

Received: 2015.01.19
Accepted: 2016.02.11
Published: 2016.05.04

Wykorzystanie aptamerów oligonukleotydowych w terapii nowotworów

The use of oligonucleotide aptamers in cancer therapy

Adrian Odrzywolski¹, Adam Waśko²

¹Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

²Katedra Biotechnologii, Żywnienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Streszczenie

Aptamery są nową klasą cząsteczek, które odkryto w latach 90 ubiegłego wieku. Są to najczęściej oligonukleotydy DNA bądź RNA, których długość waha się między 20 a 80 nt. Wytwarzane są z wykorzystaniem metod SELEX, które pozwalają na uzyskanie aptamerów wiążących się z teoretycznie dowolną badaną cząsteczką, zapewniając bardzo dobrą swoistość. Aptamery mogą być wykorzystywane zamiast przeciwciał ponieważ ich czułość jest na podobnym, a niekiedy wyższym poziomie i nie wykazują immunogenności oraz można je syntetyzować *in vitro*. Dotąd przedstawiono wiele różnych zastosowań aptamerów: od składników biosensorów po wykorzystanie w różnych technikach laboratoryjnych, takich jak mikromacierze czy chromatografii. Jedną z najważniejszych jest wykorzystanie aptamerów w medycynie, a zwłaszcza w walce z nowotworami. Mogą służyć zarówno do diagnostyki nowotworów jak i do ich zwalczania, zwłaszcza w sposobie dostarczania leków. Najwięcej badań związanych z transportem leków poświęcono dostarczaniu chemioterapeutyków, np. doksorubicyny. Znalazło to zastosowanie w badaniach nad komórkami raka wątroby, stercza, czy komórek ostrej białaczki limfoblastycznej. Inną możliwością jest wykorzystanie aptamerów do dostarczania cząsteczek siRNA. W taki sposób możliwa jest inhibicja procesu kontroli jakości mRNA w komórkach nowotworowych. Kompleks aptameru z lekiem pozwala na bezpośrednie dostarczenie substancji aktywnej do komórek określonego typu, eliminując w znacznym stopniu działanie nieswoiste leku.

Słowa kluczowe: aptamery • SELEX • chemioterapia • siRNA

Summary

Aptamers are a new class of molecules which originated in the 1990s. They are usually RNA or DNA oligonucleotides, the length of which ranges between 20 and 80 nt. They are produced using the SELEX method that allows one to obtain aptamers that bind to virtually any molecule of interest, providing a high specificity. Aptamers are an alternative to antibodies because on the one hand, their sensitivity is at a similar or sometimes even higher level, while on the other hand they do not show immunogenicity, and may be synthesized *in vitro*. To date, a broad range of different applications of aptamers has been described: as components of biosensors, or use in various laboratory techniques, such as microarrays or chromatography. One of the most important is the use of aptamers in medicine, especially in the fight against cancer. They can be used both for diagnosis and for the eradication of cancers – particularly through the delivery of drugs. Currently, most transport-related research is devoted to the delivery of chemotherapeutic drugs, such as doxorubicin. This was used in research on liver cancer cells, prostate, and acute lymphoblastic leukemia blast

Key words:	cells. Another possibility is to use aptamers to deliver siRNAs. In this way inhibition of the quality control process of the mRNA in tumor cells is possible. An aptamer complex with the drug allows for direct delivery of the active substance in a particular cell type, substantially eliminating the non-specific effect of the drug. aptamers • SELEX • drug therapy • siRNA, neoplasms • cancer, phototherapy
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1201115
Word count:	3112
Tables:	–
Figures:	4
References:	54

Adres autora: dr hab. Adam Waśko, Katedra Biotechnologii, Żywnienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin; e-mail: awasko1@tlen.pl

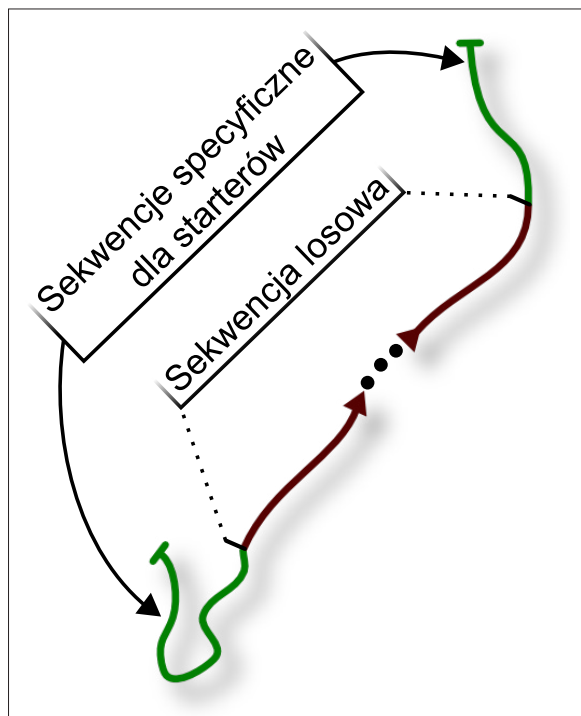
Wykaz skrótów: **EGFR** – receptor nabłonkowego czynnika wzrostu, **EMCH** – hydrazyd kwasu N-e-maleimidokapronowego, **FT-SPR** – spektroskopia rezonansu plazmonów powierzchniowych z transformacją Fouriera, **HUVEC** – ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej (human umbilical vein endothelial cells), **μFFE** – (micro free flow electrophoresis), **MUC-1** – mucyna błonowa, **NMD** – degradacja mRNA niosących przedwczesny kodon STOP (nonsense-mediated decay), **PAH** – poli(chlorowodorek alliloaminy), **PAUF** – czynnik regulujący gruczolakoraka trzustki, **PCR** – łańcuchowa reakcja polimerazy, **PDDA** – chlorek poli(diallilodimetyloamonu), **QD** – kropka kwantowa, **QD-COOD** – kropka kwantowa, wzbogacona o grupy karboksylowe, **SAM** – kanapkowa mikromacierz aptamerowa (sandwich aptamer microarray), **SELEX** – systematyczna ewolucja ligandów poprzez wykładnicze wzbogacanie (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), **SMG1** – serynowo-treoninowa kinaza białkowa, **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor), **UPF** – regulator nonsensownych transkryptów.

WSTĘP

Aptamery są najczęściej jednoniciowymi oligonukleotydami RNA lub DNA o ściśle określonej strukturze przestrzennej. Ich odkrycie i rozwój to początek lat 90 ub.w. Miały w tym udział dwie niezależne grupy – Golda [49] i Szostaka [7]. Wykazali bowiem, że te krótkie kwasy nukleinowe cechują się zdolnością przestrzennego dopasowania się do różnych cząsteczek oraz łączenia z nimi za pomocą wiązań niekowalencyjnych. Każdy aptamer składa się z dwóch części: sekwencji losowej oraz flankujących ją sekwencji komplementarnych do starterów (ryc. 1). Sekwencja losowa jest rdzeniem całego aptameru i określa jego strukturę. Jej długość jest różna, zazwyczaj waha się między 20 a 80 nukleotydów [46], chociaż niekiedy jest wymagane zastosowanie znacznie dłuższych – 100 nukleotydowych sekwencji. Im dłuższy łańcuch, tym proces jest mniej wydajny, ale jednocześnie uzyskuje się znacznie bardziej skomplikowane struktury, co zwiększa selektywność jego wiązania z badaną cząsteczką [46]. Sekwencje komplementarne do starterów są konieczne do amplifikacji wyselekcjonowanych aptamerów metodą PCR (ryc. 1).

