

## ПОСТСЕЛЕКЦИОННОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ АПТАМЕРОВ: СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АФФИННОСТИ ДНК-АПТАМЕРОВ К РЕКОМБИНАНТНОМУ ВНЕКЛЕТОЧНОМУ ДОМЕНУ РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА

© 2024 В.Л. Моисеенко<sup>1,2\*</sup>, О.М. Антипова<sup>1,3</sup>, А.А. Рыбина<sup>1</sup>, Л.И. Мухаметова<sup>1</sup>,  
С.А. Ерёмин<sup>1</sup>, Г.В. Павлова<sup>2,3</sup>, А.М. Копылов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: valerian.moiseenko@gmail.com

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии  
имени академика Н.Н. Бурденко Минздрава России, 125047 Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485 Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.09.2024

После доработки 15.10.2024

Принята к публикации 16.10.2024

В работе дана сравнительная оценка аффинности сконструированных ДНК-аптамеров к внеклеточному домену рецептора эпидермального фактора роста человека (EGFR\*). Суммированы данные по аффинности 20 аптамеров, опубликованные ранее. Разнообразие способов селекции аптамеров и методов измерения аффинности требует унификации алгоритмов сравнения. Это необходимо и для следующего важного этапа – конструирования аптамеров для постселекционной подгонки к белку-мишени EGFR\*. В данной работе сравнили аффинность ДНК-аптамеров из двух семейств, U31 и U2, полученных ранее Wu et al. из одной селекции [Wu et al. (2014) *PLoS One*, 9, e90752], и их производных аптамерных конструкций GR20, U2s и Gol1, полученных нами рациональным дизайном. Аффинность к EGFR\* измеряли двумя разными методами: равновесным в растворе – поляризацией флуоресценции FAM-меченых аптамеров, и кинетическим на поверхности – интерферометрией биослоёв с иммобилизованными аптамерами. В отличие от значений равновесных констант, полученных титрованием аптамера белком и выраженных в единицах концентрации последнего, более информативным оказался анализ профилей самого титрования, а также кинетики взаимодействия, которые позволили определить влияние на аффинность даже субтильных изменений в аптамерах и их конструкциях. Сформулированы гипотезы о соотношениях «структура–функция» и механизмах узнавания. Данные, полученные для набора аптамерных конструкций, критичны для перехода к изучению взаимодействия аптамеров с мишенями рецептора эпидермального фактора роста в составе клеток.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** аптамер, EGFR, аффинность, интерферометрия биослоёв, поляризация флуоресценции.

**DOI:** 10.31857/S0320972524120032 **EDN:** IFWHNZ

### ВВЕДЕНИЕ

Целевое взаимодействие молекул в живых клетках обеспечивается молекулярным узнаванием. Простым классическим примером узнавания являются Уотсон-Криковские комплементарные

взаимодействия оснований в нуклеиновых кислотах. Пространственные узнающие элементы, будь то молекулы или супрамолекулярные комплексы и их конструкции, назовём МУЗЭли – Молекулярные Узнающие Элементы. Молекулярное узнавание используют и для целевого воздействия на

Принятые сокращения: ИБС – интерферометрия биослоёв;  $K_d$  – кажущаяся равновесная константа диссоциации; ПФ – поляризация флуоресценции; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; EGFR\* – рекомбинантный внеклеточный домен рецептора эпидермального фактора роста человека.

\* Адресат для корреспонденции.

мишени в диапазоне от молекул до целого организма. Типичные природные МУЗЭли – это антигены или рецепторы; путём их имитации создают искусственные МУЗЭли на полипептидной основе: различные варианты антител, пептиды, скаффолды. На принципиально иной химической основе, полинуклеотидной, создаются так называемые аптамеры – «химические антитела» [1, 2].

Создание аптамеров происходит в два этапа: сначала получают первичные аптамеры путём селекции к мишени, затем их подгоняют к мишени путём конструирования для выполнения конкретных задач [3, 4]. Основные характеристики МУЗЭлей – аффинность и специфичность, для определения которых существует много методов [5]. Все методы можно условно разбить на две группы: изучение взаимодействия в растворе и использование сенсорных поверхностей.

Данная работа посвящена изучению аффинности ДНК-аптамеров к рекомбинантному внеклеточному домену рецептора эпидермального фактора роста человека (EGFR\*). При взаимодействии внеклеточного домена трансмембранного рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) с эпидермальным фактором роста (EGF) рецептор димеризуется, автофосфорилируется и запускает каскад процессов, активирующих транскрипционные факторы, что изменяет экспрессию генов и определяет деление клеток [6, 7]. EGFR рекомендован ВОЗ как значимый молекулярный онкомаркер для классификации опухолей головного мозга. В данной работе полученные ранее 20 известных анти-EGFR-аптамеров объединены в 5 групп: РНК-аптамеры [8–14]; ДНК-аптамеры серии TuTu [15]; ДНК-аптамеры серии U, в том числе производные (аптамеры GR20 и GR200) [16–17]; ДНК-аптамеры 2369 [18] и аптамеры, полученные Damase et al. [19] (LINN2 и KM4) (табл. 1). Аптамеры были получены разными методами селекции, аффинность аптамеров измерена разными методами, что делает невозможным их сравнение. В работе выбраны ДНК-аптамеры двух семейств, U31 и U2. Сконструированы их производные и определена аффинность к белку EGFR\* двумя методами: в растворе – поляризацией флуоресценции (ПФ), и на поверхности сенсора с иммобилизованными аптамерами – интерферометрией биослоёв (ИБС). Использованный сравнительный серийный подход создал условия для дальнейшего изучения аффинности анти-EGFR ДНК-аптамеров к белку EGFR в составе клеток.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Олигонуклеотиды.** Меченные по 5'-концу 5(6)-карбоксифлуоресцеином (FAM) или биотином

анти-EGFR ДНК-аптамеры (табл. 2) синтезированы, очищены и лиофилизированы («ГенТерра», Россия).

**Моделирование вторичной структуры анти-EGFR ДНК-аптамеров.** Моделирование вторичной структуры ДНК-аптамеров проводили с помощью сервера RNAfold web server, пакета ViennaRNA Web Services, с энергетическими параметрами для ДНК, разработанными на основе метода ближайших соседей для оценки стабильности вторичных структур нуклеиновых кислот [22, 23]. Параметры для ДНК выводятся на основе экспериментальных данных и используются в компьютерных программах для предсказания вторичных структур на основе минимума свободной энергии [23–25].

**Определение кажущихся констант диссоциации ( $K_d$ ) методом ПФ.** Бычий сывороточный альбумин (БСА, М ~ 66 кДа) получен от «Компании Хеликон» (Россия). Рекомбинантный внеклеточный домен рецептора эпидермального фактора роста человека (EGFR\*, кат. номер 1095-ER-002, лот номер ACJ0818021) куплен у «R&D Systems» (США). Растворы аптамеров (0,5 мкМ) готовили в буфере 1 (5 мМ Tris-HCl (pH 7), 140 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>). Раствор EGFR\* (29 нМ) готовили в буфере 1, содержащем 0,05% (v/v) Tween 20 и 1 мг/мл БСА.

