

АПТАМЕРЫ — НОВЫЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СУБСТАНЦИИ ДЛЯ АНТИКОАГУЛЯНТОВ

А.В. МАЗУРОВ¹, д.м.н., профессор, В.А. СПИРИДОНОВА²

Аптамеры представляют собой новый класс олигонуклеотидных соединений, способных специфически взаимодействовать с различными молекулярными мишенями и ингибировать их активность. Аптамеры получают путем отбора из библиотеки случайно синтезированных олигонуклеотидов (длина от 20 до 60 нуклеотидов) по их способности к связыванию с молекулой-мишенью. В дальнейшем такие первичные аптамеры могут быть химически модифицированы с целью оптимизации их структуры и повышения стабильности. Аптамеры принято считать химическими (олигонуклеотидными) аналогами моноклональных антител, т. к. они обладают близкими к антителам показателями специфичности и сродства (аффинности) по отношению к своим мишеням. Аптамеры ак-

тивно используются для создания фармакологических препаратов. Как фармакологические субстанции они обладают рядом преимуществ перед антителами и другими белковыми молекулами. Аптамеры практически неиммуногенны, они синтезируются химическим путем без использования биологических продуцентов, и для них могут быть легко созданы антидоты на основе комплементарных последовательностей. В обзоре рассматриваются работы, направленные на создание новых антикоагулянтных препаратов аптамерной природы. Наиболее подробные исследования, как доклинические, так и клинические (в рамках различных фаз клинических испытаний), были выполнены при изучении аптамеров против фактора Виллебранда, фактора IX и тромбина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антитромботические препараты, антикоагулянты, аптамеры, фактор Виллебранда, фактор IX, тромбин

Работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации (НИР №115061870025).

Аптамеры представляют собой одноцепочечные, короткие ДНК или РНК олигонуклеотиды (обычно не более 50–60 нуклеотидных остатков), которые благодаря возможности образовывать сложные пространственные конформации обладают способностью к специфическому взаимодействию с различными молекулами. Некоторые аптаме-

ры могут также ингибировать функциональную активность своих молекулярных мишеней. Название «аптамер» происходит от латинского слова «aptus» — подходить, соответствовать [1–3].

Первичные аптамеры получают с помощью метода SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment, системная эволюция лигандов с помощью экспоненциального обогащения) путем их отбора из библиотеки случайно синтезированных олигонуклеотидов по способности к связыванию с молекулой-мишенью. Библиотеки со случайной (рандо-

¹ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава России

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

мизированной) последовательностью ДНК или РНК синтезируются в автоматических синтезаторах с использованием на каждом шаге синтеза вместо индивидуальных нуклеотидов их смесей. Случайный (рандомизированный) участок, как правило, составляет 20–60 нуклеотидов. С обеих сторон он обрамлен известными последовательностями, которые нужны для амплификации олигонуклеотидов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Каждая такая библиотека может включать до 10^{13} – 10^{15} индивидуальных последовательностей. Ключевым этапом является анализ связывание олигонуклеотидов из библиотеки с иммобилизированной молекулой-мишенью. На этом этапе из множества последовательностей отбирают только те, которые специфически взаимодействуют с мишенью. Затем отобранные молекулы амплифицируют с помощью ПЦР. Цикл селекции повторяют несколько раз, получая в итоге аптамеры с наиболее высоким сродством к мишени. Впоследствии структуры первичных аптамеров могут быть оптимизированы с помощью методов компьютерного моделирования. Такие процедуры позволяют сконструировать наиболее короткие аптамеры с наиболее высокой способностью к связыванию с молекулой-мишенью. Кроме этого, аптамеры могут быть химически модифицированы, например, с целью увеличения их стабильности (см. ниже) [1–3].

Аптамеры по показателям специфичности и сродства к молекулам-мишеням близки к моноклональным антителам. В связи с этим иногда их называют химическими, (олигонуклеотидными) аналогами антител. Как и моноклональные антитела, аптамеры используют в исследовательских целях для детекции и блокирования функции биологически активных молекул, а также в фармакологии — в качестве субстанций для лекарственных препаратов. Как фармакологические субстанции аптамеры

обладают рядом преимуществ по сравнению с антителами и другими белковыми молекулами. Во-первых, в отличие от антител и других белков, они практически неиммуногенны и не вызывают аллергических реакций. Кроме того, они синтезируются химическим путем без использования клеточных или бактериальных продуцентов, что существенно облегчает процесс их очистки. К преимуществам лекарственных аптамеров также можно отнести возможность создания быстродействующих антидотов на основе последовательностей, комплементарных используемому аптамеру. Такие антидоты могут быть использованы в клинике при развитии нежелательных побочных эффектов в результате действия аптамерных препаратов. Так как аптамеры быстро выводятся из кровотока, для создания фармакологических препаратов их обычно модифицируют с целью увеличения стабильности и времени жизни в крови и других биологических жидкостях. Это достигается с помощью введения в их состав модифицированных и устойчивых к действию нуклеаз нуклеотидных остатков, а также защитных химических группировок, которые обычно присоединяют по концам первичной последовательности. Кроме того, для замедления выведения аптамеров через почки можно увеличить их молекулярную массу, что обычно достигается прикреплением к одному из концов олигонуклеотида (обычно 5') высокомолекулярного (10–40 кДа) полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG). Такие аптамеры иногда называют пегилированными [1–3].