Aptamery mogą się wiązać z cząsteczkami o różnicowanej strukturze i budowie chemicznej. Mogą być to niewielkie cząsteczki, takie jak: nukleotydy [39], jony metali [23], kofaktory [36], aminokwasy [13] czy też antybiotyki [1], ale również makrocząsteczki: białka, kwasy nukleinowe, czy cukry [51]. Choć masa nie jest najważniejszym czynnikiem, to warto zaznaczyć, że wraz ze wzrostem powierzchni cząsteczki docelowej, zwiększa się szansa przyłączenia aptameru, dzięki obecności dużej liczby miejsc wiązań aptameru do cząsteczki. Czynnikiem decydującym o możliwości zaprojektowania aptameru są wiązania, które mogą powstać między kompleksem aptamer-target. Obecność donorów/akceptorów wiązania wodorowego, czy dodatniego ładunku znacznie zwiększa zdolności wiązania aptameru. Jednak charakter hydrofobowy, czy też ujemny ładunek sumaryczny cząsteczki wpływają negatywnie na wiązanie aptameru do cząsteczki docelowej [46].

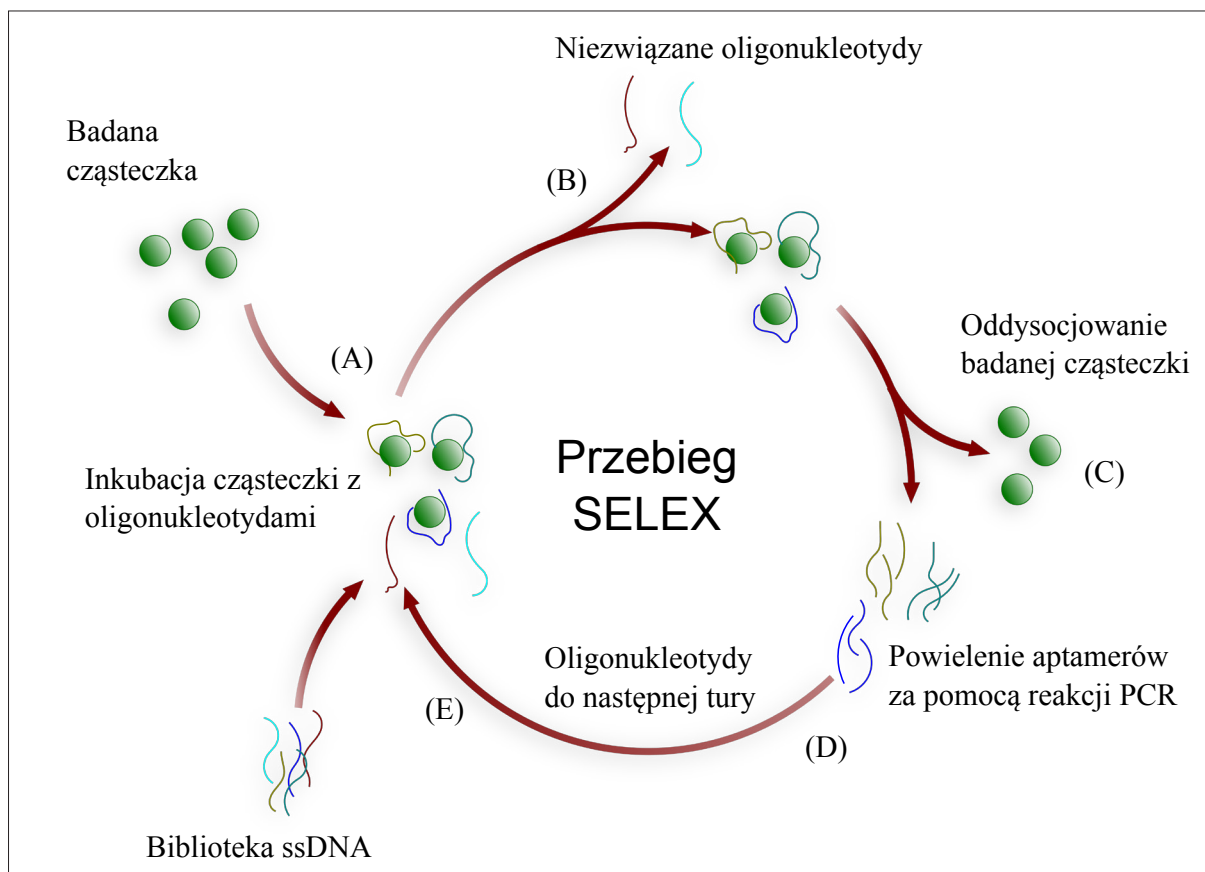
Odpowiednia selekcja to główny etap wytwarzania aptameru; najlepszym sposobem selekcji jest algorytm SELEX złożony z kilku etapów (ryc. 2):



Ryc. 1. Struktura cząsteczki aptameru

- Przygotowanie biblioteki losowych cząsteczek DNA, syntezowanych metodą chemii kombinatorycznej. Taka biblioteka składa się zazwyczaj z 10^{13} - 10^{15} oligonukleotydów, które pokrywają w większym lub mniejszym stopniu całkowitą możliwą liczbę aptamerów dla danej długości sekwencji losowej. Całkowita liczba wynosi X^N , gdzie X to liczba nukleotydów – zazwyczaj cztery, od A C T G, a N to długość sekwencji losowej.
- Inkubacja badanej cząsteczki z biblioteką oligonukleotydów.
- Przeprowadzenie selekcji na zasadzie frakcjonowania roztworu inkubacyjnego na dwie części: kompleksy aptamer-cząsteczka oraz niezwiązane aptamery. W tym celu stosuje się wiele różnych technik. Na przykład, zastosowanie chromatografii powinowactwa pozwala na uzyskanie aptamerów o optymalnym powinowactwie po 30 turach selekcji, a z użyciem μ FFE już nawet po 4 [17]. W innych metodach stosuje się: kolumny chromatograficzne, membrany nitrocelulozowe oraz fotosieciowanie [11]. Oligonukleotydy wykazujące powinowactwo do badanej cząsteczki zostają wykorzystane w reakcji PCR jako matryca. Szczególne znaczenie w procesie powielania aptamerów odgrywają ich sekwencje flankujące.