К 510 мкл раствора (9,8 нМ) флуоресцентно меченного аптамера добавляли 1–50 мкл раствора белка (шаг изменения концентрации EGFR\* в растворе – 0,4–0,6 нМ), выдерживали при комнатной температуре 2–3 мин и проводили измерение на приборе SENTRY 200 («Ellie», США). Титрование проводили путём изменения концентрации белка, значения флуоресценции (I) и поляризации флуоресценции (mP) измеряли трижды, результаты представляли в виде средних значений  $\pm$  SD. В контрольном опыте титровали буферным раствором с БСА без EGFR\*. Расчёт  $K_d$  проводили с использованием программы OriginPro на основе уравнения Хилла [26, 27]:

$$f_b = \frac{B_{\max} \cdot [\text{Protein}]^n}{K_d^n + [\text{Protein}]^n}, \quad (1)$$

где  $f_b$  – доля связанного аптамера;  $B_{\max}$  – максимальный сигнал специфического связывания;  $n$  – коэффициент Хилла;  $[\text{Protein}]$  – концентрация белка-мишени;  $K_d$  – константа диссоциации комплекса аптамер-белок.

**Определение кинетических констант ассоциации и диссоциации, а также  $K_d$  методом ИБС.** Растворы EGFR\* готовили последовательным разбавлением в калий-фосфатном буфере (буфер 2), содержащем 8 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 мМ NaCl, 8,5 мМ KCl (pH 7,4), в концентрациях 0,8–51,2 нМ, после чего вносили в лунки 96-луночного планшета («Greiner», Германия) по 200 мкл. Растворы аптамеров (2 мкМ) готовили в буфере 1.

Таблица 1. Характеристики известных анти-EGFR-аптамеров

| Аптамер                                | Тип | Мишень для селекции  | Метод определения $K_d$                             | $K_d$ , нМ   |
|--|-----|--|---|--|
| J18 [8]                                | РНК | EGFR*  | связывание на фильтрах                              | 7  |
| E07 [9]                                | РНК | rhEGFR-Fc  | проточная цитофлуориметрия                          | 209 ± 46 [10]  |
|  |     |  | связывание на фильтрах                              | 2,4 ± 0,2 [9]  |
| ME07 [11]                              | РНК | EGFR*  | ИБС с EGFR*   | 0,3 [12]   |
| Производные ME07 [13]                  | РНК | EGFR-Fc  | ELISA с EGFR-Fc                                     | MinE07 3,70 ± 0,38<br>MinE07-U-Ph 359 ± 0,82<br>MinE07-U-Vi 4,62 ± 0,48<br>MinE07-U-I 2,05 ± 0,26<br>MinE07-UA 1,53 ± 0,13<br>MinE07UA' 3,39 ± 0,71<br>MinE07UB 1,47 ± 0,54<br>MinE07UC 1,23 ± 0,10<br>MinE07UC' 1,11 ± 0,45 |
| CL4 [14]                               | РНК | клеточный SELEX (линия клеток A549)                            | связывание на фильтрах с EGFR*                      | 10   |
| TuTu19 [15]                            | ДНК | EGFR*  | проточная цитофлуориметрия (иммобилизованный EGFR*) | 74 ± 7   |
| TuTu20 [15]                            |     |  |   | 85 ± 10  |
| TuTu21 [15]                            |     |  |   | 78 ± 5   |
| TuTu22 [15]                            |     |  |   | 56 ± 7   |
| U2 [16]                                | ДНК | клеточный SELEX (линия клеток U87 с суперэкспрессией EGFRvIII) | аптаферментный анализ                               | 3,4 ± 1,0  |
| U31 [16]                               |     |  | аптаферментный анализ                               | 8,1 ± 2,4  |
|  |     |  | ИБС с EGFR*   | 3,7 ± 0,7 [17]   |
| GR20 [17]                              | ДНК |  | ИБС с EGFR*   | 5,0 ± 2,0  |
| GR200 [17]                             | ДНК |  |   | 4,6 ± 1,1  |
| 2369-1-1 [18]                          | ДНК | EGFR*  | связывание на фильтрах                              | 11,7   |
| 2369-11-1 [18]                         |     |  |   | 6,3  |
| 2369-12-1 [18]                         |     |  |   | 7,1  |
| 2369-27-1 [18]                         |     |  |   | 0,62   |
| 2369-27-2 – укороченный 2369-27-1 [18] |     |  |   | 0,99   |
| LINN2 [19]                             | ДНК | EGFR*  | термофлуориметрический анализ (TFA)                 | 9 ± 3  |
| KM4 [20]                               | ДНК | гибридный SELEX: EGFR* + клеточная линия A549                  | термофлуориметрический анализ                       | ~1   |
|  |     |  | проточная цитофлуориметрия                          | 46   |

Примечание. ME07-U-X – аптамеры, содержащие в положении C5 модификации: U-Ph – фенильную группу, U-Vi – винильную группу, U-I – йод. MinE07-U-Ph, MinE07-U-Vi и MinE07-U-I имеют однородную модификацию всех уридинов. MinE07UA, MinE07UB и MinE07UC – экспериментально полученные укороченные варианты ME07, содержащие разные модификации U. MinE07UA', MinE07UC' – ожидаемые полноразмерные версии экспериментально полученных модифицированных усечённых вариантов. rhEGFR-Fc – рекомбинантный слитый белок EGFR человека с Fc-фрагментом иммуноглобулина; EGFR\* – рекомбинантный внеклеточный домен рецептора эпидермального фактора роста человека; ИБС – интерферометрия биослоёв.

Таблица 2. Первичная структура анти-EGFR ДНК-аптамеров

| Название  | Последовательность (5'→3')   |
|-----------|--|
| U31 [16]  | ATCCAGAGTGACGCAGCATTTGTTTAATATGTTTTTAATCCCTTGTGGTGTGTTGTGGACACGGTGGCTTAGT    |
| GR20 [17] | ACGCACCATTTGTTTAATATGTTTTTAATCCCTTGTGGTGTGT                                  |
| U2 [16]   | ATCCAGAGTGACGCAGCATTTTGACGCTTTATCCTTTTCTTATGGCGGGATAGTTTCGTGGACACGGTGGCTTAGT |
| U2s       | CGCAGCATTTTGACGCTTTATCCTTTTCTTATGGCGGGATAGTTTCGTG                            |
| Gol1 [21] | GCCGGCATTTTGACGCCGCCCGGGCTGCTTATGCTCCGGGGCATATGGC                            |

Перед экспериментом биосенсоры Streptavidin (SA) (ForteBio; «Sartorius», Германия) гидратировали в буфере 1 в течение 10 мин, затем помещали на 10 мин в 2-мкМ раствор биотинилированного аптамера. Стадия ассоциации регистрировалась на приборе Octet R2 (ForteBio; «Sartorius») при помещении сенсора с иммобилизованным аптамером в лунки с образцами EGFR\* с возрастающей концентрацией. Регистрацию базовой линии, стадию диссоциации и отмывки сенсора проводили в буфере 2. Продолжительность стадии ассоциации – 360 с, стадии диссоциации – 210 с. Регенерацию сенсоров проводили 3-кратным последовательным погружением на 5 с в 1 М раствор гидрохлорида этаноламина и буфер 2.