Первым лекарством, созданным на основе аптамеров, был препарат пегатаниб (pegaptanib) – пегилированный аптамер, блокирующий фактор роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) и разрешенный в 2004 г. к применению в офтальмологии для лечения влажной макулодистрофии сетчатки. В настоящее время на различных стади-

ях клинических испытаний находятся десятки аптамерных препаратов, предлагаемых для лечения онкологических, сердечно-сосудистых, воспалительных и других заболеваний. Для применения в качестве антикоагулянтов разрабатываются аптамеры против фактора Виллебранда, фактора IX и тромбина [1–4].

Аптамер против фактора Виллебранда

Фактор Виллебранда (фВБ) — это мультимерный гликопротеин (ГП), состоящий из мономерных 250-кДа субъединиц (от двух до нескольких десятков) и имеющий молекулярную массу от 500 до 20000 кДа. Этот белок циркулирует в плазме крови в комплексе с фактором VIII. Кроме плазмы, фВБ содержится в тромбоцитах, эндотелиальных клетках и субэндотелиальном матриксе сосудистой стенки. Синтезируется фВБ эндотелиальными клетками и мегакариоцитами. Основным источником плазменного фВБ являются эндотелиальные клетки, постоянно секретирующие этот белок. Провоспалительная и протромботическая активация эндотелия повышает уровень секреции фВБ. Локализованный в сосудистой стенке фВБ также продуцируется эндотелиальными клетками. Тромбоциты, которые содержат фВБ, синтезированный мегакариоцитами, могут секретировать его при активации различными протромбогенными агонистами. Главные функции фВБ: 1) обеспечение первичной адгезии (прикрепления) тромбоцитов к поврежденным участкам сосудистой стенки путем взаимодействия с тромбоцитарным рецептором — ГП Ib, 2) защита фактора VIII от действия протез. При существенном сужении просвета артериальных сосудов (в результате стенозирования и/или спазма), т. е. в условиях кровотока, характеризующихся высокими скоростями сдвига (различия в скоростях движения слоев жидкости относительно друг друга), фВБ, взаимодействуя с ГП Ib и ГП IIb-IIIa, может самостоятельно стимулировать не только

адгезию, но и активацию и последующую агрегацию тромбоцитов [5].

Аптамер ARC1779 направлен против A1 домена в фВБ — участка белка, обеспечивающего его связывание с ГП Ib. Блокада этого домена предотвращает взаимодействие фВБ с тромбоцитами и, соответственно, фВБ-зависимые адгезию, активацию и агрегацию тромбоцитов. ARC1779 был создан путем модификации первичного аптамера ARC1172, также направленного против A1 домена фВБ. ARC1779 представляет собой ДНК/РНК олигонуклеотид, состоящий из 40 нуклеотидных остатков, многие из которых модифицированы для повышения резистентности аптамера к действию нуклеаз. К 3'-концу олигонуклеотида для его защиты прикреплен инвертированный дезокситимидин, а к 5'-концу — 20-кДа ПЭГ, как для защиты, так и для увеличения молекулярной массы аптамера (олигонуклеотид имеет мол. массу ~ 13 кДа) и замедления его выведения из кровотока [6–8].

Доклинические исследования ARC1779 в моделях *in vitro* и *ex vivo* доказали его способность эффективно ингибировать фВБ-зависимую адгезию тромбоцитов к коллагену и субэндотелиальному матриксу сосудов, а также фВБ-зависимую агрегацию в условиях высоких скоростей сдвига. При этом ARC1779 не влиял на агрегацию тромбоцитов, индуцированную такими агонистами, как АДФ и арахидоновая кислота. В модели тромбоза на обезьянах ARC1779 предотвращал образование окклюзивных тромбов после повреждения каротидных артерий [6–8].

Первая фаза клинических испытаний ARC1779 проводилась в группе здоровых добровольцев с целью оценки безопасности его внутривенного введения и первичного исследования фармакокинетики и фармакодинамики. Введение ARC1779 в дозах до 1 мг/кг (расчет доз для ARC1779 проводился по массе олигонуклеотида без учета массы ПЭГ) хорошо переносилось

испытуемыми. Несмотря на дозозависимое удлинение времени кровотечения при стандартизованном повреждении кожи, ни у одного из добровольцев не наблюдалось геморрагических осложнений. В то же время в дозах 0,3—1,0 мг/кг, позволяющих достичь концентрации аптамера в плазме крови от 3 мкг/мл и выше, у испытуемых наблюдалась практически полная блокада активности циркулирующего фВБ. Ингибирование активности фВБ сопровождалось резким и насыщаемым (при высоких дозировках) удлинением времени остановки тока крови («closure time») через специальный картридж, покрытый коллагеном и АДФ, в приборе PFA (Platelet Function Analyzer, анализатор функции тромбоцитов), что свидетельствовало о подавлении фВБ-зависимых реакций тромбоцитов. Благодаря защитным модификациям аптамера и присоединению 20-кДа ПЭГ, время полужизни ($t_{1/2}$) ARC1779 составило около 2 часов после болюсного введения (немодифицированные аптамеры обычно выводятся из кровотока в течение 10—15 мин) [9].