Liczba cykli w reakcji PCR jest zmienna dla różnych aptamerów i badanych substancji. Niekiedy wystarcza kilka cykli,



Ryc. 2. Przebieg procesu SELEX; A – połączenie biblioteki ssDNA z badanymi cząsteczkami; B – odpłukanie niezwiązanych cząsteczek ssDNA; C – oddysocjowanie badanej cząsteczki od oligonukleotydów; D – przeprowadzenie reakcji PCR w celu powielenia ssDNA, specyficznych wobec badanej cząsteczki; E – powielone cząsteczki ssDNA zostają użyte do następnego cyklu procesu SELEX

a czasami może być konieczne powtórzenie selekcji kilkanaście razy. Zazwyczaj proces zamyka się w 8-15 cyklach [48].

Warto podkreślić, że bardzo często stosowaną procedurą na tym etapie jest selekcja negatywna. Polega na dodaniu etapu inkubacji z cząsteczkami podobnymi do badanej. Dzięki temu można zwiększyć swoistość wyselekcjonowanego aptameru. W przypadku wytwarzania aptamerów RNA, konieczne jest korzystanie z biblioteki cDNA połączonej z procesem odwrotnej transkrypcji [5,37]. Istnieje bardzo wiele odmian metody SELEX, które są wykorzystywane w konkretnych badaniach. Spośród nich, do walki z nowotworami stosuje się SELEX: bezstarterowy, przełącznikowy, warunkowy, genomowy, dopasowany, komórkowy oraz tkankowy [34].

ZALETY I WADY APTAMERÓW

Jak każde narzędzie, tak i aptamery mają zalety i wady, najważniejsze z nich to [44]:

- Niewielki rozmiar: umożliwia penetrację tkanki, czy przechodzenie przez bariery, takie jak bariera krew-mózg [3], ale niewielkie cząsteczki aptamerów mogą być łatwo wypłukane z organizmu. Dlatego też konieczne jest stosowanie modyfikacji, w celu przedłużenia ich przebywania w organizmie człowieka.
- Swoistość wobec badanej cząsteczki, która często jest na poziomie przeciwciał.
- Brak lub niewielka odpowiedź immunologiczna oraz brak toksyczności. Daje to możliwość szerokiego zastosowania aptamerów w wielu chorobach.
- Niewielki koszt produkcji w porównaniu do konkurencyjnych dla nich przeciwciał.
- Produkcja przebiega *in vitro* przez co nie ma możliwości zanieczyszczenia biologicznymi czynnikami toksycznymi mogącymi indukować odpowiedź immunologiczną, jak również eliminuje wątpliwości natury etycznej związane z wykorzystaniem zwierząt do produkcji przeciwciał.
- Dzięki zastosowaniu standardowej metody – SELEX oraz automatyzacji łatwiej uzyskać powtarzalność uzyskiwanych aptamerów.
- Duża stabilność cząsteczek – odporność na działanie temperatur i czynników uszkadzających białka oraz zdolność do łatwej renaturacji, po zaburzeniu struktury przestrzennej.
- Bardzo duża różnorodność cząsteczek docelowych.
- Wrażliwe na degradację przez nukleazy, wymusza to zastosowanie modyfikacji szkieletu fosforanowego. Najczęściej stosowane modyfikacje to: modyfikacje przy węglu 2' przez dodanie –fluoropirimidyny, –aminopirimidyny [32] oraz grupy –O-metylowej [2], do końca 3' przez dodanie odwrotnej tymidyny [20] oraz biotyny [6], jak również do końca 5' cholesterolu [26], kwasów tłuszczowych [42] czy polikationów [50].

OGÓLNE ZASTOSOWANIE APTAMERÓW

Biosensory

Aptamery są powszechnie stosowane jako elementy biosensory do oznaczania różnych substancji [41]. Można

je wykorzystać do oceny zanieczyszczenia środowiska takimi substancjami jak jony metali ciężkich (Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+}) czy substancje toksyczne (pestycydy, mikotoksyny) [40]. W tym celu wykorzystuje się różne strategie, np. zaawansowanych metod w doświadczeniu Hoanga i wsp. [14], którzy zaproponowali badanie metodą FT-SPR stężenia jonów rtęci Hg^{2+} w wodach jezior. W tym celu przygotowano płytki z nanocząsteczkami złota, do których wiązały się S-końcem cząsteczki aptamerów z 15 nukleotydami tyminy. Ponieważ między nanocząsteczkami złota średnia odległość wynosi około 10 nm, a łańcuchy tyminy mają dużą zdolność wiązania jonów rtęci, możliwe było ich uwięzienie w szczelinach między nanocząsteczkami i zmierzenie widm IR. Taka metoda pozwala na oznaczenie 37 ppt jonów rtęci w roztworze.

Aptamery zostały również wykorzystane do oznaczania obecności różnych czynników wytwarzanych przez patogeny [53]. Jeon i wsp. przedstawili sposób kolorymetrycznego oznaczania pasożytów z rodzaju *Plasmodium*: *P. vivax* i *P. falciparum* – powodujących malarię [16]. W tym celu wyprodukowali aptamer – pL1, swoisty wobec dehydrogenaz mleczanowych wspomnianych gatunków. Do indukowania barwy wykorzystano nanocząsteczki złota (13 nm średnicy), które w stanie wolnym mają kolor czerwony, a po agregacji nadają roztworowi w którym się znajdują kolor niebieski. Zazwyczaj agregacja otrzymywana jest w wyniku użycia dużych stężeń różnych soli. W doświadczeniu użyto kationowych polimerów: PDDA i PAH, które oprócz wydajniejszej agregacji cząsteczek złota, potrafią elektrostatycznie wiązać się z cząsteczkami DNA. Stężenia dehydrogenaz mleczanowych oceniano następująco: do badanego roztworu dodano aptamer pL1. Gdy w roztworze obecna była dehydrogenaza aptamer tworzył kompleks z dehydrogenazą, a polimery kationowe pozostały niezwiązane. Umożliwiło to stworzenie agregatów nanocząsteczki złota-PDDA/PAH i tym samym zmianę barwy z czerwonej na niebieską. Gdy w roztworze nie było dehydrogenazy, polimery wiązały się z aptamerami, uniemożliwiając stworzenia agregatów z cząsteczkami złota. Metoda pozwala szybko i niezbrojonym okiem stwierdzić czy w badanej próbce krwi obecna jest dehydrogenaza mleczanowa *Plasmodium vivax* i *Plasmodium falciparum*, gdy stężenie dehydrogenaz jest co najmniej na poziomie 1 nM.

Narzędzia w metodach laboratoryjnych

Aptamery z powodzeniem mogą zastąpić niektóre stosowane obecnie metody laboratoryjne wykorzystujące przeciwciała lub sondy oligonukleotydowe [34].

