляя его в инкубационную смесь в различных концентрациях.

Модель тромбообразования *in vivo*. Исследование действия аптамера NH2-RE31-PEG на артериальное тромбообразование *in vivo* проводили на крысах, используя $FeCl_3$-модель [17], как подробно описано ранее [18]. У анестезированных с помощью препарата «Золетил» крыс самцов линии Sprague Dawley (из питомника лабораторных животных, г. Пущино, Московская обл.) весом 400–500 г изолировали каротидную артерию и повреждали сосуд наложением на 15 мин сегмента фильтровальной бумаги, смоченной раствором $FeCl_3$. $FeCl_3$ использовали в двух концентрациях – 20 и 40%. Аптамер NH2-RE31-PEG в различных концентрациях вводили внутривенно в виде однократного болюса через 5 мин после наложения $FeCl_3$. Кровоток регистрировали с помощью датчика Холла, наложенного выше места повреждения сосуда. В каждом эксперименте измеряли время полной остановки кровотока, проводя эксперимент в течение 60 мин после начала воздействия $FeCl_3$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Свойства антитромбиновых аптамеров с разной длиной дуплексной области. Стабильность структуры G-квадруплекса в серии антитромбиновых аптамеров, родственных RE31 с разной длиной дуплексной области (примеры – рис. 1) оценивали, измеряя температуру их плавления (50% снижение УФ-поглощения при 294 нм) в диапазоне от 25 до 45 °C. Уменьшение длины дуплексной области с 6 п.о. (RE31) до 5 (RE29) и 4 (RE27) п.о. приводило к резкому снижению, а увеличение до 7 (RE33) и 8 (RE35) п.о. существенно не изменяло температуру плавления аптамеров (рис. 2).

Антитромбиновую активность аптамеров изучали, используя коагуляционные тесты, тромбиновое время, протромбиновое время и АЧТВ. Образование фибрина в плазме крови в тесте тромбиновое время стимулируется экзогенно добавляемым тромбином, а в тестах протромбиновое время и АЧТВ – эндогенным тромбином, образующимся при активации свертывания по внешнему и внутреннему пути соответственно. Антикоагуляционная активность аптамеров в этих тестах проявляется в удлинении времени коагуляции, которое соотносили со временем коагуляции в контрольных образцах без аптамеров. Наиболее короткие аптамеры RE23 и RE25, содержащие в дуплексной области 2 и 3 п.о. соответственно, обладают наиболее низкой и приблизительно одинаковой антикоагуляционной активностью во всех тестах (рис. 3). Удлинение дуплексной области в аптамере RE27 до 4 п.о., а в аптамере RE29 до 5 п.о. последовательно приводит к существенному усилению антикоагуляцонной активности, которая сохраняется на приблизительно таком же уровне в аптамерах RE31, RE33 и RE35, содержащих 6, 7 и 8 п.о. соответственно (рис. 3).

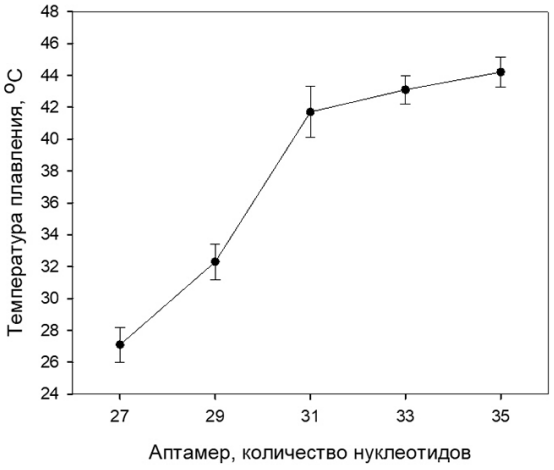

Рис. 2. Температура плавления аптамеров с измененной длиной дуплексной области. Тестируемые аптамеры RE27, RE29, RE31, RE33 и RE35 состоят из 27, 29, 31, 33 и 35 нуклеотидов и содержат в дуплексной области 4, 5, 6, 7 и 8 п.о. соответственно (примеры структуры см. рис. 1). По оси абсцисс – количество нуклеотидов в аптамерах. Представлены средние ± стандартные отклонения (n = 4)

Свойства антитромбиновых аптамеров, содержащих вставки в шарнирной области. Аптамеры SV32T1, SV32T2 и SV33TT по сравнению с аптамером RE31 содержали один (SV32T1 и SV32T2) или два (SV33TT) дополнительных тимидина (T), вставленных в шарнирную область слева, справа и с обеих сторон G-квадруплекса соответственно (рис. 1). Изменения шарнирной области приводили к снижению антикоагуляционной активности аптамеров по сравнению с аптамером RE31 в тестах тромбиновое время, протромбиновое время и АЧТВ (рис. 4).