Обработку полученных сенсограмм проводили с помощью программы OriginPro 2020 в соответствии с моделью связывания Ленгмюра 1 : 1 [28]. Значения констант скорости комплексной ассоциации ( $k_{on}$ ) и диссоциации ( $k_{off}$ ) определяли с использованием экспоненциальной аппроксимации сенсограмм: функция BoxLucas1 для стадии ассоциации, функция Exp2PMod1 – для стадии диссоциации. Параметры ( $k_{on} \cdot [A] + k_{off}$ ), где  $[A]$  – концентрация добавленного в ходе эксперимента белка, каждой сенсограммы наносили на график зависимости от концентрации белка в растворе (С, нМ). Значение тангенса угла наклона из линеаризации графика для каждого комплекса аптамер–белок соответствует константе скорости ассоциации. Кажущуюся константу диссоциации  $kK_d$  рассчитывали по уравнению:

$$kK_d = k_{off}/k_{on}. \quad (2)$$

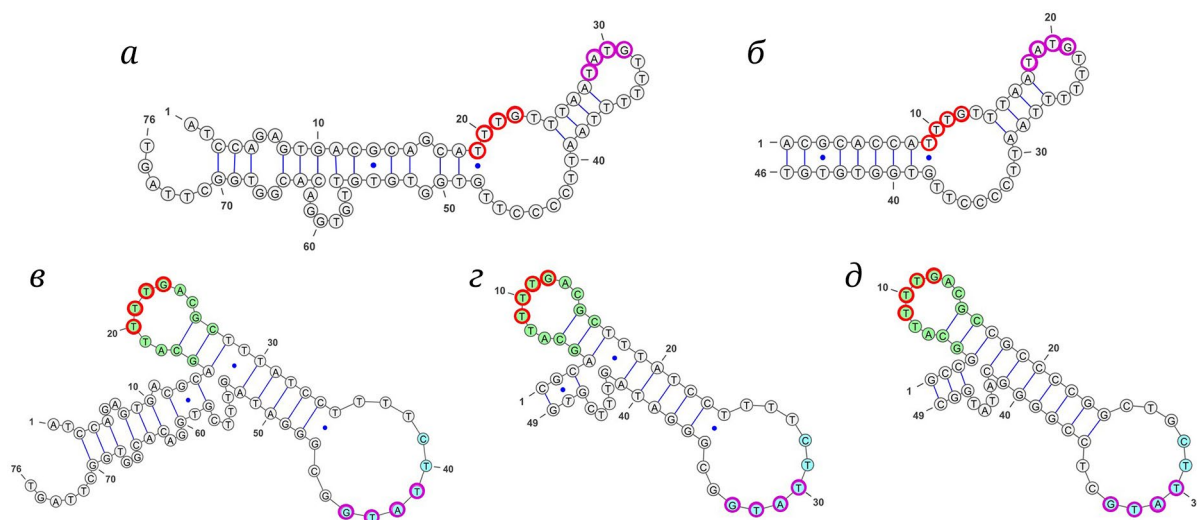
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Построение моделей возможных вторичных структур анти-EGFR ДНК-аптамеров.** Предполагаемые вторичные структуры анти-EGFR ДНК-аптамеров U2 и U31, отобранных в результате SELEX, и их производных U2s, Gol1 (из U2) и GR20 (из U31) представлены на рис. 1. Структуры

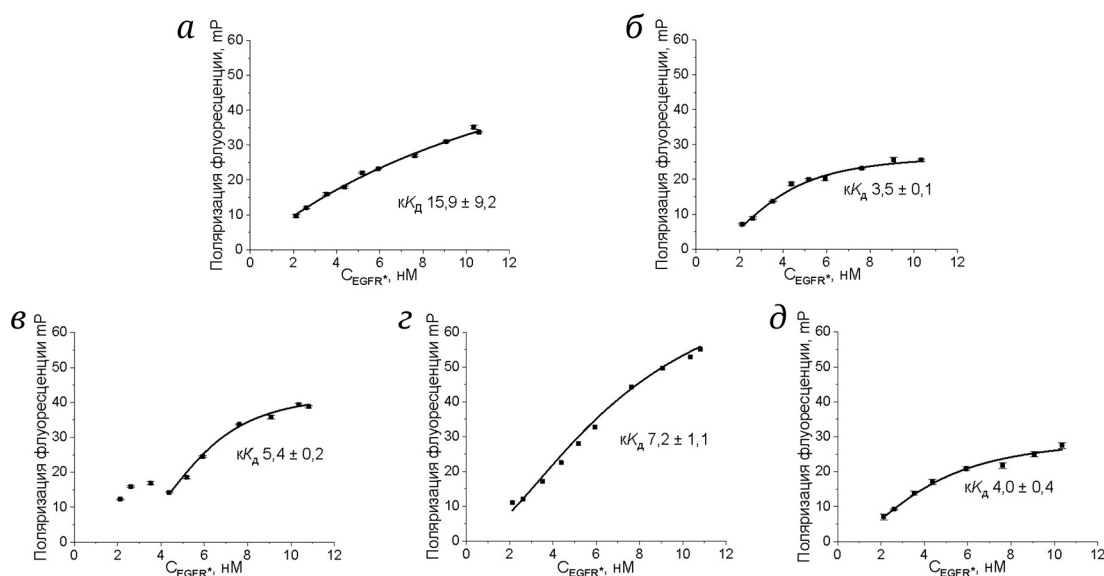
получены на основе анализа результатов, предлагаемых программой The ViennaRNA Package, и визуализированы с помощью Java-апплета VARNA.

**Анализ возможных вторичных структур для семейства ДНК-аптамеров U31.** В качестве базовой модели для нумерации нуклеотидов и элементов вторичной структуры выбран укороченный модифицированный вариант GR20. Первый нуклеотид A1 GR20 соответствует A11 в исходном аптамере U31. Аптамер GR20 получен путём удаления 5'- и 3'-концевых последовательностей (1–10 и 57–76). Концевой двутяжевой участок шпильки III-1 состоит из 9 пар нуклеотидов, при этом в мутантной форме GR20 C6 заменён на G6 (пара C6–G41 в GR20 вместо противостояния G6–G41 в U31); внутренняя петля П-1-1 состоит из 4-х нуклеотидов (T10–T13), петля П-1-2 имеет 8 нуклеотидов (T30–T37); стебель шпильки III-2 состоит из 4-х пар нуклеотидов и образует блок из трёх остатков Т с петлёй П-1-1; петля П-2 и стебель шпильки III-2 содержат блок из 6 остатков Т. На рис. 1, а и б в аптамерах серии U31 красным и фиолетовым контуром выделены 2 блока нуклеотидов, встречающихся в соответствующих петлях аптамеров серии U2.