Mikromacierze są jedną z technik, w której wykorzystuje się aptamery. Sosic i wsp. zaproponowali utworzenie SAM zdolnej do wykrycia dwóch antygenów: VEGF₁₆₅ oraz trombiny, które strukturalnie charakteryzują się podobnymi domenami [18,45]. Szklaną płytkę pokryto odpowiednimi aptamerami wylapującymi: Vap7(12T)NH₂ dla VEGF₁₆₅ oraz TBA1(12T)NH₂ dla trombiny, po czym naniesiono mieszaninę wspomnianych białek. Do detekcji użyto odpowiednio aptamery: Alexa555-VEa5 i Alexa647-TBA2, które

były sprzężone z barwnikiem fluorescencyjnym Alexa 555 (kolor czerwony) i Alexa 647 (kolor zielony). Uzyskano jednolite barwy wskazujące na swoistą detekcję odpowiednich białek. W dalszej części eksperymentu zastosowano barwnik cyjaninę 5 z aptamerami detekcyjnymi i zestawiono je z odpowiednimi białkami bez znacznika oraz wyznakowane Alexa-555. Pozwoliło to uzyskać w przypadku białek wyznakowanych Alexa-555, kolor żółty.

Innym coraz częstszym zastosowaniem aptamerów, jest użycie ich w chromatografii [43]. Takie wykorzystanie aptamerów opisali Han i wsp. [12] w badaniu stworzyli kolumnę monolityczną do HPLC, w której immobilizowano aptamery swoiste wobec lizozymu – białka występującego w dużych ilościach w białku jaja kurzego. Uzyskano gęstość immobilizacji aptameru na poziomie 290 pmol/ μ l. Pozwoliło to na bardzo wydajne i swoiste wyekstrahowanie i oznaczenie lizozymu pochodzącego z kurzego jaja.

APTAMERY W TERAPII NOWOTWOROWEJ

Jak już wspomniano wcześniej, podstawą działania aptamerów jest ich przestrzenne dopasowanie się do wybranej cząsteczki. Mechanizm umożliwia blokowanie interakcji między różnymi czynnikami, które są istotne dla metabolizmu, a także pozwala na ograniczenie migracji komórek nowotworowych. Jednocześnie mechanizm wiązania aptameru jest na tyle swoisty, że nie wpływa negatywnie na zdrowe komórki. Zdolność migracji komórek nowotworowych jest bardzo istotnym czynnikiem rozwoju choroby oraz jej diagnozy. Wraz ze wzrostem tej zdolności, rokowania pacjentów drastycznie spadają. Do ograniczenia migracji komórek nowotworowych, Zueva i wsp. [54], zaproponował użycie aptamerów. W tym celu stworzono linię komórek nowotworowych chemicznych fibroblastów, która po infekcji wirusem Schmidt-Ruppina D charakteryzowała się różnym stopniem przerzutowania. Selekcja tak uzyskanych komórek nowotworowych pozwoliła na wyodrębnienie z nich linii charakteryzującej się wysokim stopniem przerzutowania HM oraz niskim stopniem migracji LM. W oparciu o tak uzyskane komórki nowotworowe w następnym etapie badań przeprowadzono komórkowy SELEX w celu stworzenia aptamerów swoiście wiążących się do komórek HM. Wynikiem tych badań było opracowanie aptamerów RNA: E10 oraz E37, które dwukrotnie obniżały stopień migracji badanych komórek nowotworowych. Na podstawie zaobserwowanych zmian fenotypowych, przypuszczano, że wspomniane aptamery obniżają stężenie pięciu ufosforylowanych kinaz tyrozynowych (Fak, Alk, Zap70, Syk oraz Frk), co zostało potwierdzone na mikromacierzach białkowych.

Aptamery wykorzystano również do ograniczenia migracji komórek nowotworowych w sposób pośredni, tzn. celem ich wiązania stały się białka receptorowe. Jako przykład może posłużyć integryna $\alpha\beta 3$, która bierze udział w procesach migracji, wzrostu, angiogenezy, przerzutowania i proliferacji komórek nowotworowych. Dotychczas integryna $\alpha\beta 3$ była blokowana za pomocą przeciwciał monoklonalnych oraz tripeptydu RGD, obecnie stosuje

się do tego celu aptamer Apt- $\alpha\beta 3$ [29]. Badania przeprowadzono na liniach komórek HUVEC, gdzie stwierdzono wzrost apoptozy komórek nowotworowych. Przyczyną tego zjawiska był TNF- α , którego działanie było tym silniejsze, im wyższe zastosowano stężenie aptameru.

Inny przykład aptameru RNA, który działa jako inhibitor, przedstawił Kim i wsp. [19]. W pierwszych badaniach opisali nowe białko sekretoryjne, które ulegało nadekspresji w gruczolakoraku trzustki – PAUF. Białko to ma duże znaczenie diagnostyczne, gdyż jego nadekspresja wzmacnia wzrost, migrację i inwazję komórek raka. Następnie przeprowadzono SELEX puli cząsteczek RNA względem PAUF, uprzednio eliminując aptamery swoiste względem białek ludzkiej IgG Fc lub białka G. Do oceny działania aptameru wobec PAUF, wykorzystano linie komórkowe ludzkiego raka trzustki (PANC-1 i CFPAC-1) oraz myszy BALB/c, którym wszczepiono komórki CFPAC-1. Po podaniu aptameru, zarówno u myszy jak i w liniach komórkowych uzyskano jednoznaczne zablokowanie wzrostu nowotworu.

W ostatnich kilku latach połączono technologię produkcji aptamerów z systemami ekspresji białek w układach heterologicznych. Na przykład wytwarzanie ludzkiej α -fetoproteiny w komórkach *Escherichia coli*. Alfa-fetoproteina jest białkiem, które ulega ekspresji głównie w życiu płodowym ludzi i gwałtownie spada po narodzinach. U dorosłych osób jest obecna w krwiobiegu w czasie choroby nowotworowej (głównie w raku wątrobowokomórkowym) oraz w przypadkach wad rozwoju układu nerwowego. Zwłaszcza w tym pierwszym przypadku dopatrywano się wykorzystania aptamerów jako czynnika blokującego aktywność α -fetoproteiny. Opisane sposoby okazały się sukcesem i w badaniach na nowotworowych liniach komórek wątroby ograniczono ich proliferację [22].

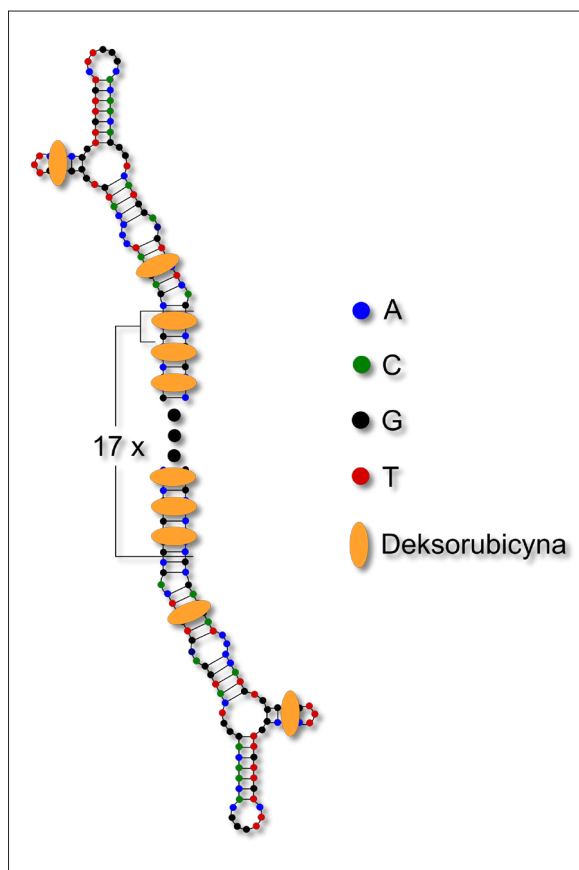
APTAMERY SŁUŻĄCE JAKO SYSTEM TRANSPORTU LEKÓW

Istnieje wiele leków do walki z nowotworami, jednak użycie większości z nich wiąże się z problemem nieswoistości działania. Zastosowanie aptamerów jako systemu dostarczania leków do określonych komórek pozwala na zminimalizowanie bądź wyeliminowanie negatywnych skutków używania leków antynowotworowych.