Дальнейшие клинические испытания ARC1779 в рамках фазы II проводились по двум основным направлениям. Во-первых, в небольших группах больных с редкими заболеваниями, обусловленными патологически высокой активностью фВБ, к которым относятся тромбоцитопеническая пурпура (ТТП) и болезнь Виллебранда 2b-типа. Повышенная активность фВБ при ТТП обусловлена появлением в кровотоке сверхкрупных мультимеров этого белка в связи со снижением содержания протеазы ADAMTS-13, в нормальных условиях разрушающей такие мултимеры [10], а при болезни Виллебранда 2b-типа — мутациями в A1 домене белка, повышающими его сродство к GPIIb [11]. В обоих случаях это приводит к образованию внутрисосудистых тромбоцитарных агрегатов/тромбов, образующих-

ся вследствие спонтанного взаимодействия тромбоцитов с патологически активным фВБ, и снижению числа циркулирующих тромбоцитов (тромбоцитопении). Введение ARC1779 таким больным показало его безопасность, в том числе с точки зрения геморрагических осложнений, и эффективность ингибирования аптамером активности патологически измененного фВБ у этих больных. В этих же исследованиях была продемонстрирована способность ARC1779 повышать количество тромбоцитов как при ТТП (у 5 из 7 включенных в исследование пациентов), так и при болезни Виллебранда 2b-типа (у всех трех обследованных больных) [12, 13].

Второе направление клинических испытаний ARC1779 было связано с изучением антитромботических свойств ARC1779 в небольшой группе больных (по 18 больных в группе ARC1779 и контрольной группе), которым проводили каротидную эндалтерэктомию. Практически все больные (как в группе ARC1779, так и в контрольной группе) принимали аспирин и/или дипиридамол. Было показано, что ингибирование активности фВБ на фоне введения аптамера снижало количество микроэмболизаций сосудов головного мозга после проведения процедуры. Несмотря на хороший общий профиль безопасности, у нескольких больных на фоне введения ARC1779 отмечалось повышение кровоточивости — мелкие кровотечения у 6 и крупное кровотечение у 1 из 18 испытуемых [14].

Все клинические исследования ARC1779 были проведены и опубликованы до конца 2012 г. Причины остановки дальнейших исследований остаются неясными. В частности, были прерваны испытания аптамера при проведении каротидной эндалтерэктомии и так и не были начаты запланированные испытания у больных с инфарктом миокарда при проведении чрескожных коронарных вмешательств

(ЧКВ). Так как в уже проведенных исследованиях была убедительно показана возможность ингибирования активности фВБ с помощью аптамера ARC1779, а с точки зрения безопасности его введение не вызывало серьезных вопросов, можно предположить, что остановка работ по этому препарату была, скорее всего, обусловлена фармакоэкономическими соображениями. Таким образом, на сегодняшний день антитромботические эффекты блокирования взаимодействия фВБ с тромбоцитами (как аптамерами, так и другими ингибиторами) остаются по-прежнему не изученными в рамках широких клинических исследований (фазы IIb и III).

Аптамер против фактора IX

Фактор IX, как и другие протеазы свертывающего каскада, присутствует в крови в виде неактивного профермента (зимогена). Активация фактора IX осуществляется активированным фактором XI (внутренний или контактный путь активации свертывания) или активированным фактором VII в комплексе с тканевым фактором (ТФ) (внешний путь активации свертывания или путь ТФ). Главная функция фактора IX в системе коагуляции крови — активация фактора X. Активированный фактор IX на поверхности отрицательно заряженных фосфолипидов (предоставляемых в основном активированными тромбоцитами) образует с фактором X и при участии активированного фактора VIII (кофактора) и ионов кальция так называемый внутренний (intrinsic) теназный (X-азный) комплекс (внешний теназный комплекс формируется фактором X и активированным фактором VII). Образующийся при работе теназных комплексов активированный фактор X, в свою очередь, катализирует превращение протромбина в тромбин [15].

RB006 (пегнивакожен, «pegnivacogen») представляет собой модифицированный РНК олигонуклеотид, состоящий из 31 нуклеотида и защищенный с 3'-конца инвертированным дезо-

кситимидином. К 5'-концу олигонуклеотида для его защиты и увеличения общей массы молекулы присоединен 40 кДа ПЭГ (масса немодифицированного аптамера ~ 10 кДа). RB006 предлагается применять в клинической практике вместе с его антидотом — RB007 (анивамерсен, «anivamersen»), комплементарным олигонуклеотидом (15 нуклеотидных остатков), который используется для контролируемого прекращения действия RB006. RB006 и RB007 совместно называют REG1-антикоагулянтной системой [16].