**Анализ возможных вторичных структур для семейства аптамеров U2.** В качестве базовой модели для нумерации нуклеотидов и элементов вторичной структуры выбрана укороченная версия U2s. Первый нуклеотид C1 U2s соответствует C12 в исходном аптамере U2. Аптамер U2s получен путём удаления 5'- и 3'-концевых последовательностей (1–10 и 57–76). В U2s концевой двутяжевой участок шпильки III-1 состоит из 3-х пар нуклеотидов, включая пару G–T; стебель шпильки III-2 состоит из 3-х пар нуклеотидов; петля П-2 – из 8 нуклеотидов; двучепочный участок III-3 состоит из 7 пар нуклеотидов; петля П-3 состоит из 11 нуклеотидов. Петли П-2 и П-3 родительского U2 и укороченного варианта U2s содержат блоки из 4-х остатков Т. В исходно полученных моделях аптамеров U2 и U2s в шпильке III-3 в начале и в конце добавлено по одной паре G–T.



**Рис. 1.** Возможные вторичные структуры анти-EGFR ДНК-аптамеров U31, U2 и их производных. Структуры получены на основании анализа результатов, полученных с помощью сервиса The ViennaRNA Package и визуализированы с помощью Java-апплета VARNA: а – U31; б – GR20; в – U2; г – U2s; д – Gol1. Красным и фиолетовым контуром в структурах аптамеров U31 (а) и GR20 (б) выделены 2 блока нуклеотидов, встречающихся в соответствующих петлях аптамеров обоих семейств. В структурах аптамеров серии U2 (в–д) зелёным цветом выделены нуклеотиды в идентичных участках петель П-2 и шпильки П-3, голубым – повторяющиеся участки в петлях П-3. Синей точкой обозначены связи в неканонических парах оснований



**Рис. 2.** Концентрационные зависимости изменения поляризации флуоресценции при связывании FAM-меченых ДНК-аптамеров семейства U31 (а и б) и U2 (в–д) с EGFR\*. а – U31; б – GR20; в – U2; г – U2s, д – Gol1;  $R^2 > 0,98$ . Измерения проводились в трёх повторностях. Указаны рассчитанные  $K_d$

Сконструированный ДНК-аптамер Gol1 представляет собой вариант аптамера U2s, в котором в двуспиральных участках все пары А–Т заменены на пары Г–С. Петля П-2 сохранена, а петля П-3 изменена и не содержит блока из 4-х остатков Т. Более подробное описание алгоритма конструирования Gol1 будет опубликовано отдельно.

В структурах, приведённых на рис. 1, голубым и зелёным цветом выделены общие участки в петлях для трёх аптамеров семейства U2.

**Определение аффинности анти-EGFR ДНК-аптамеров методом ПФ.** Метод ПФ позволяет определять равновесную константу диссоциации в растворе. На рис. 2 приведены концентрационные зависимости связывания аптамеров U31 и U2, а также их производных с EGFR\*. Связывание аптамера U31 и его укороченного мутантного варианта GR20 происходит по-разному (рис. 2, а и б). Концентрационная кривая для GR20 характеризуется классической формой и наличием плато.

Таблица 3. Рассчитанные параметры аффинности анти-EGFR ДНК-аптамеров к EGFR\*

| Аптамер | ПФ             | ИБС                                       |                               |            |
|---------|----------------|---|-------------------------------|------------|
|         | $kK_d$         | $k_{on} \times 10^{-5}, (M \cdot s)^{-1}$ | $k_{off} \times 10^4, s^{-1}$ | $kK_d, нМ$ |
| U31     | $15,9 \pm 9,2$ | $0,7 \pm 0,2$                             | $18 \pm 2$                    | $24 \pm 6$ |
| GR20    | $3,5 \pm 0,1$  | $0,5 \pm 0,1$                             | $13 \pm 3$                    | $26 \pm 5$ |
| U2      | $5,4 \pm 0,2$  | $1,1 \pm 0,2$                             | $20 \pm 1$                    | $18 \pm 3$ |
| U2s     | $7,2 \pm 1,1$  | $0,9 \pm 0,1$                             | $23 \pm 2$                    | $25 \pm 2$ |
| Gol1    | $4,0 \pm 0,4$  | $1,3 \pm 0,3$                             | $22 \pm 2$                    | $17 \pm 3$ |

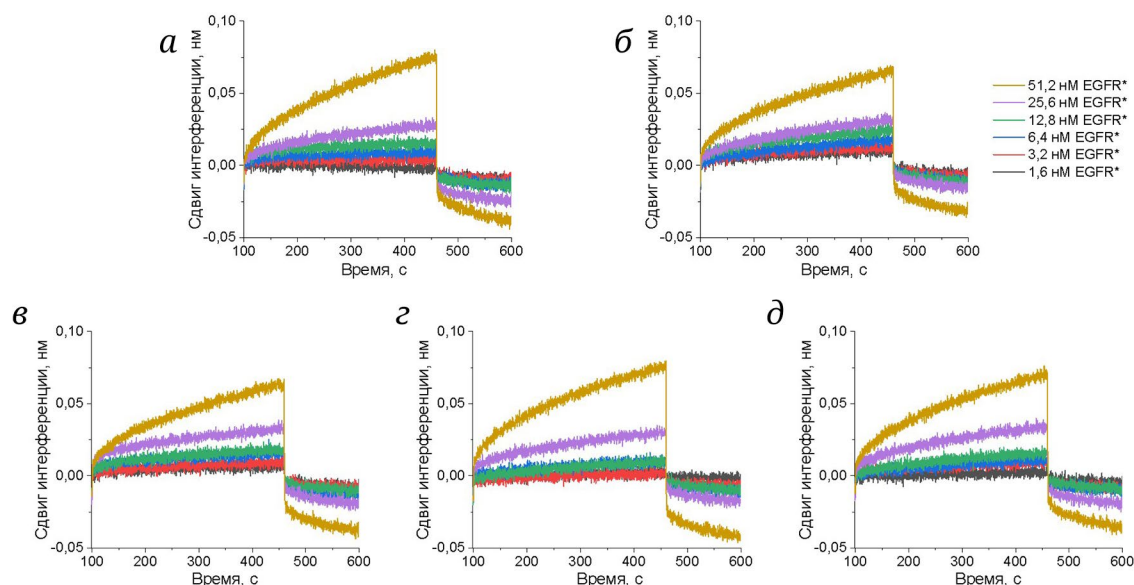


Рис. 3. Сенсограммы, полученные методом ИБС, для иммобилизованных биотинилированных ДНК-аптамеров при связывании с EGFR\*. а – U31; б – GR20; в – U2; г – U2s; д – Gol1

Согласно рассчитанным константам, укороченный аптамер GR20 связывается в 4,5 раза лучше исходного аптамера U31:  $kK_d = 3,5 \pm 0,1$  нМ против  $15,9 \pm 9,2$  нМ (табл. 3).