Chemioterapeutyki

Chemioterapia jest jedną z najważniejszych metod leczenia nowotworów. Jednak jej główną wadą jest brak swoistego działania w stosunku do komórek nowotworowych, co powoduje powstawanie ogólnoustrojowych działań niepożądanych. Możliwym rozwiązaniem tego problemu jest połączenie chemioterapeutyku z cząsteczką rozpoznającą określone struktury. Tym samym aptamery są bardzo atrakcyjnymi cząsteczkami, które pozwalają na bezpośrednie dostarczanie leku do komórek nowotworowych.

Powszechnie stosowanym lekiem w walce z nowotworami jest doksorubicyna, która stała się modelem w pracach



Ryc. 3. Struktura aptameru TLS11a-GC-Dox (wg [28] zmodyfikowano)

nad systemem transportu leków z wykorzystaniem aptamerów. Jest to związek z rzędu antracyklin, który działa cytostatycznie przez wiązanie z DNA, blokując możliwość podziału komórki i jej śmierć. Zaproponowano kilka różnych sposobów połączenia doxorubicyny z aptamerami. Jednym z najprostszych sposobów jest wykorzystanie właściwości doxorubicyny do interkalacji z fragmentami DNA, szczególnie bogatymi w regiony GC. W badaniu nad aptamerami swoistymi wobec komórek raka wątroby [28], do selekcji aptamerów użyto komórkowe SELEX, dzięki któremu uzyskano aptamer TLS11a. Następnie przeprowadzono łączenie długich łańcuchów GC do tego aptameru. Dzięki temu do jednego aptameru mogło dołączyć się do 28 cząsteczek leku (ryc. 3).

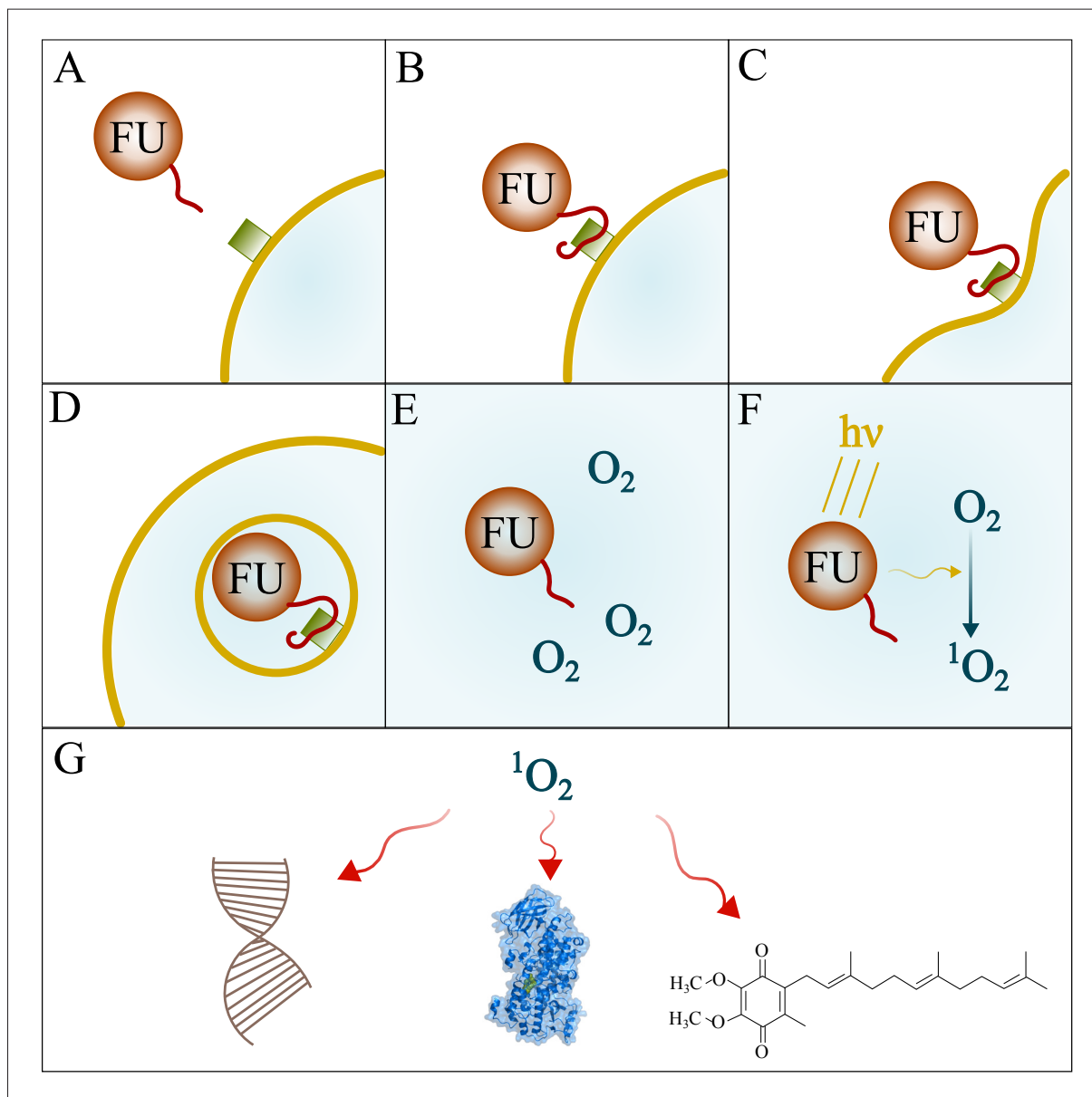
W celu weryfikacji skuteczności takiego kompleksu przeprowadzono dwie próby działania aptameru z lekiem oraz wolnej doxorubicyny na liniach komórkowych i myszach [28]. Zaobserwowano działanie doxorubicyny zarówno związanej z aptamerem jak i wolnej. Kompleks doxorubicyny z aptamerem był znacznie mniej cytotoksyczny niż sam lek. Podobny mechanizm zastosowano również w badaniu komórek raka piersi [24]. Nieco odmienną technikę zastosowano w linii komórkowej ostrej białaczki limfoblastycznej [52], gdzie zastosowano polimery aptamerów skierowanych przeciwko białaczce, między którymi umieszczono sekwencje wy-

dajnie wiążące doxorubicynę. Inną możliwością związania oligonukleotydu z lekiem jest zastosowanie między nimi łącznika. Huang i wsp. zaproponowali w tym celu użycie EMCH i aptameru z dołączoną do końca 5' grupą tiolową uzyskanego za pomocą komórkowego SELEX [15]. W odpowiednich warunkach powstaje trójskładnikowa cząsteczka: doxorubicyna-EMCH-aptamer. Porównano działanie tej cząsteczki z działaniem czystego leku na trzech liniach: ludzkie komórki T ostrej białaczki limfoblastycznej, komórki B chłoniaka Burkitta oraz komórki ostrej białaczki promielocytowej [15]. W każdym przypadku, uzyskano obniżoną żywotność linii komórek nowotworowych.