Ингибирование генерации тромбина аптамером RE31. Для изучения влияния RE31 на дина-

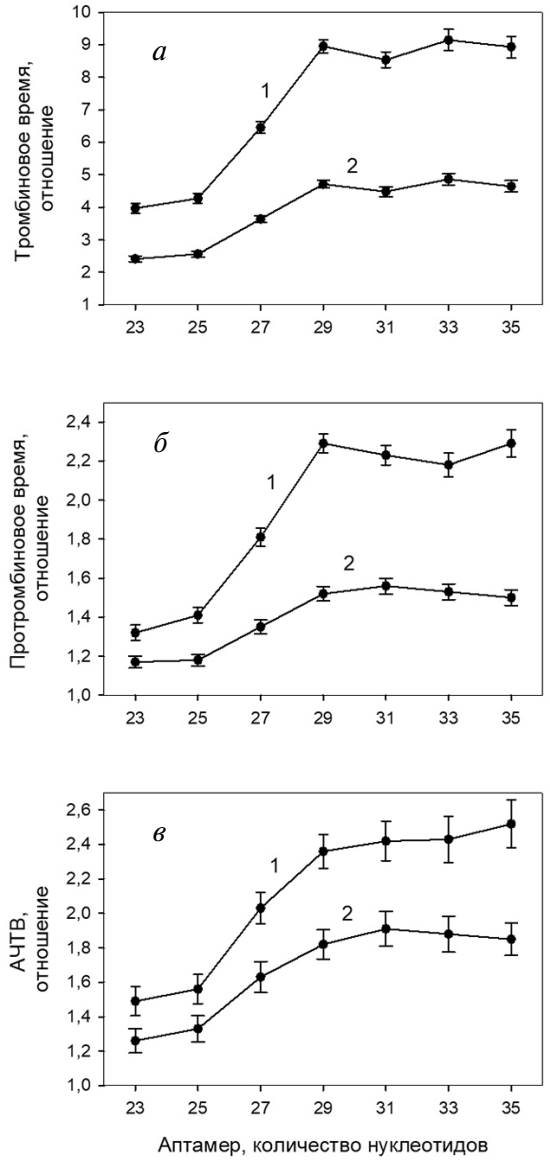

Рис. 3. Антикоагуляционные эффекты аптамеров с измененной длиной дуплексной области. Тестируемые аптамеры RE23, RE25, RE27, RE29, RE31, RE33 и RE35 состоят из 23, 25, 27, 29, 31, 33 и 35 нуклеотидов и содержат в дуплексной области 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 п.о. соответственно (примеры структуры см. рис. 1). По оси абсцисс – количество нуклеотидов в аптамерах. *а* – Тест тромбиновое время; *б* – тест протромбиновое время; *в* – тест АЧТВ. Эффекты аптамеров оценивали по отношению времени коагуляции (лаг-фазы) в образцах с аптамерами ко времени коагуляции в контрольных образцах (без аптамеров). Кривые: *1* – концентрация аптамеров 0,8 мкМ, кривые *2* – концентрация аптамеров 0,4 мкМ. Представлены средние ± стандартные отклонения ($n = 3$)

мику образования и инактивации тромбина использовали тест генерации тромбина. В этом тесте активность тромбина в плазме крови определяется по расщеплению флуорогенного низкомолекулярного субстрата, связывающегося только с активным центром фермента, на состояние которого аптамеры не влияют [5, 9, 12]. Как можно видеть из данных, представленных на рис. 5 и в таблице, с увеличением концентрации RE31 увеличивается продолжительность лаг-фазы и времени достижения пика активности тромбина. При этом наблюдается также и некоторое увеличение пиковой активности тромбина и эндогенного тромбинового потенциала, определяемого по площади под кривой, отражающей изменение активности тромбина во времени.