В доклинических исследованиях было продемонстрировано, что аптамер против фактора IX как *in vitro*, так и при введении лабораторным животным удлиняет время свертывания в тестах: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и активированное время свертывания (АВС), т. е. в тестах внутреннего пути, но не влияет на время свертывания в тесте протромбинового времени (ПТВ), т. е. в тесте внешнего ТФ-зависимого пути. Также было установлено, что введение антидота (комплементарная последовательность) полностью блокирует действие антиIX-аптамера. В этих исследованиях аптамер против фактора IX с условным названием 9.3t. Этот аптамер имеет сходную с RB006 олигонуклеотидную последовательность, но содержит на 5'-конце не высокомолекулярный ПЭГ, а холестерин [17, 18].

Первая фаза клинических исследований REG1-системы (исследование Regado 1a), проводимая на здоровых добровольцах, продемонстрировала безопасность ее применения, эффективность подавления активности IX-фактора с помощью RB006 и возможность блокировки его действия с помощью RB007. Введение RB006 в виде однократного болюса в дозах до 90 мг (для RB006 дозировки рассчитывались по общей массе препарата с учетом 40 кДа ПЭГ) сопровождалось дозозависимым уд-

линием АЧТВ — до 3 раз при максимальных дозировках. В связи с присоединением крупного 40 кДа ПЭГ RB006 достаточно медленно выводился из кровотока — $t_{1/2} \sim 10$ час. Однако введение RB007 через 3 часа после введения RB006 (в двукратных весовых дозировках по сравнению с RB006) контролируемо блокировало действие последнего и приводило к восстановлению нормальных значений АЧТВ [16]. Аналогичные результаты были получены и в рамках фазы 1b, выполненной на больных со стабильной стенокардией, получавших (в отличие от добровольцев) стандартную одинарную или двойную антитромбоцитарную терапию. Введение RB006 в дозах до 75 мг/кг хорошо переносилось пациентами, и ни у одного из них не было зафиксировано крупных геморрагических осложнений. RB006 дозозависимо удлинит АЧТВ и АВС, а RB007 полностью блокировал активность основного аптамера [19].

Вторая фаза клинических испытаний системы REG1 была выполнена в группе больных с ИБС, которым проводилось ЧКВ. Введение RB006/RB007 сравнивали по показателям безопасности и эффективности с введением гепарина. В небольшую 2a-фазу было включено 26 стабильных больных, которым проводилось плановое ЧКВ. Основную группу составили 22 пациента, которые получали RB006 и RB007, а контрольную группу — 4 пациента, получавшие в качестве антикоагулянтной терапии нефракционированный гепарин. В качестве антитромбоцитарной терапии все пациенты получали аспирин и клопидогрел, а первые 2 пациента, которым вводился аптамер, в целях усиления антитромботической терапии (на фоне отсутствия гепарина) еще и антагонисты ГП IIb-IIIa. Исследования показали безопасность болюсного введения RB006 в дозе 1 мг/кг непосредственно перед выполнением ЧКВ в двух вариантах последующего ингибирования

его действия с помощью RB007 — (1) частичное ингибирование после проведения ЧКВ + полное ингибирование через 4 часа после ЧКВ и (2) полное ингибирование сразу после ЧКВ [20]. В 2b-фазу (исследование RADAR) было включено 640 пациентов с ОКС без подъема сегмента ST. Все больные получали адекватную антитромбоцитарную терапию (аспирин, антагонисты P2Y₁₂-рецепторов АДФ и часть больных — антагонисты ГП IIb-IIIa). Всем пациентам проводилась ангиография с установкой катетера через бедренный доступ и большинству больных — первичное ЧКВ — 59% в основной группе (RB006/RB007) и 69% в контрольной группе (применение гепарина). Остальных больных лечили медикаментозно без применения первичных инвазивных процедур. RB006 вводили в дозе 1 мг/кг (ингибирование активности фактора IX $\geq 95\%$) непосредственно перед проведением ангиографии/ЧКВ ($n = 479$), а после процедуры больных разделяли на 4 подгруппы, в которых действие RB006 подавлялось на 25%, 50%, 75% и 100% введением RB007. В контрольную группу (применение гепарина) был включен 161 пациент. Было установлено, что блокада RB006 на 50% и более позволяет достичь снижения частоты кровотечений до уровня контрольной группы (применение гепарина). Частота тромботических осложнений в течение 30 дней в группе RB006/RB007 (все подгруппы) была несколько ниже, чем в группе гепарина, однако эти отличия не достигали достоверного уровня — 3,0% и 5,1% соответственно ($p = 0,1$). К важным наблюдениям этого исследования следует отнести регистрацию 3 случаев развития аллергических осложнений среди больных, получавших RB006 [21].