Innym, bardzo interesującym przykładem wykorzystania aptamerów i doxorubicyny, jest dimer działający przeciw rakowi stercza [31]. Jednym z najczęstszych markerów służących do wykrywania i zwalczania raka stercza, jest swoisty jego antygen błonowy (PSMA). Odnotowano istnienie dwóch linii tego nowotworu – PSMA dodatnia i ujemna. W celu dostarczenia doxorubicyny do obu typów, stworzono dwa aptamery – RNA swoisty dla linii dodatniej i peptydowy dla linii ujemnej. Zostały sprzęgnięte z biotyną, które połączono z kompleksem streptowidyny. Po dodaniu doxorubicyny, która interkaluje w aptamer RNA, zbadano skuteczność tego leku. Stwierdzono skuteczność u obu linii na poziomie użycia czystego chemioterapeutyku, jednocześnie eliminując nieswoiste oddziaływania wobec komórek zdrowych [31].

Doksoubicyna nie jest jedynym chemioterapeutykiem, który może być wykorzystywany z aptamerami. Innym opisanym lekiem jest dołączenie gemcytabiny. Jest to analog nukleotydu cytozyny, który może zostać wbudowany w nić DNA, co zaburza proces replikacji i wywołuje śmierć komórki. Gemcytabina została użyta w połączeniu z aptamerem specyficznym wobec EGFR przeciw rakowi trzustki [35]. Ponieważ EGFR jest nadmiernie wytwarzana w tym typie nowotworu, możliwe jest znaczne obniżenie przyjmowania leku przez zdrowe komórki.

Bardzo interesującym rozwiązaniem jest połączenie z aptamerem kropki kwantowej (QD), nanocząsteczki, będącej półprzewodnikiem. Znajduje zastosowanie jednocześnie jako barwnik fluorescencyjny, również jako nośnik dostarczający różne czynniki. Pozwala to na znaczne rozszerzenie zastosowań wielu modeli leczenia. Przykładem użycia kropki kwantowej, jest jej wykorzystanie do dostarczania doxorubicyny do komórek z nadekspresją genu *MUC-1* [44]. Uzyskanie QD-COOH pozwoliło na dołączenie zarówno aptameru swoistego wobec *MUC-1*, jak i doxorubicyny. Następnie wykorzystując wielolekooporną ludzką linię raka jajnika A2780/AD, a także myszy z zaszczepioną wspomnianą linią komórkową, zbadano internalizację i działanie QD. Stwierdzono, że sprzężone cząsteczki bardzo wydajnie były pobierane do wnętrza komórki i powodowały niewielką cytotoksyczność wobec zdrowych (głównie dlatego, że w QD są obecne jony kadmu i seleny) [38].



Ryc. 4. Działanie aptameru związanego z fotoczułaczem; A – cząsteczka fotoczułacza związanego z aptamerem (FU) w pobliżu receptora; B – związanie aptameru z receptorem; C-D – wpuklenie błony i rozpoczęcie procesu wnikania cząsteczki FU; E – rozproszenie błony komórkowej otaczającej FU; F – fotony pobudzają fotoczułacz, który powoduje powstanie wolnych rodników; G – wolne rodniki uszkadzają różne elementy komórki (kwasy nukleinowe, białka, lipidy)

Niskocząsteczkowy interferujący RNA

Do 1980 r. RNA było powszechnie uważane za pasywne medium, uczestniczące tylko w przenoszeniu informacji genetycznej między DNA a białkiem [30]. Przez kolejne lata poczynając od 1980 r., odkrywano inne funkcje tego polimeru, z jego rolą katalityczną, która stanowi podwaliny pod koncepcję „świata RNA” [10]. W 1998 r. poznano inne rodzaje kwasów rybonukleinowych zdolne do degradacji cząsteczek mRNA określonego genu [9].

Natura cząsteczek siRNA pozwala na bardzo precyzyjne wyciszenie genów, jednak sposobem do użycia jej w celach

leczenia nowotworów jest wyodrębnienie dobrego narzędzia, które pozwoli na uwolnienie siRNA tylko w określonym typie komórek. W innym przypadku, podobnie jak w przypadku chemioterapeutyków, działanie toksyczne będzie widoczne również w zdrowych komórkach.

Najprostszym sposobem dostarczania siRNA, jest stworzenie chimery aptamer-siRNA. Taki mechanizm zastosowano do wyciszenia ekspresji komórek raka stercza [27]. Celem działania kompleksu stały się dwa geny: *Bcl-2* oraz *PLK1*, należące do genów podstawowego metabolizmu (housekeeping gens). Użyty aptamer był skierowany przeciwko swoistemu antygenowi błonowemu stercza (PSMA).

Po związaniu części aptamerowej chimery z PSMA, następowała jej endocytoza do wnętrza komórki. Po uwolnieniu z endosomu, cząsteczka aptamer-siRNA podlegała cięciu za pomocą endonukleazy Dicer, powodując uwolnienie siRNA. Następnie była przetwarzana i wbudowana w kompleks wyciszający RISC, pozwalając na wyciszenie tych genów. Uzyskano w ten sposób regresję raka stercza. Dassie i wsp., opierając się na pracy McNamary i wsp. [27], zmodyfikowali chimerę aptamer-siRNA wobec PLK1 w taki sposób, aby zwiększyć wyciszenie oraz przedłużyć czas występowania chimery w organizmie [4]. Zmianie uległy trzy elementy: aptamer skrócono z 71 nukleotydów do 39 przy zachowaniu jego funkcjonalności, dodano dwa nukleotydy do ds siRNA, co wzmocniło rozpoznanie przez enzym Dicer. Wreszcie do drugiej nici w ds siRNA dołączono 20 kDa łańcuch PEG, który podnosił masę całego układu i poprawiał właściwości farmakokinetyczne kompleksu.