Потенцирование фибринолиза *in vitro* аптамером RE31. Для исследования профибринолити-

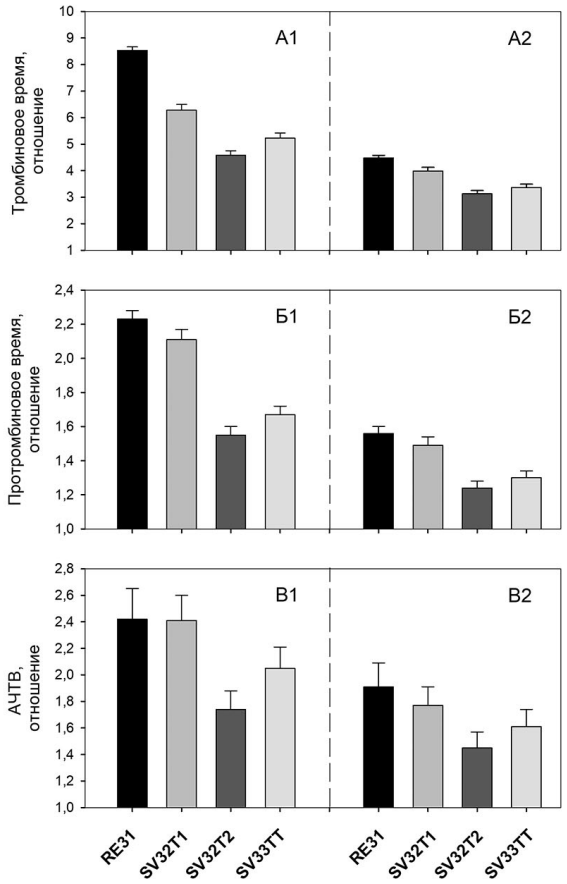

Рис. 4. Антикоаглуяционные эффекты аптамеров с измененной шарнирной областью. RE31 – аптамер сравнения, SV32T1, SV32T2 и SV32TT – аптамеры, содержащие в шарнирной области по одному дополнительному тимидину (справа и слева от G-квадруплекса) и два дополнительных тимидина соответственно (структуры – см. рис. 1). А1, А2 – тест тромбиновое время, Б1, Б2 – тест протромбиновое время, В1, В2 – тест АЧТВ. Эффекты аптамеров оценивали по отношению времени коагуляции (лаг-фазы) в образцах с аптамерами ко времени коагуляции в контрольных образцах (без аптамеров). А1, Б1, В1 – концентрация аптамеров 0,8 мкМ; А2, Б2, В2 – концентрация аптамеров 0,4 мкМ. Представлены средние ± стандартные отклонения ($n = 3$)

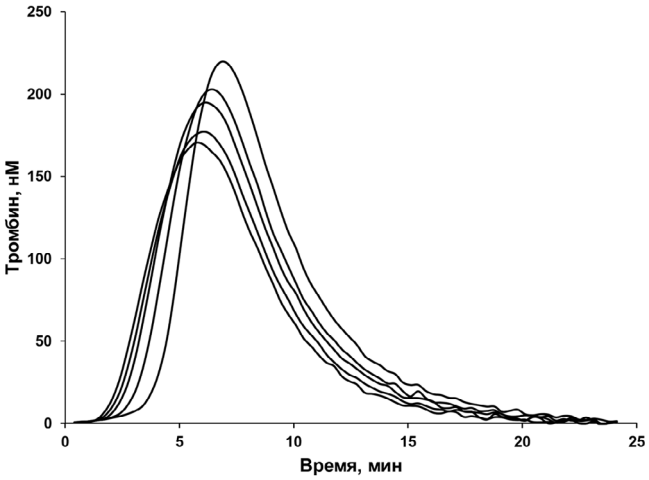

Рис. 5. Влияние аптамера RE31 на динамику образования и инактивации тромбина в тесте генерации тромбина. С увеличением концентрации RE31 (0, 0,625, 1,25, 2,5 и 5,0 мкМ) кривые смещаются вправо и вверх. Кривые представляют собой средние трех параллельных измерений в одном из трех воспроизводимых экспериментов, выполненных с использованием одного пула плазм доноров. Количественный анализ кривых генерации тромбина представлен в таблице

ческого действия аптамера RE31 использовали модификацию предложенного ранее турбидиметрического метода регистрации образования и лизиса сгустков плазмы *in vitro* [16]. Образование фибрина стимулировали тромбопластином, а его растворение тАП. В качестве положительного контроля использовали пептидный ингибитор карбоксипептидаз (PCI), который подавляет активность TAFI [19] и благодаря этому ускоряет растворение фибрина. Изменения поглощения (A450) в ходе реакции характеризуется наличием двух фаз – быстрого повышения, обусловленного образованием рассеивающего свет фибрина, и снижения, обусловленного его лизисом (рис. 6, *а*). С увеличением концентрации аптамера скорость образования фибрина уменьшается (увеличение времени достижения максимального значения A450, *t*A450 макс), а скорость его лизиса повышается (укорочение времени, в течение которого A450 снижается до 50% от максимального значения, *t* полулизиса) (рис. 6). Это свидетельствует о том, что аптамер не только замедляет образование фибрина, но и ускоряет лизис фибринового сгустка тАП. Профибринолитический эффект, близкий к максимальному, наблюдаемому в присутствии избытка PCI, достигается при концентрациях RE31 0,6–1,0 мкМ (рис. 6, *б*). В отдельном эксперименте с использованием хромогенного субстрата было показано, что аптамер RE31 способен ингибировать активацию TAFI комплексом тромбин–тромбомодулин (рис. 6, в).