Аптамеры семейства U2 демонстрируют разный характер взаимодействия с EGFR (рис. 2, в–д). Концентрационная зависимость связывания исходного аптамера U2 воспроизводимо начинается с 4 нМ белка. Аппроксимация даёт значение  $kK_d = 5,4 \pm 0,2$  нМ. Укороченный вариант U2s связывается с мишенью несколько хуже исходного аптамера U2 ( $kK_d = 7,2 \pm 1,1$  нМ против  $5,4 \pm 0,2$  нМ). Концентрационная зависимость связывания сконструированного аптамера Gol1 показывает высокую аффинность –  $kK_d = 4,0 \pm 0,4$  нМ.

В контрольных экспериментах при титровании флуоресцентно-меченых аптамеров белком БСА наблюдалось слабое увеличение сигнала ПФ за счёт неспецифического связывания аптамеров (рис. П1, а–д в Приложении), при этом концентрация БСА 1000-кратно превышала кон-

центрацию EGFR\*. Аппроксимация по уравнению Хилла даёт значения  $kK_d$ , превышающие 1000 нМ.

**Определение аффинности анти-EGFR ДНК-аптамеров методом ИБС.** Метод ИБС позволяет определять кинетическую и равновесную аффинность, при этом один из компонентов, лучше аптамер, должен быть иммобилизован на поверхности биосенсора.

Аффинность аптамера U31 и его короткого производного GR20 к EGFR\* определяли при иммобилизации меченного по 5'-концу биотином аптамера на поверхности SA-сенсора (рис. 3, а и б). В случае GR20 происходит небольшое падение (в 1,4 раза) как скорости ассоциации, так и скорости диссоциации комплекса. Отношение кинетических констант ассоциации и диссоциации комплекса, определяющее равновесное значение аффинности, сохраняется (для U31  $kK_d = 24 \pm 6$  нМ и для GR20 –  $26 \pm 5$  нМ).

Сенсограммы связывания иммобилизованного аптамера U2 и его укороченных и скон-

струированных вариантов U2s и Gol1 с EGFR\* показаны на рис. 3, в–д. Отличие наблюдается для аптамера U2s: небольшое снижение скорости ассоциации и повышение скорости диссоциации приводит к ухудшению аффинности в 1,4 раза:  $K_d = 25 \pm 2$  нМ по сравнению с  $18 \pm 3$  нМ для исходного аптамера U2. Кинетические показатели и результирующая аффинность сконструированного аптамера Gol1 ( $K_d = 17 \pm 3$  нМ) сопоставима со значениями для исходного аптамера U2 ( $K_d = 18 \pm 3$  нМ).

Для контрольного связывания ДНК-аптамеров с белком БСА методом ИБС наблюдается только неспецифическое связывание, для которого невозможно рассчитать  $K_d$  (рис. П2, а–д в Приложении).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для постселекционной адаптации аптамеров к конкретной мишени необходимо адекватно следить за возможными изменениями их свойств. Основные первичные манипуляции при адаптации – это укорочение аптамеров и изменения в предполагаемой вторичной структуре, например, стабилизация путём замены нуклеотидов в «дефектных» участках, т.е. участках, не являющихся «классическими» Уотсон-Криковскими двутяжевыми участками. Последующие более продвинутые манипуляции с аптамерами – это введение химических модификаций, создание мультимодульных и мультифункциональных конструкций и прочее. Основное свойство аптамеров – это аффинность к мишени, которая характеризуется равновесными константами ассоциации/диссоциации либо кинетическими константами скорости ассоциации/диссоциации. Равновесные константы позволяют оценить существенные изменения аффинности, в то время как кинетические константы могут выявить интересные особенности на каждом этапе взаимодействия – ассоциации и диссоциации.

Методы определения аффинности аптамеров к мишени можно условно разделить на две группы: определение в растворе и на поверхности сенсоров. Каждая группа имеет свои преимущества и недостатки, но их совместное использование позволяет сделать более адекватные выводы. Примерами методов из обеих групп являются поляризация флуоресценции для раствора и интерферометрия биослоёв для поверхностных сенсоров [17, 29].

Данная работа посвящена аффинности ДНК-аптамеров, поскольку они более технологичны и показывают большую селективность к мишеням из-за пониженной гидрофобности по сравнению с модифицированными аптамерами 2'-F-РНК.

Во введении отмечалось, что в настоящее время имеется 4 группы ДНК-аптамеров к EGFR: серии TuTu, U, 2369 и группа из двух аптамеров LINN2 и KM4 (табл. 1). Аптамеры получены различными вариантами селекции, их аффинность определена различными методами, статус мишени EGFR также различался, поэтому вопрос о сравнении свойств полученных аптамеров является крайне актуальным. Кроме того, стадии адаптации аптамеров к мишени требуют унификации методов сравнения их свойств.

Первичная структура опубликована только для аптамеров серии U, причём для нескольких различных семейств, полученных в ходе одной селекции [16]. Ранее для серии аптамеров одного из семейств – U31 – мы создали несколько конструкций, исходя из комплексных изменений – одновременного укорачивания и стабилизации аптамера [17]. Один из них – GR20 – получен из исходного 76-мерного аптамера U31 укорачиванием до 46-мера с одновременной заменой противостояния G6–G41 на пару C6–G41 в двуспиральном участке III-1.

В настоящей работе мы получили конструкции для второго семейства U2. Чтобы проследить влияние конкретных изменений на аффинность аптамеров, проводили не комплексные изменения структуры, а пошаговые. Сначала было проведено укорачивание исходного 76-мерного аптамера U2 до 49-мерного аптамера U2s; потом во всей предполагаемой вторичной структуре U2s создали пары G–C с небольшими изменениями в одной из петель с получением 49-мерного аптамера Gol1. Это позволяет решать задачу о важности первичной структуры стеблей и/или петель шпилек для взаимодействия с белком EGFR\*. Одновременное использование двух методов измерения аффинности позволяет не только получить представления о чувствительности и возможностях обоих методов при манипуляциях со структурой аптамеров, но и выявить проблемы и выработать подходы для выбора аптамеров при их трансляции в биомедицинские исследования.

**Построение моделей возможных вторичных структур анти-EGFR ДНК-аптамеров серии U.** Ранее для конструирования аптамеров семейства U31 был выбран следующий подход. При анализе возможных вторичных структур, которые предлагает стандартный сервис The ViennaRNA Package, был выбран вариант, показанный на рис. 1, а. При этом компьютерная модель аптамера дополнена одной парой G–T (соответствующей G9–T38 в GR20) в конце шпильки III-1.

При укорачивании аптамера U31 был удалён нестабильный дефектный концевой двуспиральный участок A1–G10/T51–T76. Для стабилизации нового концевого участка дефектное противо-

стояние G6–G41 заменили на пару C6–G41 путём точечной замены G6C, что привело к созданию аптамера GR20 (нумерация дана по GR20). Аптамер GR20 имеет концевой стебель III-1 с девятью парами, две из которых – пары G–T (G3–T44, T9–G38). Внутренняя петля П-1-1 и шпилька III-2 содержат 2 блока из трёх остатков Т, а петля П-2 и шпилька III-2 содержит блок из 6 остатков Т.