Innym możliwym wykorzystaniem siRNA w połączeniu z aptamerem jest zatrzymanie procesu kontroli jakości mRNA NMD [33]. NMD to system eliminacji cząsteczek mRNA, które w swojej strukturze mają przedwcześnie wbudowany kodon STOP. Na ten proces wpływają różne czynniki, takie jak: SMG1 oraz UPF1, UPF2 i UPF3. Celem doświadczenia było skierowanie siRNA przeciw dwóm spośród wspomnianych czynników: SMG1 oraz UPF2. Następnie sprzęgnięto cząsteczki siRNA z aptamerem swoistym wobec PSMA, co pozwoliło na swoiste wniknięcie całej chimery do wnętrza komórki. W celu weryfikacji metody użyto myszy z wszczepioną nowotworową linią komórkową B16/F10, wykazującą ekspresję czynnika PSMA. Po podaniu myszom aptameru z siRNA blokującym NMD, stwierdzono, że u większości wystąpiło obniżone przerzutowanie nowotworu, a nawet nie stwierdzono jego obecności [33].

Fototerapia

Innym wykorzystaniem aptamerów jest użycie ich do dostarczania fotouczulacza, podstawowego składnika fototerapii. Polega na dostarczeniu substancji fotouczulającej do komórki nowotworowej, aktywowaniu jej światłem, po czym następuje przemiana występującego w komórce tlenu w postaci reaktywne, które uszkadzają elementy komórki (ryc. 4).

Chociaż niektóre nowotwory wykazują właściwości zwiększonego wchłaniania fotouczulaczy, zastosowanie aptamerów może zwiększyć ich wchłanianie przez komórki nowotworowe jednocześnie ograniczając wchłanianie tych substancji przez komórki zdrowe.

Taki model zastosowano w badaniu nad nabłonkowymi komórkami nowotworowymi [8]. W tym celu szukano takich antygenów, które w nieznacznym stopniu ulegają ekspresji w piersi, płucach, okrężnicy, jajnikach i trzustce, a ulegają znamiennej ekspresji w ich nowotworowych odpowiednikach. Wybrano różne warianty MUC-1. Do aptamerów DNA skierowanych przeciwko nim dodano do końca 5' fotouczulacz – chlorynę e6. Po naświetlaniu światłem o długości 664 nm zbadano przeżywalność komórek nowotworowych. Stwierdzono, że zastosowanie terapii z fotouczulaczem było co najmniej 500-krotnie bardziej toksyczne dla komórek nowotworowych niż użycie samej chloryny e6. Podobne postępowanie zastosowano przeciwko komórkom Ramosa i Burkitta [25] czy komórkom IL-6 dodatnim [21].

PODSUMOWANIE

Aptamery są nowym i obiecującym narzędziem w terapii nowotworowej. Chociaż zostały opisane po raz pierwszy na początku lat 90 ubiegłego wieku, leki projektowane w oparciu o nie są dopiero teraz sukcesywnie wprowadzane w leczeniu nowotworów [47]. Ich produkcja jest oparta o usystematyzowaną metodę SELEX, która choć czasochłonna, pozwala uzyskać powtarzalne wyniki. Funkcjonalnością dorównują przeciwciałom, a kosztami produkcji, odpornością na denaturację i możliwościami zastosowań przewyższają je. Wraz z opracowaniem innych metod modyfikacji aptamerów do ochrony przed degradacją nukleazami, mają szansę stać się jednym z ważnych sposobów dostarczania leków o dużej swoistości. Dotąd opisano wiele prób ich wykorzystania, które można podzielić na dwie główne grupy. Pierwsza z nich, to użycie aptamerów jako bezpośrednich inhibitorów. Druga to użycie ich jako systemu dostarczania chemioterapeutyków, środków fotouczulających czy też cząsteczek siRNA.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Berens C., Thain A., Schroeder R.: A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorg. Med. Chem.*, 2001; 9: 2549-2556
- [2] Burmeister P.E., Lewis S.D., Silva R.F., Preiss J.R., Horwitz L.R., Pendergrast P.S., McCauley T.G., Kurz J.C., Epstein D.M., Wilson C., Keefe A.D.: Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF. *Chem. Biol.*, 2005; 12: 25-33
- [3] Cheng C., Chen Y.H., Lennox K.A., Behlke M.A., Davidson B.L.: *In vivo* SELEX for identification of brain-penetrating aptamers. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2013; 2: e67
- [4] Dassie J.P., Lie X., Thomas G.S., Whitaker R.M., Thiel K.W., Stockdale K.R., Meyerholz D.K., McCaffrey A.P., McNamara J.O.2nd, Giangrande P.H.: Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nat. Biotechnol.*, 2009; 27: 839-849
- [5] Davlieva M., Donarski J., Wang J., Shamooy Y., Nikonowicz E.P.: Structure analysis of free and bound states of an RNA aptamer against ribosomal protein S8 from *Bacillus anthracis*. *Nucleic Acids Res.*, 2014; 42: 10795-10808
- [6] Dougan H., Lyster D.M., Vo C.V., Stafford A., Weitz J.I., Hobbs J.B.: Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood. *Nucl. Med. Biol.*, 2000; 27: 289-297
- [7] Ellington A.D., Szostak J.W.: *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990; 346: 818-822
- [8] Ferreira C.S., Cheung M.C., Missailidis S., Bisland S., Gariépy J.: Phototoxic aptamers selectively enter and kill epithelial cancer cells. *Nucleic Acids Res.*, 2009; 37: 866-876