Ингибирование тромбообразования аптамером NH2-RE31-PEG в модели *in vivo*. Для изучения эффектов аптамера RE31 в модели тромбообразования *in vivo* использовали его модифицированный вариант NH2-RE31-PEG, в котором для удлинения времени жизни в кровотоке 3′- и 5′-концы олигонуклеотида были защищены введением NH2-группы и PEG соответственно. Исследование антитромботических эффектов аптамера проводили на крысах, используя $FeCl_3$-модель артериального тромбоза. Как видно из рис. 7, у контрольных животных тромботическая окклюзия поврежденной $FeCl_3$ изолированной каротидной артерии наступала приблизительно через 12 и 18 мин при использовании 20%- и 40%-ного раствора $FeCl_3$ соответственно. При использовании $FeCl_3$ в обеих концентрациях NH2-RE31-PEG дозозависимо удлинял время тромботической окклюзии, а при максимальных дозировках полностью предотвращал остановку кровотока в течение времени эксперимента (60 мин). При повышении концентрации $FeCl_3$, т.е. при более выраженном повреждении артерии, увеличивались и дозировки NH2-RE31-PEG, необходимые для подавления тромбообразования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ДНК-аптамеры, содержащие в своем составе G-квадруплексную структуру, две T-T-петли и одну T-G-T-петлю, связываются с экзосайтом I

Действие аптамера RE31 на образование тромбина. Тест генерации тромбина

RE31, мкМ	0	0,625	1,25	2,5	5
Лаг-фаза, мин	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,7 ± 0,1	3,1 ± 0,1	4,1 ± 0,1
Время достижения пика тромбина, мин	5,8 ± 0,1	6,1 ± 0,33	6,3 ± 0,17	6,4 ± 0,1	7,1 ± 0,1
Пик тромбина (нМ)	170,0 ± 2,64	176,9 ± 9,94	194,7 ± 1,23	202,7 ± 4,88	218,8 ± 3,22
Эндогенный потенциал тромбина (нМ × мин)	1085,6 ± 10,3	1138,17 ± 73,7	1241,56 ± 19,0	1249,7 ± 40,14	1311,0 ± 13,3

Примечание. Представлены средние ± стандартные отклонения трех параллельных измерений в одном из трех воспроизводимых экспериментов.