Третья фаза клинических испытаний REG1-системы (исследование REGULATE-PCI) проводилась в группе больных с ИБС, которым выполнялись ЧКВ. В исследование включались

больные со стабильной стенокардией (около половины), нестабильной стенокардией (около 30%), а также больные, недавно перенесшие инфаркт миокарда (больные с острым инфарктом в исследование не включались). Пациенты были рандомизированы по двум группам. Основная группа получала RB006 в дозе 1 мг/кг перед ЧКВ (ингибирование активности фактора IX > 99%) и RB007 в дозе, блокирующей действие RB006 на 80%, сразу после проведения процедуры, а контрольная группа получала в качестве антикоагулянта бивалирудин (прямой ингибитор тромбина) в стандартной дозировке. Практически все больные получали аспирин и антагонисты P2Y₁₂-рецепторов АДФ и небольшая часть больных — антагонисты IIb-IIIa по экстренным показаниям. Исследование было досрочно остановлено после включения в основную и контрольную группы приблизительно по 1600 пациентов (всего около 3200 вместо запланированных 13200) в связи с развитием опасных аллергических реакций у 10 пациентов (0,6%) в группе REG1 по сравнению с 1 пациентом (0,06%) в группе бивалирудина. Среди обследованных больных количество основных конечных точек (смерть, инфаркт миокарда, инсульт, повторная реваскуляризация) в течение 3 дней после ЧКВ было приблизительно одинаковым в обеих группах — 7% и 6% в группе REG1 и бивалирудина соответственно. При этом общая частота зарегистрированных кровотечений (крупных и мелких) была достоверно выше в группе REG1 (6%, n = 104) по сравнению с группой бивалирудина (4%, n = 65), хотя частота крупных кровотечений в связи с их небольшим количеством достоверно не отличалась (n = 7 и n = 2 в группах REG1 и бивалирудина соответственно) [22].

Последующие исследования патогенеза аллергических реакций, потребовавших остановки исследования REGULATE-PCI (см. выше),

показали, что их развитие было обусловлено наличием у части пациентов предрасполагающих антител против ПЭГ (не реагирующих с олигонуклеотидной частью RB006). Относительно высокую частоту серьезных аллергических реакций при применении RB006 по сравнению с другими пегилированными фармацевтическими продуктами связывают с одновременным введением высокой дозы ПЭГ при использовании этого модифицированного аптамера. Учитывая, что 40-кДа ПЭГ составляет 80% от общей массы RB006 (на неиммуногенный 10-кДа олигонуклеотид приходится лишь 20% массы), введение препарата в дозе 1 мг/кг соответствует попаданию в кровоток приблизительно 64 мг ПЭГ (при весе пациента 80 кг) и достижению его концентрации в плазме около 20 мкг/мл [23, 24].

Таким образом, относительно высокая частота серьезных аллергических реакций, отсутствие преимуществ по показателям антитромботической эффективности и большая частота кровотечений по сравнению с бивалирудином очевидно указывают на бесперспективность дальнейших исследований пегилированного аптамера RB006 (пегнивакоджена) против фактора IX и его антидота RB007 (анивамерсена).

Аптамеры против тромбина

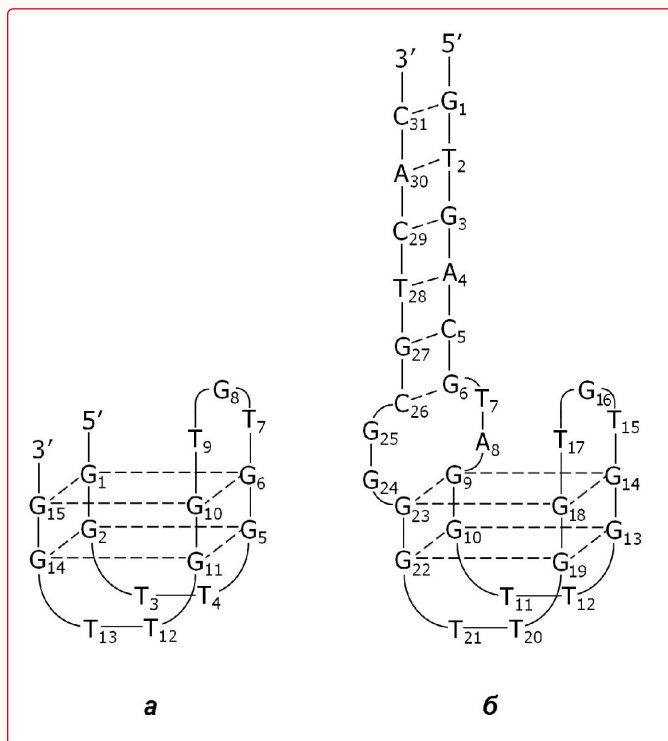
Тромбин — это главный протеолитический фермент свертывающего каскада, образующийся из своего неактивного предшественника протромбина в результате действия активированного фактора X. Образование тромбина происходит при работе протромбиназного комплекса, который формируется из протромбина, активированного фактора X и активированного фактора V (кофактора) на поверхности отрицательно заряженных фосфолипидов и при участии ионов кальция. Тромбин катализирует две реакции, играющие ключевую роль в процессе остановки кровотечений (гемостаза) и внутрисосудистого тром-

бообразования, — превращение фибриногена в фибрин и активацию, а также агрегацию тромбоцитов, содержащих на своей поверхности PAR-рецепторы тромбина (Protease Activated Receptor — рецепторы, активируемые протеазами). Оба субстрата тромбина в этих реакциях — и фибриноген, и PAR-рецептор — связываются в его составе с экзосайтом 1, и уже затем в результате протеолитического действия активного (каталитического) центра фермента и отщепления от субстратов соответствующих пептидов происходит образование фибрина из фибриногена и активация PAR-рецепторов [25]. Антикоагулянтные препараты, относящиеся к классу прямых ингибиторов тромбина, блокируют или только активный центр (дабигатан и аргатробан), или активный центр и экзосайт 1 (бивалирудин) [26].