- [9] Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998; 391: 806-811
- [10] Gilbert W.: Origin of life: The RNA world. *Nature*, 1986; 319: 618
- [11] Hamula C.L., Guthrie J.W., Zhang H., Li X.F., Le C.X.: Selection and analytical applications of aptamers. *Trends Analyt. Chem.*, 2006; 25: 681-691
- [12] Han B., Zhao C., Yin J., Wang H.: High performance aptamer affinity chromatography for single-step selective extraction and screening of basic protein lysozyme. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2012; 903: 112-117
- [13] Harada K., Frankel A.D.: Identification of two novel arginine binding DNAs. *EMBO J.*, 1995; 14: 5798-5811
- [14] Hoang C.V., Oyama M., Saito O., Aono M., Nagao T.: Monitoring the presence of ionic mercury in environmental water by plasmon-enhanced infrared spectroscopy. *Sci. Rep.*, 2013; 3: 1175
- [15] Huang Y.F., Shangguan D., Liu H., Phillips J.A., Zhang X., Chen Y., Tan W.: Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells. *ChemBiochem*, 2009; 10: 862-868
- [16] Jeon W., Lee S., Manjunatha D. H., Ban C.: A colorimetric aptasensor for the diagnosis of malaria based on cationic polymers and gold nanoparticles. *Anal. Biochem.*, 2013; 439: 11-16
- [17] Jing M., Bowser M.T.: Isolation of DNA aptamers using micro free flow electrophoresis. *Lab Chip*, 2011; 11: 3703-3709
- [18] Keyt B.A., Berleau L.T., Nguyen H.V., Chen H., Heinsohn H., Vandlen R., Ferrara N.: The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 7788-7795
- [19] Kim Y.H., Sung H.J., Kim S., Kim E.O., Lee J.W., Moon J.Y., Choi K., Jung J.E., Lee Y., Koh S.S., Rhee S.G., Heo K., Kim I.H.: An RNA aptamer that specifically binds pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor inhibits migration and growth of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett.*, 2011; 313: 76-83
- [20] Klusmann S.: *The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, 2006
- [21] Kruspe S., Meyer C., Hahn U.: Chlorin e6 conjugated interleukin-6 receptor aptamers selectively kill target cells upon irradiation. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2014; 3: e143
- [22] Lee Y.J., Lee S.: Regression of hepatocarcinoma cells using RNA aptamer specific to alpha-fetoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012; 417: 521-527
- [23] Li D., Wieckowska A., Willner I.: Optical analysis of Hg²⁺ ions by oligonucleotide-gold-nanoparticle hybrids and DNA-based machines. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2008; 47: 3927-3931
- [24] Liu Z., Duan J.H., Song Y.M., Ma J., Wang F.D., Lu X., Yang X.D.: Novel HER2 aptamer selectively delivers cytotoxic drug to HER2-positive breast cancer cells *in vitro*. *J. Transl. Med.*, 2012; 10: 148
- [25] Mallikaratchy P., Tang Z., Tan W.: Cell specific aptamer-photosensitizer conjugates as a molecular tool in photodynamic therapy. *ChemMedChem*, 2008; 3: 425-428
- [26] Manoharan M.: Oligonucleotide conjugates as potential antisense drugs with improved uptake, biodistribution, targeted delivery, and mechanism of action. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 2002; 12: 103-128
- [27] McNamara J.O.2nd, Andrechek E.R., Wang Y., Viles K.D., Rempel R.E., Gilboa E., Sullenger B.A., Giangrande P.H.: Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat. Biotechnol.*, 2006; 24: 1005-1015
- [28] Meng L., Yang L., Zhao X., Zhang L., Zhu H., Liu C., Tan W.: Targeted delivery of chemotherapy agents using a liver cancer-specific aptamer. *PLoS One*, 2012; 7: e33434
- [29] Mi J., Zhang X., Giangrande P.H., McNamara J.O.2nd, Nimjee S.M., Sarraf-Yazdi S., Sullenger B.A., Clary B.M.: Targeted inhibition of $\alpha\beta 3$ integrin with an RNA aptamer impairs endothelial cell growth and survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 338: 956-963
- [30] Miele E., Spinelli G.P., Miele E., Di Fabrizio E., Ferretti E., Tomao S., Gulino A.: Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy. *Int. J. Nanomedicine*, 2012; 7: 3637-3657
- [31] Min K., Jo H., Song K., Cho M., Chun Y., Jon S., Kim W.J., Ban C.: Dual-aptamer-based delivery vehicle of doxorubicin to both psmA (+) and psmA (-) prostate cancers. *Biomaterials*, 2011; 32: 2124-2132
- [32] Pagratis N.C., Bell C., Chang Y.F., Jennings S., Fitzwater T., Jellinek D., Dang C.: Potent 2'-amino-, and 2'-fluoro-2'-deoxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor. *Nat. Biotechnol.*, 1997; 15: 68-73
- [33] Pastor F., Kolonias D., Giangrande P.H., Gilboa E.: Induction of tumour immunity by targeted inhibition of nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*, 2010; 465: 227-230
- [34] Radom F., Jurek P.M., Mazurek M.P., Otlewski J., Jeleń F.: Aptamers: molecules of great potential. *Biotechnol. Adv.*, 2013; 31: 1260-1274
- [35] Ray P., Cheek M.A., Sharaf M.L., Li N., Ellington A.D., Sullenger B.A., Shaw B.R., White R.R.: Aptamer-mediated delivery of chemotherapy to pancreatic cancer cells. *Nucleic Acid Ther.*, 2012; 22: 295-305
- [36] Roychowdhury-Saha M., Lato S.M., Shank E.D., Burke D.H.: Flavin recognition by an RNA aptamer targeted toward FAD. *Biochemistry*, 2002; 41: 2492-2499
- [37] Sapag A., Salinas-Luypaert C., Constenla-Muñoz C.: First report of *in vitro* selection of RNA aptamers targeted to recombinant *Loxosceles laeta* spider toxins. *Biol. Res.*, 2014; 47: 2
- [38] Savla R., Taratula O., Garbuzenko O., Minko T.: Tumor targeted quantum dot-mucin 1 aptamer-doxorubicin conjugate for imaging and treatment of cancer. *J. Control Release*, 2011; 153: 16-22
- [39] Sazani P.L., Larralde R., Szostak J.W.: A small aptamer with strong and specific recognition of the triphosphate of ATP. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004; 126: 8370-8371
- [40] Sett A., Das S., Bora U.: Functional nucleic-acid-based sensors for environmental monitoring. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2014; 174: 1073-1091
- [41] Sett A., Das S., Sharma P., Bora U.: Aptasensors in health, environment and food safety monitoring. *OJAB*, 2012; 1: 9-19
- [42] Shea R.G., Marsters J.C., Bischofberger N.: Synthesis, hybridization properties and antiviral activity of lipid-oligonucleotide conjugates. *Nucleic Acids Res.*, 1990; 18: 3777-3783
- [43] Šmuc T., Ahn I.Y., Ulrich H.: Nucleic acid aptamers as high affinity ligands in biotechnology and biosensors. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2013; 81-82: 210-217
- [44] Song K.M., Lee S., Ban C.: Aptamers and their biological applications. *Sensors*, 2012; 12: 612-631
- [45] Sosic A., Meneghello A., Antognoli A., Cretajo E., Gatto B.: Development of a multiplex sandwich aptamer microarray for the detection of VEGF165 and thrombin. *Sensors*, 2013; 13: 13425-13438
- [46] Stoltenburg R., Reinemann C., Strehlitz B.: SELEX – a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol. Eng.*, 2007; 24: 381-403
- [47] Sundaram P., Kurniawan H., Byrne M.E., Wower J.: Therapeutic RNA aptamers in clinical trials. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2013; 48: 259-271
- [48] Toh S.Y., Citartan M., Gopinath S.C., Tang T.H.: Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosens. Bioelectron.*, 2015; 64: 392-403

- [49] Tuerk C., Gold L.: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990; 249: 505-510
- [50] Vinogradov S.V., Suzdaltseva Y.G., Kabanov A.V.: Block polycationic oligonucleotide derivative: synthesis and inhibition of herpes virus reproduction. *Bioconjug. Chem.*, 1996; 7: 3-6
- [51] Yang Q., Goldstein I.J., Mei H.Y., Engelke D.R.: DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 5462-5467
- [52] Zhang Z., Ali M.M., Eckert M.A., Kang D.K., Chen Y.Y., Sender L.S., Fruman D.A., Zhao W.: A polyvalent aptamer system for targeted drug delivery. *Biomaterials*, 2013; 34: 9728-9735
- [53] Zimbres F.M., Tárnok A., Ulrich H., Wrenger C.: Aptamers: novel molecules as diagnostic markers in bacterial and viral infections? *Biomed. Res. Int.*, 2013; 2013: 731516
- [54] Zueva E., Rubio L.I., Duconge F., Tavitian B.: Metastasis-focused cell-based SELEX generates aptamers inhibiting cell migration and invasion. *Int. J. Cancer*, 2011; 128: 797-804

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.