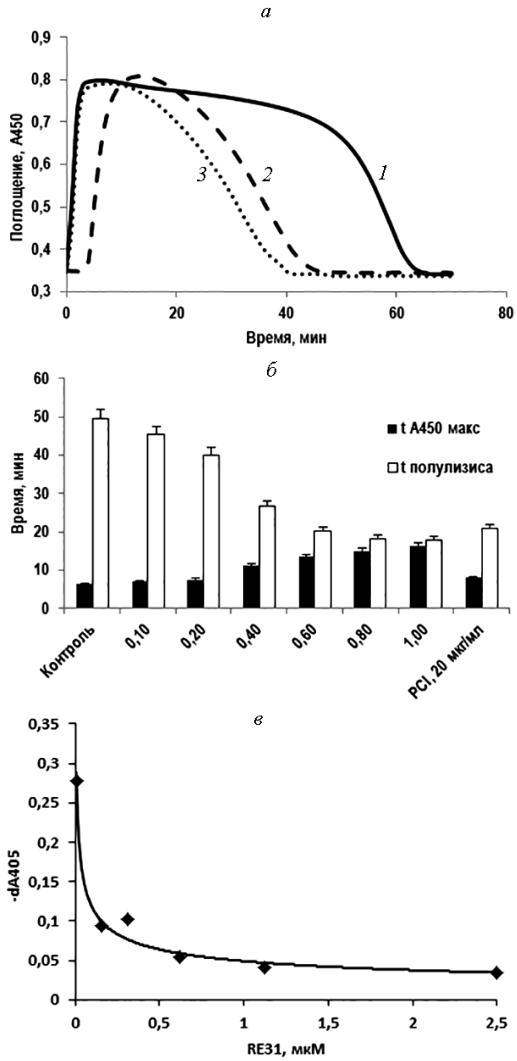

Рис. 6. Влияние аптамера RE31 на образование и лизис фибрина плазмы здоровых доноров *in vitro* и активацию TAFI. *а* – Графики изменения поглощения при 450 нм (A450). Во избежание перегрузки рисунка приведены только три кривые, демонстрирующие динамику образования и лизиса фибрина: *1* – контрольный образец; *2* – в присутствии 0,6 мкМ аптамера RE31; *3* – в присутствии 20 мкг/мл PCI, ингибитора карбоксипептидазной активности TAFI, в насыщающей концентрации. Представлены кривые, полученные в одном из трех воспроизводимых экспериментов; *б* – два основных количественных показателя, характеризующих динамику образования фибрина, – *t*A450 макс (время от запуска свертывания до достижения наибольшего значения A450, темные столбцы) и его лизис – *t* полулизиса (время от достижения A450 макс до снижения амплитуды на 50% от максимальной величины, светлые столбцы) в зависимости от концентрации RE31 (мкМ). Показаны также значения, полученные в присутствии 20 мкг/мл PCI. Представлены средние ± стандартные отклонения трех параллельных измерений в одном из трех воспроизводимых экспериментов; *в* – влияние аптамера RE31 на активацию TAFI из плазмы доноров комплексом тромбин–тромбомодулин. По оси ординат – уменьшение поглощения при 405 нм (-dA405 = A405 исходное – A405 10 мин), происходящее в результате расщепления пептидного хромогенного субстрата, по оси абсцисс – концентрация RE31. Представлены средние из двух–трех экспериментов

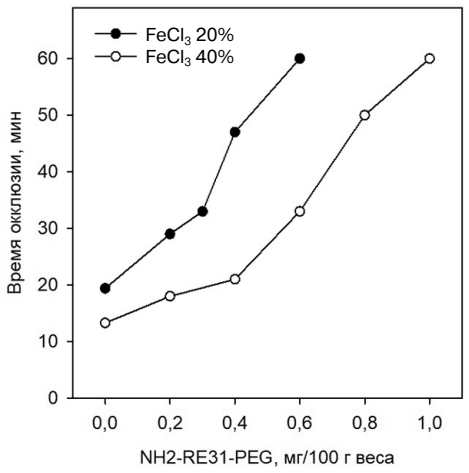

Рис. 7. Действие аптамера NH2-RE31-PEG на артериальное тромбообразование *in vivo*. Крысы, $FeCl_3$-модель. Регистрировали время тромботической окклюзии поврежденной $FeCl_3$ каротидной артерии крыс. Аптамер NH2-RE31-PEG вводили внутривенно в виде болюса в указанных концентрациях. $FeCl_3$ использовали в двух концентрациях – 20% (черный кружок) и 40% (бесцветный кружок). Представлены средние двух–трех экспериментов (для каждой концентрации $FeCl_3$ и аптамера)

тромбина. Они препятствуют взаимодействию с экзосайтом I субстратов тромбина – фибриногена и PAR-рецепторов и благодаря этому подавляют стимулированные тромбином образование фибрина и агрегацию тромбоцитов [5–9]. Ранее нами был синтезирован аптамер с условным названием RE31 (5′-GTGACGTAGGTTG-GTGTGGTTGGGGCGTCAC-3′), в котором к G-квадруплексу были последовательно присоединены шарнирная структура, содержащая четыре непарных нуклеотида, и дуплексная структура, содержащая 6 пар комплементарных оснований [10]. Этот аптамер обладал большей антикоагуляционной активностью по сравнению как с базовым аптамером 15TBA, в состав которого входит только G-квадруплекс, T-T и T-G-T-петли (5′-GGTTGGTGTGGTTGG-3′), так и по сравнению с еще одним 31-звенным аптамером (5′-CACTGGTAGGTTGGTGTGGTTGGGGC-CAGTG-3′), одним из наиболее активных из описанных в литературе антитромбиновых аптамеров [9, 10, 12].

В настоящей работе сравнивали свойства аптамера RE31 и его аналогов, в которых: 1) была изменена длина дуплексной области, и 2) были введены вставки в шарнирную область (рис. 1). Сравнительный анализ показал, что аптамер RE31 имеет оптимальную структуру с точки зрения сохранения стабильности (температура плавления) и проявления антитромбиновой (антикоагуляционной) активности в тестах тромбиновое время, протромбиновое время и