В данной работе для конструирования аптамеров семейства U2 был выбран следующий подход. При анализе возможных вторичных структур, которые предлагает сервис The ViennaRNA Package, был выбран вариант, показанный на рис. 1, в. При этом исходная компьютерная модель аптамера дополнена парами Т–G в начале и в конце стебля шпильки III-3 (T18–G42 и T24–G36, согласно нумерации U2s).

При укорачивании аптамера U2 был удалён нестабильный дефектный концевой двуспиральный участок A1–A11/G61–T76. Полученный укороченный 49-мер (U2s) перенумерован. Концевая шпилька III-1 содержит всего 3 пары, из них 1 пара – G2–T48. Стебель шпильки III-2 также содержит всего 3 пары, но может стабилизироваться коаксиальным стэкингом со стеблем шпильки III-3, как это происходит у тРНК [30, 31]. Петли П-2 и П-3 родительского аптамера U2 и укороченного U2s содержат блоки из четырёх остатков Т.

Сконструированный аптамер Gol1 представляет собой вариант аптамера U2s, у которого в предполагаемых двуспиральных участках образованы пары G–C, что должно стабилизировать вторичную структуру. Петля П-2 сохранена, а петля П-3 изменена и не содержит блока из четырёх остатков Т. (Более подробное описание алгоритма конструирования Gol11 будет опубликовано отдельно.)

Полученный набор конструкций семейства U2 даёт возможность проверить гипотезы о природе узнающих участков аптамеров для взаимодействия с EGFR, а именно: активность каркаса вторичной структуры, активность петель, необходимость блоков из остатков Т.

Интересные наблюдения можно сделать при сравнении структур двух семейств аптамеров U31 и U2. Во внутренней петле П-1-1 семейства U31 и петле П-2 семейства U2 есть идентичная тетра-нуклеотидная последовательность TTTG (выделена красным контуром). Более того, в петлях П-2 и П-3 имеется вторая идентичная тетра-нуклеотидная последовательность TATG (выделена фиолетовым контуром).

**Определение аффинности анти-EGFR ДНК-аптамеров методом ПФ.** Метод ПФ основан на явлении поляризации флуоресценции. При быстром вращении небольшой флуоресцентно-меченой молекулы плоскость, в которой излучается

флуоресценция, отклоняется от плоскости возбуждения, вызывая деполяризацию флуоресценции. Образование комплекса с большей по размеру молекулой, например аптамер–белок, приводит к замедлению флуорофора, и плоскость, в которой излучается флуоресценция, меньше отклоняется от плоскости возбуждения, что приводит к поляризации флуоресценции (рис. ПЗ в Приложении). Метод ПФ активно применяется для комплексов аптамеров с белками с кажущимися константами диссоциации ( $K_d$ ) от 0,1 до сотен нМ [32]. Для белка EGFR\* в растворе определение аффинности аптамеров методом ПФ в этой работе проводилось впервые.

Для представителя семейства U31, сконструированного ранее, аптамера GR20, при укорочении и предполагаемой частичной стабилизации концевого двутяжевого участка, аффинность к белку возрастает примерно в 4,5 раза:  $K_d$  15,9 нМ и 3,5 нМ соответственно (табл. 3). В связи с этим закономерен вопрос о том, что будет происходить с аффинностью при пошаговом укорочении и предполагаемой стабилизации для представителей семейства U2.

В серии аптамеров U2 при простом укорочении исходного 76-мерного аптамера U2 до 49-мерного аптамера U2s наблюдается снижение аффинности связывания с EGFR\*:  $K_d$  = 5,4 нМ против 7,2 нМ соответственно. Возможно, это происходит из-за дестабилизации коаксиального стэкинга двутяжевых участков шпилек III-2 и III-3, поскольку укорочение концевого стебля шпильки III-1 до дефектного короткого концевого двутяжевого участка в три комплементарных пары, в том числе одна неканоническая пара G–T, не может обеспечить стабильную сближенность концов двух стеблей шпилек III-2 и III-3.

Неожиданные свойства показал аптамер Gol1. Замена семи возможных пар в исходном аптамере U2 на 7 пар G–C должна стабилизировать предполагаемую вторичную структуру аптамера, при этом узнавание белка EGFR\* может нарушаться. Из 10 пар в стеблях шпилек III-2 и III-3 остались неизменными только 3 пары: G15–C6, C16–G5, C22–G38. Тем не менее аптамер Gol1 сохранил аффинность к белку:  $K_d$  = 5,4 нМ и 4,0 нМ для U2 и Gol1 соответственно. При этом ход кривой титрования белком для аптамера Gol1 практически совпадает с результатами, полученными для сконструированного аптамера GR20 из другого семейства. Значения рассчитанных  $K_d$  этих производных близки.

Интересная особенность – в обоих семействах, U31 и U2, все аптамеры сохраняли отмеченные ранее два идентичных тетра-нуклеотида: TTTG и TATG. Предстоит выяснить, являются ли они сигнатурами узнающих элементов структуры.

Что касается сравнения аффинности двух исходных аптамеров U2 и U31, то полученные разными авторами и разными методами данные (табл. 1 и 3) хорошо коррелируют между собой.

Обнаружение факта, что небольшие изменения структуры аптамеров приводят к кратному изменению аффинности, делает осмысленным переход к изучению взаимодействия аптамеров с рецептором EGFR в составе клеток.

**Определение аффинности анти-EGFR ДНК-аптамеров методом ИБС.** Метод ИБС основан на явлении интерференции отражённого света от торцевой поверхности оптоволоконного датчика и позволяет анализировать взаимодействие иммобилизованных аптамеров с белком-мишенью EGFR\* в растворе в режиме реального времени. Регистрация комплексообразования в реальном времени позволяет рассчитать кинетические константы скорости ассоциации и диссоциации, а их отношение определяет  $K_d$  (рис. П4 в Приложении). Метод ИБС активно применяется для комплексов аптамеров с белками [33].

Для представителя семейства U31, сконструированного ранее, GR20, при укорочении и предполагаемой частичной стабилизации концевой двутяжевого участка скорость образования комплекса замедляется примерно в 1,4 раза, но при этом во столько же раз замедляется и скорость диссоциации. Таким образом, аффинность к белку остаётся прежней. Снижение скоростей ассоциации и диссоциации для аптамера GR20, по сравнению с исходным U31, согласуется с выдвинутым ранее предположением о связи аффинности аптамера со стабильностью образуемой структуры. Возможно, более длинный и конформационно подвижный аптамер U31 с дефектной вторичной структурой быстрее адаптируется к белку при ассоциации, по тем же причинам диссоциирует быстрее. Кинетические параметры позволяют определить выбор в пользу медленно диссоциирующего аптамера GR20, если скорость образования комплекса с рецептором не критична.