Аптамеры против тромбина, способные ингибировать его функциональную активность, были описаны еще в 1992 г. Боком (Bock) и соавт. [27]. Полученный в этой работе ДНК-аптамер состоял из 15 нуклеотидов (последовательность — 5'-GGTGGTGTG-GTTGG-3') и получил название 15TBA (TBA — Thrombin Binding Aptamer, связывающийся с тромбином аптамер, другие названия — 15-mer, HD1). Аптамер 15TBA имеет в своем составе структуру G-квруплекса, две T-T- и одну T-G-T-петли (рис. 1а). Он

связывается с экзосайтом 1 тромбина с помощью двух малых T-T-петлей. Благодаря этому связыванию 15TBA ингибирует взаимодействие экзосайта 1 с субстратами тромбина — фибриногеном и PAR-рецепторами и, соответственно, ингибирует образование фибрина из фибриногена и индуцируемую тромбином активацию и агрегацию тромбоцитов. При этом в отличие от других известных ингибиторов тромбина (см. выше) он не влияет непосредственно на активный (каталитический) центр фермента [28–31]. Возможность подавления функции тромбина аптамером 15TBA была

РИСУНОК 1. Структура антитромбиновых ДНК-аптамеров — 15TBA (а) и RE31 (б)



Штриховые линии — водородные связи

продемонстрирована не только *in vitro*, но и *in vivo* в моделях на экспериментальных животных [32, 33].

Антитромбиновый аптамер 15TBA и два других аптамера против экзосайта 1 с похожими свойствами, 15-звенный аптамер ARC183 и 26-звенный аптамер второго поколения ARC1172 (NU172), были протестированы в рамках первой фазы клинических испытаний в группах здоровых добровольцев. Впоследствии эти аптамеры планировалось использовать в качестве быстрообратимых антикоагулянтов (не модифицированные аптамеры после прекращения инфузии выводятся из кровотока в течение 10–15 мин) при проведении операций аортокоронарного шунтирования (АКШ). Исследования показали относительную безопасность введения аптамеров и возможность достижения с их помощью высокого уровня антикоагуляции. Однако дозировки аптамеров для поддержания антикоагулянтного эффекта были крайне велики [4]. Тем не менее для аптамера NU172 была инициирована вторая фаза клинических исследований в группе пациентов, которым проводилась операция АКШ. Главной целью этой фазы была проверка безопасности и первичной эффективности на пациентах. Несмотря на то что эту фазу планировалось завершить еще в 2013 г., до настоящего времени (начало 2017 г.) никаких результатов исследования доложено не было (см. — <http://ClinicalTrials.gov/identifier:NCT00808964>). В связи с этим можно предположить, что испытания аптамера были либо временно, либо окончательно остановлены.

В Российском кардиологическом научно-производственном комплексе МЗ РФ в последние годы совместно с НИИ физико-химической биологии МГУ проводятся работы по созданию антикоагулянта из класса прямых ингибиторов тромбина на основе ДНК-апта-

мера, получившего условное название RE31. Этот аптамер состоит из 31 нуклеотида и, кроме характерных для 15TBA аптамера G-квадруплексной структуры, двух Т-Т— и одной Т-G-T-петлей, содержит также шарнирную область, соединенную с 5 парами комплементарных оснований (дуплексная область), симметрично расположенными относительно центрального квадруплекса (рис. 1б) [30, 34]. Изучение структуры комплекса RE31 с тромбином показало, что его связывание с белком идет по тому же механизму, что и 15TBA: через малые петли Т-Т — и с участием тех же аминокислотных остатков со стороны тромбина [30]. Однако RE31 существенно эффективнее, чем 15TBA, ингибирует протромботические реакции тромбина — катализируемое тромбином образование фибрина из фибриногена (тесты — тромбиновое время, протромбиновое время и АЧТВ) и тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов [31, 34, 35]. Эти данные указывают на то, что наличие шарнирного и дуплексного участка в RE31 очевидно повышает сродство и ингибирующую активность аптамера по отношению к тромбину. В качестве лекарственного средства предлагается использовать модифицированный вариант RE31 с защищенными концевыми нуклеотидами и содержащий присоединенный по 5'-концу ПЭГ [36]. В ходе проведения доклинических исследований модифицированного RE31 в модели тромбоза на крысах была показана принципиальная возможность подавления артериального тромбообразования с помощью этого аптамера [37]. Таким образом, модифицированный антитромбиновый аптамер RE31 является перспективной молекулой для создания на его основе эффективного антикоагулянта — прямого ингибитора тромбина для внутривенного введения.