АЧТВ. Уменьшение длины дуплексной области с 6 п.о. (RE31) до 5 и 4 приводили к резкому снижению температуры плавления, а до 4, 3 и 2 п.о. – к существенной потере антикоагуляционной активности. Эти данные соответствуют результатам работы Spiridonova et al. [20], в которой методом поверхностного плазмонного резонанса было показано, что укорочение дуплексной области в аналогах RE31 вызывает снижение их сродства к тромбину и протромбину. В то же время удлинение дуплексной области с 6 (RE31) до 7 и 8 п.о. не приводили к существенному изменению стабильности и активности аптамеров. В аптамере RE31 переход от G-квадруплексного к дуплексному участку включает четыре непарных нуклеотида, образующих шарнирную область. Введение дополнительных нуклеотидов (тимидинов) в шарнирную область слева (аптамер SV32T1), справа (аптамер SV32T2) и по обеим сторонам (аптамер SV33TT) G-квадруплекса (рис. 1) приводило к снижению антитромбиновой активности аптамеров. Эти результаты указывают на то, что размер шарнирной области (изменяющийся при введении дополнительных оснований) влияет на взаимодействие аптамера с тромбином. Они также согласуются с данными рентгеноструктурного анализа комплекса RE31-тромбин, показавшими, что три нуклеотида в шарнирной области G24-A8-G25 образуют лестницу перехода от квадруплекса к дуплексу, т.е. жестко структурируют данный район с помощью стэкинг-взаимодействия [8].

В следующей части работы мы более подробно изучали антитромботические эффекты аптамера RE31, используя тест генерации тромбина, модель фибринолиза *in vitro* и модель тромбообразования *in vivo*.

Аптамер RE31 замедлял образование тромбина (удлинение лаг-фазы и времени достижения пика активности), что согласуется с данными, полученными Kretz et al. [21, 22] при изучении базового антитромбинового аптамера 15TBA. Удлинение временных показателей генерации тромбина может быть обусловлено двумя причинами: 1) снижением скорости активации протромбина и/или 2) снижением скорости активации факторов V и VIII, посредством которых тромбин усиливает свое образование [21–23]. Другой проявившейся в тесте генерации тромбина особенностью механизма действия RE31 является повышение пика активности тромбина и эндогенного тромбинового потенциала. Эти показатели определяются по расщеплению синтетического флуорогенного субстрата, который связывается только с активным центром тромбина. Похожие эффекты были зарегистрированы при использовании низких концентраций аптамера 15TBA и *C*-концевого фрагмента гирудина (Hir 54–65(SO^{3-})), которые связываются только с экзосайтом I [21]. Объяснением этих эффектов может быть аллостерическое влияние связывания низкомолекулярных лигандов (аптамеров и фрагмента гирудина) с экзосайтом I тромбина на структуру активного центра, в результате которых может изменяться скорость расщепления тромбином синтетических субстратов, что было показано в ряде исследований [24, 25].

Исследование эффектов аптамера RE31 на лизис фибрина в модели *in vitro* показали, что он не только замедляет образование фибрина (за счет подавления активности тромбина), но и ускоряет его расщепление тАП. Одним из возможных объяснений этого эффекта может быть продемонстрированное в работе ингибирование аптамером активации TAFI. В пользу этого предположения также свидетельствует то, что с увеличением концентрации RE31 время полулизиса сокращается до значения, наблюдаемого в присутствии избытка PCI, ингибитора карбоксипептидазной активности TAFI [19], который не влияет на образование фибрина (восходящие части кривых *1* и *3* на рис. 6, *а*, характеризующие образование фибринового сгустка в отсутствии и присутствии PCI, практически совпадают).

Антитромботическую активность аптамера RE31 (модифицированный вариант с защищенными 3′ и 5′ концами) в условиях *in vivo* изучали, используя модель тромбообразования у крыс. Изолированную артерию повреждали $FeCl_3$, что приводило ее к полной окклюзии образовавшимся тромбом. Внутривенное введение аптамера удлиняло время тромботической окклюзии, а при использовании высоких дозировок полностью предотвращало тромбообразование.

Аптамер RE31 (по сравнению со своими аналогами) обладает оптимальной структурой с точки зрения стабильности и проявления антикоагуляционной активности. Этот аптамер замедляет образование тромбина в тесте генерации тромбина, ускоряет фибринолиз в модели *in vitro* и подавляет тромбообразование в модели *in vivo*. Аптамер RE31 может рассматриваться как кандидат для создания на его основе эффективного антитромботического препарата.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований, в которых в качестве объектов были использованы люди. Работу с лабораторными животными