Важно понять, как влияет на взаимодействие с белком EGFR\* пошаговое укорочение и стабилизация ДНК-аптамеров. Это сделано на примере семейства аптамеров U2. Исходный 76-мерный аптамер U2 при укорочении до 49-мерного аптамера U2s теряет аффинность к белку:  $K_d = 18$  нМ против 25 нМ соответственно. По-видимому, причиной является дестабилизация аптамера, которая обсуждалась в предыдущем разделе о ПФ. По расчётным данным, построенным на аппроксимации, скорости образования комплекса примерно одинаковы ( $k_{on} \times 10^{-5} - 1,1 \pm 0,2 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  и  $0,9 \pm 0,1 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  соответственно). Однако сравнение характера кривых ассоциации/диссоциации в диапазоне концентраций 6,4–51,2 нМ гово-

рит о более быстрой адаптации короткого аптамера U2s к белку EGFR\*, но при этом комплекс становится менее стабильным, что приводит к потере аффинности.

Неожиданные свойства показал сконструированный аптамер Gol1. Как это было уже описано выше, замена большинства комплементарных пар аптамера U2s на пары G–C не привела к потере аффинности Gol1 к белку, то же самое справедливо и для данных ИБС:  $K_d = 18$  нМ и 17 нМ для аптамеров U2 и Gol1 соответственно. При этом кинетические данные для аптамера Gol1 и исходного аптамера U2 также совпадают. По-видимому, стабильная конформация у аптамера Gol1 при наличии коаксиального стэкинга отвечает только за правильное позиционирование двух упомянутых ранее узнающих участков. Как следствие, можно предположить, что в узнавании белка EGFR\* участвуют петли, а не комплементарные пары нуклеотидов в стеблях шпильки предполагаемой вторичной структуры ДНК-аптамеров.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как равновесный метод в растворе – ПФ, так и кинетический метод с аптамерами, иммобилизованными на поверхности – ИБС, дают воспроизводимые результаты для сравнения аффинности ДНК-аптамеров к EGFR\*. Полученные при титровании белком EGFR\* только численные значения равновесных  $K_d$  не являются единственным критерием для сравнения аффинности аптамеров, поскольку выражены через концентрацию белка, что, в свою очередь, определяется его удельной активностью. Сами по себе численные характеристики в виде констант существенно зависят, например, от методов аппроксимации кривых титрования и удельной активности белка. Для выбора аптамера чрезвычайно важно оценивать результат взаимодействий аптамер–мишень комплексно, в том числе учитывая амплитуду и скорость изменения, т.е. кривизну, кинетических кривых ассоциации и диссоциации.

**Вклад авторов.** Копылов А.М., Павлова Г.В. – концепция и руководство работой; Антипова О.А., Моисеенко В.Л., Рыбина А.А. – проведение экспериментов; Антипова О.А., Рыбина А.А., Моисеенко В.Л., Копылов А.М., Мухаметова Л.И., Ерёмин С.А. – обсуждение результатов исследования; Моисеенко В.Л., Антипова О.М., Копылов А.М. – написание и редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2024-561 от 24.04.2024 г.).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием лю-

дей или использованием животных в качестве объектов.

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Di Mauro, V., Lauta, F.C., Modica, J., Appleton, S. L., De Franciscis, V., and Catalucci, D. (2023) Diagnostic and therapeutic aptamers: a promising pathway to improved cardiovascular disease management, *JACC Basic Transl. Sci.*, **9**, 260-277, <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2023.06.013>.
2. Kejamurthy, P., and Devi, K. T. R. (2023) Immune checkpoint inhibitors and cancer immunotherapy by aptamers: an overview, *Med. Oncol.*, **41**, 40, <https://doi.org/10.1007/s12032-023-02267-4>.
3. Lin, B., Xiao, F., Jiang, J., Zhao, Z., and Zhou, X. (2023) Engineered aptamers for molecular imaging, *Chem. Sci.*, **14**, 14039-14061, <https://doi.org/10.1039/d3sc03989g>.
4. Murray, M. T., and Wetmore, S. D. (2024) Unlocking precision in aptamer engineering: a case study of the thrombin binding aptamer illustrates why modification size, quantity, and position matter, *Nucleic Acids Res.*, **52**, 10823-10835, <https://doi.org/10.1093/nar/gkae729>.
5. Plach, M., and Schubert, T. (2020) Biophysical characterization of aptamer-target interactions, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **174**, 1-15, [https://doi.org/10.1007/10\\_2019\\_103](https://doi.org/10.1007/10_2019_103).
6. An, Z., Aksoy, O., Zheng, T., Fan, Q. W., and Weiss, W. A. (2018) Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies, *Oncogene*, **37**, 1561-1575, <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0045-7>.
7. Sabbah, D. A., Hajjo, R., and Sweidan, K. (2020) Review on epidermal growth factor receptor (EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors, *Curr. Top. Med. Chem.*, **20**, 815-834, <https://doi.org/10.2174/1568026620666200303123102>.
8. Li, N., Larson, T., Nguyen, H. H., Sokolov, K. V., and Ellington, A. D. (2010) Directed evolution of gold nanoparticle delivery to cells, *Chem. Commun. (Camb)*, **46**, 392-394, <https://doi.org/10.1039/b920865h>.
9. Li, N., Nguyen, H. H., Byrom, M., and Ellington, A. D. (2011) Inhibition of cell proliferation by an anti-EGFR aptamer, *PLoS One*, **6**, e20299, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020299>.
10. Cruz Da Silva, E., Foppolo, S., Lhermitte, B., Ingremau, M., Justiniano, H., Klein, L., Chenard, M. P., Vauchelles, R., Abdallah, B., Lehmann, M., Etienne-Selloum, N., Dontenwill, M., and Choulier, L. (2022) Bioimaging nucleic-acid aptamers with different specificities in human glioblastoma tissues highlights tumoral heterogeneity, *Pharmaceutics*, **14**, 1980, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14101980>.
11. Avutu, V. (2010) Avidity effects of MinE07, an anti-EGFR aptamer, on binding to A431 cells, *The University of Texas at Austin Texas ScholarWorks*, URL: <https://repositories.lib.utexas.edu/items/fbdce8b0-71cf-4422-a5c2-16c7e5695544>.
12. Cheng, S., Jacobson, O., Zhu, G., Chen, Z., Liang, S. H., Tian, R., Yang, Z., Niu, G., Zhu, X., and Chen, X. (2019) PET imaging of EGFR expression using an 18F-labeled RNA aptamer, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **46**, 948-956, <https://doi.org/10.1007/s00259-018-4105-1>.
13. Paul, A. R., Falsaperna, M., Lavender, H., Garrett, M. D., and Serpell, C. J. (2023) Selection of optimised ligands by fluorescence-activated bead sorting, *Chem. Sci.*, **14**, 9517-9525, <https://doi.org/10.1039/d3sc03581f>.
14. Esposito, C. L., Passaro, D., Longobardo, I., Condorelli, G., Marotta, P., Affuso, A., de Franciscis, V., and Cerchia, L. (2011) A neutralizing RNA aptamer against EGFR causes selective apoptotic cell death, *PLoS One*, **6**, e24071, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024071>.
15. Wang, D. L., Song, Y. L., Zhu, Z., Li, X. L., Zou, Y., Yang, H. T., Wang, J. J., Yao, P. S., Pan, R. J., Yang, C. J., and Kang, D. Z. (2014) Selection of DNA aptamers against epidermal growth factor receptor with high affinity and specificity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **453**, 681-685, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.09.023>.
16. Wu, X., Liang, H., Tan, Y., Yuan, C., Li, S., Li, X., Li, G., Shi, Y., and Zhang, X. (2014) Cell-SELEX aptamer for highly specific radionuclide molecular imaging of glioblastoma *in vivo*, *PLoS One*, **9**, e90752, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090752>.
17. Zavyalova, E., Turashev, A., Novoseltseva, A., Legatova, V., Antipova, O., Savchenko, E., Balk, S., Golovin, A., Pavlova, G., and Kopylov, A. (2020) Pyrene-modified DNA aptamers with high affinity to wild-type EGFR and EGFRvIII, *Nucleic Acid Ther.*, **30**, 175-187, <https://doi.org/10.1089/nat.2019.0830>.
18. Kim, K., Lee, S., Ryu, S., and Han, D. (2014) Efficient isolation and elution of cellular proteins using aptamer-mediated protein precipitation assay, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **448**, 114-119, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.086>.