ИСТОЧНИКИ

1. Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 537-550.
2. Ni X, Castaneres M, Mukherjee A, Lupold SE. Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons. *Curr Med Chem*, 2011, 18: 4206-4214.
3. Kadioglu O, Malczyk AH, Greten HJ, Efferth T. Aptamers as a novel tool for diagnostics and therapy. *Invest New Drugs*, 2015, DOI 10.1007/s10637-015-0213-y.
4. Li W, Wang K, Zhao M, Yang X, Chen M, Lan X. Development of aptamer oligonucleotides as anti-coagulants and antithrombotics for cardiovascular diseases: current status. *Thromb Res*, 2014, 134: 769-773.
5. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов. М.: Литтсера, 2011: 79-84.
6. Cosmi B. ARC-1779, a PEGylated aptamer antagonist of von Willebrand factor for potential use as an anticoagulant or antithrombotic agent. *Curr Opin Mol Ther.*, 2009, 11: 322-328.
7. Diener JL, Daniel LagassO, HA, Duerschmied D, Merhi Y, Tanguay JF, Hutabarat R, Gilbert J, Wagner DD, Schaub R. Inhibition of von Willebrand factor mediated platelet activation and thrombosis by the anti von Willebrand factor A1-domain aptamer ARC1779. *J Thromb Haemost*, 2009, 7: 1155-1162.
8. Arzamendi D, Dandachli F, ThOorPt JF, Ducrocq G, Chan M, Mourad W, Gilbert JC, Schaub RG, Tanguay JF, Merhi Y. An anti-von Willebrand factor aptamer reduces platelet adhesion among patients receiving aspirin and clopidogrel in an ex vivo shear-induced arterial thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2011: 17, E70-E78.
9. Gilbert JC, DeFeo-Fraulini T, Hutabarat RM, Horvath CJ, Merlino PG, Marsh HN, Healy JM, Boufakhreddine S, Holohan TV, Schaub RG. First-in-human evaluation of anti-von Willebrand factor therapeutic aptamer ARC1779 in healthy volunteers. *Circulation*, 2007, 116: 2678-2686.
10. Tsai H-M. Thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. In: Platelets. Third Edition. (ed. Michelson AD). Amsterdam, Boston, Heidelberg et al: Academic Press, Elsevier Inc. 2013. pp. 883-908.
11. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов. М.: Литтсера, 2011: 291-301.
12. Cataland SR, Peyvandi F, Mannucci PM, Lammle B, Kremer Hovinga JA, Machin SJ, Scully M, Rock G, Gilbert JC, Yang S, Wu H, Jilma B, Knoebl P. Initial experience from a double-blind, placebo-controlled, clinical outcome study of ARC1779 in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*, 2012, 87: 430-432.
13. Jilma-Stohlawetz P, Knöbl P, Gilbert JC, Jilma B. The anti-von Willebrand factor aptamer ARC1779 increases von Willebrand factor levels and platelet counts in patients with type 2B von Willebrand disease. *Thromb Haemost*, 2012, 108: 284-290.
14. Markus HS, McCollum C, Imray C, Goulder MA, Gilbert J, King A. The von Willebrand inhibitor ARC1779 reduces cerebral embolization after carotid endarterectomy: a randomized trial. *Stroke*, 2011, 42: 2149-2153.
15. Smith SB, Gailani D. Update on the physiology and pathology of factor IX activation by factor XIa. *Expert Rev Hematol*, 2008, 1: 87-98.
16. Dyke CK, Steinhubl SR, Kleiman NS, Cannon RO, Aberle LG, Lin M, Myles SK, Melloni C, Harrington RA, Alexander JH, Becker RC, Rusconi CP. First-in-human experience of an antidote-controlled anticoagulant using RNA aptamer technology: a phase 1a pharmacodynamic evaluation of a drug-antidote pair for the controlled regulation of factor IXa activity. *Circulation*, 2006, 114: 2490-2497.
17. Rusconi CP1, Roberts JD, Pitoc GA, Nimjee SM, White RR, Quick G Jr, Scardino E, Fay WP, Sullenger BA. Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo. *Nat Biotechnology*, 2004, 22: 1423-1428.
18. Nimjee SM, Keys JR, Pitoc GA, Quick G, Rusconi CP, Sullenger BA. A novel antidote-controlled anticoagulant reduces thrombin generation and inflammation and improves cardiac function in cardiopulmonary bypass surgery. *Mol Ther*, 2006, 14: 408-415.
19. Chan MY, Cohen MG, Dyke CK, Myles SK, Aberle LG, Lin M, Walder J, Steinhubl SR, Gilchrist IC, Kleiman NS, Vorchheimer DA, Chronos N, Melloni C, Alexander JH, Harrington RA, Tonkens RM, Becker RC, Rusconi CP. Phase 1b randomized study of antidote-controlled modulation of factor IXa activity in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*, 2008, 117: 2865-2874.
20. Cohen MG, Purdy DA, Rossi JS, Grinfeld LR, Myles SK, Aberle LH, Greenbaum AB, Fry E, Chan MY,