проводили в соответствии с требованиями Комиссии по биоэтике НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского. Все манипуляции выполняли в соответствии с руководством Федерации европейских научных ассоциаций по лабораторным животным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Keefe, A.D., Pai, S., and Ellington, A. (2010) Aptamers as therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**, 537–550, doi: 10.1038/nrd3141.
2. Ni, X., Castanres, M., Mukherjee, A., and Lupoid, S.E. (2011) Nucleic acid aptamers: clinical application and promising new horizons, *Curr. Med. Chem.*, **18**, 4206–4214.
3. Li, W., Wang, K., Zhao, M., Yang, X., Chen, M., and Lan, X. (2014) Development of aptamer oligonucleotides as anticoagulants and antithrombotics for cardiovascular diseases: current status, *Thromb. Res.*, **134**, 769–773, doi: 10.1016/j.thromres.2014.05.021.
4. Crawley, J.T., Zanardelli, S., Chion, C.K., and Lane, D.A. (2007) The central role of thrombin in hemostasis, *J. Thromb. Haemost.*, **5**, 95–101, doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02500.x.
5. Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J.A., Vermaas, E.H., and Toole, J.J. (1992) Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin, *Nature*, **355**, 564–566, doi: 10.1038/355564a0.
6. Macaya, R.F., Schultze, P., Smith, F.W., Roe, J.A., and Feigon, J. (1993) Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3745–3749, doi: 10.1073/pnas.90.8.3745.
7. Padmanabhan, K.P., Ferrara, J.D., Sadker, J.E., and Tulinsky, A. (1993) The structure of α-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer, *J. Biol. Chem.*, **268**, 17651–17654, doi: 10.2210/pdb1hut/pdb.
8. Russo Krauss, I.R., Spiridonova, V., Pica, A., Napolitano, V., and Sica, F. (2016) Different duplex/quadruplex junctions determine the properties of anti-thrombin aptamers with mixed folding, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 983–991, doi: 10.1093/nar/gkv1384.
9. Добровольский А.Б., Титаева Е.В., Хаспекова С.Г., Спиридонова В.А., Копылов А.М., Мазуров А.В. (2009) Ингибирование активности тромбина ДНК аптамерами, *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.*, **148**, 41–45.
10. Спиридонова В.А., Головин А.В., Копылов А.М., Добровольский А.Б., Мазуров А.В. (2010) Аптамерный олигонуклеотид – прямой ингибитор тромбина. Патент РФ № 2401306, *Бюлл. изобретений*, **28**.
11. Russo Krauss, I., Napolitano, V., Petraccone, L., Troisi, R., Spiridonova, V., Mattia, C.A., and Sica, F. (2018) Duplex/quadruplex oligonucleotides: role of the duplex domain in the stabilization of a new generation of highly effective anti-thrombin aptamers, *Int. J. Biol. Macromol.*, **107** (Pt B), 1697–1705, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.033.
12. Мазуров А.В., Титаева Е.В., Хаспекова С.Г., Сторожилова А.Н., Спиридонова В.А., Копылов А.М., Добровольский А.Б. (2010) Свойства нового ДНК аптамера – прямого ингибитора тромбина, *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.*, **150**, 394–397.
13. Спиридонова В.А., Головин А.В., Копылов А.М., Добровольский А.Б., Мазуров А.В. (2011) Модифицированные ДНК аптамеры, ингибирующие активность тромбина. Патент РФ № 2410432, *Бюлл. изобретений*, **3**.
14. Nagatoishi, S., Tanaka, Y., and Tsumoto, K. (2007) Circular dichroism spectra demonstrate formation of the thrombin-binding DNA aptamer G-quadruplex under stabilizing-cation-deficient conditions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **352**, 812–817, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.11.088.
15. Dolinnaya, N.G., Ogloblina, A.M., and Yakubovskaya, M.G. (2016) Structure, properties, and biological relevance of the DNA and RNA G-quadruplexes: Overview 50 years after their discovery, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1602–1649, doi: 10.1134/S0006297916130034.
16. Mutch, N.J., Thomas, L., Moore, N.R., Lisiak, K.M., and Booth, N.A. (2007) TAFIa, PAI-1 and a2-antiplasmin: complementary roles in regulating lysis of thrombi and plasma clots, *J. Thromb. Haemost.*, **5**, 812–817, doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02430.x.
17. Kurz, K.D., Main, B.W., and Sandunsky, G.E. (1990) Rat model of arterial thrombosis by ferric chloride, *Thromb. Res.*, **15**, 269–280.
18. Maksimenko, A.V., Golubykh, V.L., and Tischenko, E.G. (2003) Catalase and chondroitin sulfate derivatives against thrombotic effect induced by reactive oxygen species in a rat artery. *Metab. Eng.*, **5**, 177–182.
19. Bouma, B.N., and Meijers, J.C.M. (2003) Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U), *J. Thromb. Haemost.*, **1**, 1566–1574.
20. Spiridonova, V.A., Barinova, K.V., Glinkina, K.A., Melnichuk, A.V., Gainutdynov, A.A., Safenkova, I.V., and Dzantiev, B.B. (2015) A family of DNA aptamers with varied duplex region length that forms complexes with thrombin and prothrombin, *FEBS Lett.*, **589**, 2043–2049, doi: 10.1016/j.febslet.2015.06.020.
21. Kretz, C.A., Cuddy, K.K., Stafford, A.R., Fredenburgh, J.C., Roberts, R., and Weitz, J.I. (2010) HD1, a thrombin- and prothrombin-binding DNA aptamer, inhibits thrombin generation by attenuating prothrombin activation and thrombin feedback reactions, *Thromb. Haemost.*, **103**, 83–93, doi: 10.1160/TH09-04-0237.
22. Kretz, C.A., Stafford, A.R., Fredenburgh, J.C., and Weitz, J.I. (2006) HD1, a thrombin-directed aptamer, binds exosite 1 on prothrombin with high affinity and inhibits its activation by prothrombinase, *J. Biol. Chem.*, **281**, 37477–37485, doi: 10.1074/jbc.M607359200.
23. Bukys, M.A., Orban, T., Kim, P.Y., Beck, D.O., Nesheim, M.E., and Kalafatis, M. (2006) The structural integrity of anion binding exosite I of thrombin is required and sufficient for timely cleavage and activation of factor V and factor VIII, *J. Biol. Chem.*, **281**, 18569–18580, doi: 10.1074/jbc.M600752200.
24. Petrera, N.S., Stafford, A.R., Leslie, B.A, Kretz, C.A., Fredenburgh, J.C., and Weitz, J.I. (2009) Long range communication between exosites 1 and 2 modulates thrombin function, *J. Biol. Chem.*, **284**, 25620–25629, doi: 10.1074/jbc.M109.000042.
25. Tan, X., Dey, S.K., Telmer, C, Zhang, X., Armitage, B.A., and Bruchez, M.P. (2014) Aptamers act as activators for the thrombin mediated-hydrolysis of peptide substrates, *Chembiochem*, **15**, 205–208, doi: 10.1002/cbic.201300693.