19. Damase, T. R., Miura, T. A., Parent, C. E., and Allen, P. B. (2018) Application of the open qPCR instrument for the *in vitro* selection of DNA aptamers against epidermal growth factor receptor and *Drosophila* C virus, *ACS Comb. Sci.*, **20**, 45-54, <https://doi.org/10.1021/acscombsci.7b00138>.
20. Damase, T. R., and Allen, P. B. (2019). Idiosyncrasies of thermofluorimetric aptamer binding assays, *BioTechniques*, **66**, 121-127, <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0128>.
21. Il'in, V. A., Pyzhik, E. V., Balakhonov, A. B., Kiryushin, M. A., Shcherbatova, E. V., Kuznetsov, A. A., Kostin, P. A., Golovin, A. V., Korshun, V. A., Brylev, V. A., Sapozhnikova, K. A., Kopylov, A. M., Pavlova, G. V., and Pronin, I. N. (2022) Radiochemical synthesis of 4-[18F]FluorobenzylAzide and its conjugation with EGFR-specific aptamers, *Molecules*, **28**, 294, <https://doi.org/10.3390/molecules28010294>.
22. Mathews, D. H., Disney, M. D., Childs, J. L., Schroeder, S. J., Zuker, M., and Turner, D. H. (2004) Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7287-7292, <https://doi.org/10.1073/pnas.0401799101>.
23. Reuter, J. S., and Mathews, D. H. (2010) RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis, *BMC Bioinformatics*, **11**, 129, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-129>.
24. SantaLucia J., Jr. (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1460-1465, <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1460>.
25. SantaLucia, J., Jr., and Hicks, D. (2004) The thermodynamics of DNA structural motifs, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **33**, 415-440, <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141800>.
26. Hirka, S., and McKeague, M. (2021) Quantification of aptamer-protein binding with fluorescence anisotropy, *Aptamers*, **5**, 1-6, <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.13355.57124>.
27. Weaver, S. D., and Whelan, R. J. (2021) Characterization of DNA aptamer-protein binding using fluorescence anisotropy assays in low-volume, high-efficiency plates, *Anal. Methods*, **13**, 1302-1307, <https://doi.org/10.1039/d0ay02256j>.
28. O'Shannessy, D. J., Brigham-Burke, M., Soneson, K. K., Hensley, P., and Brooks, I. (1993) Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods, *Anal. Biochem.*, **212**, 457-468, <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1355>.
29. Cao, Z., and Tan, W. (2005) Molecular aptamers for real-time protein-protein interaction study, *Chemistry*, **11**, 4502-4508, <https://doi.org/10.1002/chem.200400983>.
30. Ferré-D'Amaré, A. R., and Doudna, J. A. (1999) RNA folds: insights from recent crystal structures, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **28**, 57-73, <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.28.1.57>.
31. Sarkar, R., Mainan, A., and Roy, S. (2024) Influence of ion and hydration atmospheres on RNA structure and dynamics: insights from advanced theoretical and computational methods, *Chem. Commun. (Camb)*, **60**, 3624-3644, <https://doi.org/10.1039/d3cc06105a>.
32. Zhao, Q., Tao, J., Feng, W., Uppal, J. S., Peng, H., and Le, X. C. (2020) Aptamer binding assays and molecular interaction studies using fluorescence anisotropy – a review, *Anal. Chim. Acta*, **1125**, 267-278, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.05.061>.
33. Jha, R., Gorai, P., Shrivastav, A., and Pathak, A. (2024) Label-free biochemical sensing using processed optical fiber interferometry: a review, *ACS Omega*, **9**, 3037-3069, <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03970>.

## POST-SELECTION DESIGN OF APTAMERS: COMPARATIVE STUDY OF THE DNA APTAMERS AFFINITY TO THE RECOMBINANT EXTRACELLULAR DOMAIN OF HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTORS

V. L. Moiseenko<sup>1,2\*</sup>, O. M. Antipova<sup>1,3</sup>, A. A. Rybina<sup>1</sup>, L. I. Mukhametova<sup>1</sup>,  
S. A. Eremin<sup>1</sup>, G. V. Pavlova<sup>2,3</sup>, and A. M. Kopylov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: valerian.moiseenko@gmail.com

<sup>2</sup> Burdenko National Medical Research Institute for Neurosurgery, 125047 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,  
117485 Moscow, Russia

The current work provides a comparative assessment of the designed DNA aptamers affinity for the extracellular domain of the human epidermal growth factor receptor (EGFR\*). The affinity data of the 20 previously published aptamers are summarized. The diversity of aptamer selection methods

and techniques requires the unification of comparison algorithms, which is also necessary for designing aptamers used in post-selection fitting to the target protein EGFR\*. In this study the affinity of DNA aptamers from two families – U31 and U2, previously obtained by Wu et al. from the same selection [Wu et al. (2014) *PLoS One*, **9**, e90752] and their derivatives – GR20, U2s and Gol1, obtained by us through rational development, was compared. The aptamer affinity for EGFR\* was measured by two different methods: a solution-phase technique – fluorescence polarization of FAM-labeled aptamers, and by a kinetic method using biolayer interferometry technique with aptamers immobilized on the surface. Unlike the values of equilibrium dissociation constants obtained through titration and expressed in units of protein concentration, the analysis of the titration profiles themselves and the kinetics of interaction proved to be more informative. This allowed us to identify how even subtle changes in the aptamers and their structures affect the affinity. Hypotheses regarding the “structure–function” relationships and recognition mechanisms were formulated. The data obtained for the set of aptamer constructions are critical for moving forward to examination of aptamer interactions with EGFR on the cell surface.

**Keywords:** aptamer, EGFR, affinity, biolayer interferometry, fluorescence polarization