- Tonkens RM, Zelenkofske S, Alexander JH, Harrington RA, Rusconi CP, Becker RC. First clinical application of an actively reversible direct factor IXa inhibitor as an anticoagulation strategy in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Circulation*, 2010, 122: 614-622.
21. Povsic TJ, Vavalle JP, Aberle LH, Kasprzak JD, Cohen MG, Mehran R, Bode C, Buller CE, Montalescot G, Cornel JH, Rynkiewicz A, Ring ME, Zeymer U, Natarajan M, Delarche N, Zelenkofske SL, Becker RC, Alexander JH, RADAR Investigators A phase 2, randomized, partially blinded, active-controlled study assessing the efficacy and safety of variable anticoagulation reversal using the REG1 system in patients with acute coronary syndromes: results of the RADAR trial. *Eur Heart J*, 2013, 34: 2481-2489
22. Lincoff AM, Mehran R, Povsic TJ, Zelenkofske SL, Huang Z, Armstrong PW, Steg PG, Bode C, Cohen MG, Buller C, Laanmets P, Valgimigli M, Marandi T, Fridrich V, Cantor WJ, Merkely B, Lopez-Sendon J, Cornel JH, Kasprzak JD, Aschermann M, Guetta V, Morais J, Sinnaeve PR, Huber K, Stables R, Sellers MA, Borgman M, Glenn L, Levinson AI, Lopes RD, Hasselblad V, Becker RC, Alexander JH, REGULATE-PCI Investigators. Effect of the REG1 anticoagulation system versus bivalirudin on outcomes after percutaneous coronary intervention (REGULATE-PCI): a randomised clinical trial. *Lancet*, 2016, 387: 349-356.
23. Ganson NJ, Povsic TJ, Sullenger BA, Alexander JH, Zelenkofske SL, Sailstad JM, Rusconi CP, Hershfield MS. Pre-existing anti-polyethylene glycol antibody linked to first-exposure allergic reactions to pegnivacogin, a PEGylated RNA aptamer. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 137: 1610-1613.
24. Povsic TJ, Lawrence MG, Lincoff AM, Mehran R, Rusconi CP, Zelenkofske SL, Huang Z, Sailstad J, Armstrong PW, Steg PG, Bode C, Becker RC, Alexander JH, Adkinson NF, Levinson AI, REGULATE-PCI Investigators. Pre-existing anti-PEG antibodies are associated with severe immediate allergic reactions to pegnivacogin, a PEGylated aptamer. *J. Allergy Clin Immunol.*, 2016, 138: 1712-1715.
25. Lane DA, Philippou H, Huntington JA. Directing thrombin. *Blood*, 2005, 106: 2605-2612.
26. Arsenault KA, Hirsh J, Whitlock RP, Eikelboom JW. Direct thrombin inhibitors in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*, 2012, 9: 402-414.
27. Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, 1992, 355: 564-566.
28. Macaya RF, Schultze P, Smith FW, Roe JA, Feigon J. Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Pro. Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 3745-3749.
29. Padmanabhan K, Padmanabhan KP, Ferrara JD, Sadler JE, Tulinsky A. The structure of a-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer. *J Biol Chem*, 1993, 268: 17651-17654.
30. Russo Krauss I, Spiridonova V, Pica A, Napolitano V, Sica F. Different duplex/quadruplex junctions determine the properties of anti-thrombin aptamers with mixed folding. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: 983-991.
31. Добровольский А.Б., Титаева Е.В., Хаспекова С.Г., Спиридонова В.А., Копылов А.М., Мазуров А.В. Ингибирование активности тромбина ДНК аптамерами. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.*, 2009, 148: 41-45.
32. Griffin LC, Tidmarsh GF, Bock LC, Toole JJ, Laung IK. In vivo anticoagulant properties of a novel nucleotide-based thrombin inhibitor and demonstration of regional anticoagulation in extracorporeal circuits. *Blood*, 1993, 81: 3271-3276.
33. DeAnda A Jr, Coutre SE, Moon MR, Vial CM, Griffin LC, Law VS, Komeda M, Leung LL, Miller DC. Pilot study of the efficacy of a thrombin inhibitor for use during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*, 1994, 58: 344-350.
34. Спиридонова В.А., Головин А.В., Копылов А.М., Добровольский А.Б., Мазуров А.В. Аптамерный олигонуклеотид — прямой ингибитор тромбина. Патент РФ № 2401306 Бюллетень изобретений. 2010 г. №28.
35. Мазуров А.В., Титаева Е.В., Хаспекова С.Г., Сторожилова А.Н., Спиридонова В.А., Копылов А.М., Добровольский А.Б. Свойства нового ДНК аптамера — прямого ингибитора тромбина. *Бюлл Эксп Биол Мед*, 2010, 150: 394-397.
36. Спиридонова В.А., Головин А.В., Копылов А.М., Добровольский А.Б., Мазуров А.В. Модифицированные ДНК аптамеры, ингибирующие активность тромбина. Патент РФ №2410432. Бюллетень изобретений. 2011 г. №3.
37. Добровольский А.Б., Спиридонова В.А., Мазуров А.В. Способ ингибирования тромбообразования и ускорения фибринолиза с помощью ДНК аптамеров, ингибирующих активность тромбина, в эксперименте. Патент РФ № 2559545. Бюллетень изобретений. 2015 г. №22.