DNA APTAMERS TO THROMBIN EXOSITE I. STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS AND ANTITHROMBOTIC EFFECTS

V. A. Spiridonova[1], T. M. Novikova[1], V. A. Sizov[1], V. S. Shashkovskaya[1], E. V. Titaeva[2], A. B. Dobrovolsky[2], E. B. Zharikova[2], and A. V. Mazurov[2]*

[1] *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia*

[2] *National Medical Research Center for Cardiology, Russian Ministry of Health, 121552 Moscow, Russia; E-mail: avmazurov@list.ru*

Received April 18, 2019
Revised July 11, 2019
Accepted July 11, 2019

DNA aptamers (oligonucleotides) interacting with thrombin exosite I have in their structure G-quadruplex, two T-T and one T-G-T loops. They prevent exosite I binding with fibrinogen and thrombin receptors on platelet surface, thus suppressing thrombin-stimulated fibrin formation and platelet aggregation. Earlier we synthesized original antithrombin aptamer RE31 (5′-GTGACGTAGGTTGGTGTGGTTGGGGCGTCAC-3′), which besides G-quadruplex, contained a hinge region connected with six pairs of complementary nucleotide bases (a duplex region). In the present study we compared properties of aptamer RE31 and its analogues having various numbers of base pairs in the duplex region or nucleotide insertions in the hinge region. Reduction of a number of nucleotides in the duplex region by 1-4 pairs (in comparison with RE31) decreased stability of aptamers' structure (lowering melting temperature) as well as decreased their ability to inhibit thrombin-stimulated fibrin formation in human blood plasma in the tests of thrombin time, prothrombin time, and activated partial thromboplastin time. However, an increase in a number of bases by 1-2 pairs did not cause significant changes of stability and antithrombin activity of aptamers. Insertions into the hinge region of RE31 aptamer resulted in a decrease in its antithrombin activity. Studies of RE31 antithrombotic properties have shown that it (i) slowed thrombin formation in human blood plasma (a thrombin generation test), (ii) accelerated lysis of fibrin clot in an *in vitro* model, and (iii) suppressed arterial thrombosis in an *in vivo* model. Based on presented data aptamer RE31 could be considered as a potentially effective antithrombotic compound.

Keywords: aptamers, thrombin, thrombosis, fibrinogen, fibrinolysis