APTAMERY I ICH KONIUGATY JAKO NOWE SPOSOBY DOSTARCZANIA SUBSTANCJI TERAPEUTYCZNYCH DO KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

APTAMERS AND THEIR CONJUGATES AS A NEW WAY TO DELIVER THERAPEUTIC AGENTS TO THE TUMOR CELLS

Marzena SZWED[1], Katarzyna Dominika KANIA[2], Aneta ROGALSKA[1], Ralph SANTOS-OLIVEIRA[3], Sotiris MISSAILIDIS[3], Agnieszka MARCZAK[1]

[1]Katedra Termobiologii, Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki
[2]Pracownia Regulacji Transkrypcyjnej, Instytut Biologii Medycznej PAN, Łódź
[3]Laboratory of Nanoradiopharmaceuticals, Zona Oeste Estadual University, Brazylia

Streszczenie: Ulepszenie systemu dostarczania substancji cytotoksycznych oraz poprawa ich indeksu terapeutycznego, to priorytetowe zadania stawiane przed środowiskiem naukowym. Bierne dostarczenie koniugatów lek – nośnik, z wykorzystaniem zjawiska przesiąkania naczyniowego jest skuteczne tylko w przypadku bezpośredniego podania ich do środowiska guza litego. Wysoce wskazane jest natomiast selektywne działanie, zdefiniowane jako swoista aktywność tylko i wyłącznie wobec komórek nowotworowych. Idealnym rozwiązaniem dla przedstawionych powyżej warunków wydają się być aptamery. Głównym celem niniejszej pracy było przedstawienie krótkich oligonukleotydowych fragmentów kwasów nukleinowych jako nośników leków, które mogłyby w efektywny sposób poprawić celowane działanie dotychczas stosowanych preparatów. Warto podkreślić, że przy projektowaniu nowych aptamerowych nośników, komórki nowotworowe, do których taki koniugat ma trafiać, muszą charakteryzować się obecnością receptorów „specyficznych" dla nowotworów, np. alfavβ3, VEGF, tie-2, czy c-Met. Ze względu na dobrze sprecyzowany cel molekularny, aptamery umożliwiają precyzyjne dostarczanie do środowiska nowotworu substancji o wysokiej toksyczności. W pracy zwrócono również uwagę na połączenie terapeutycznych i diagnostycznych możliwości jakie dają aptamery. Dlatego prawdziwym przełomem jest jednoczesne dołączenie do aptamerów znaczników fluorescencyjnych i leków przeciwnowotworowych, co umożliwia monitorowanie dystrybucji takich preparatów na poziomie komórkowym.

Słowa kluczowe: aptamery, kropki kwantowe, siRNA, doksorubicyna

Summary: The improvement of the cytotoxic drug delivery system and its therapeutic index are the key challenges of the researches are faced with. Passive delivery of the drug conjugates using the vascular permeability process is only effective when a local injection is carried out directly into the solid tumor environment. The selective action, defined as specific activity only against tumor cells, is instead highly recommended. Therefore the aptamers seem to be the ideal solution for all the above conditions. This article mainly aims to present the short oligonucleotide fragments of nucleic acids used as the drug carriers due to their ability to improve the effectiveness of the thus far administered drugs during specifically directed actions. It is worth noting that whilst designing the new aptamers, cancer cells which the conjugate is targeting, must be characterized by the presence of "specific tumor receptors", such as αvβ3, VEGF, tie-2 or c-Met. Due to a well-defined molecular goal, aptamers allow for a substance with high toxicity index to be delivered precisely to a tumor's environment. In this article the special attention was given to the combination of diagnostic and therapeutic capabilities the aptamers offer. As a result, the real breakthrough of drug delivery research is the ability to attach fluorescent labels at the same time to the aptamers and anti-cancer drugs as this allows for their biodistribution monitoring at a cellular level.

Key words: aptamers, quantum dots, siRNA, doxorubicin

WSTĘP

Pomimo wprowadzania do zastosowania klinicznego leków przeciwnowotworowych o lepszej efektywności i coraz mniejszych skutkach ubocznych, stosowanie chemoterapii nadal wiąże się z wieloma niepożądanymi dla pacjenta konsekwencjami. Dlatego wiodące stały się badania nad poprawą parametrów związanych z „selektywnym" dostarczaniem toksycznych substancji terapeutycznych bezpośrednio do komórki nowotworowej.

Przez ostatnie cztery dekady, w wielu krajach europejskich znacząco zwiększono nakład środków pieniężnych przeznaczonych na finansowanie projektu „Walka z Rakiem". Jest to program międzynarodowy, wyznaczający priorytetowe zadania badawcze zarówno dla przemysłu farmaceutycznego, jak i Narodowego Centrum Zdrowia. O nakładzie pracy naukowej włożonej w działania nad polepszeniem indeksu terapeutycznego stosowanych leków przeciwnowotworowych świadczy fakt, że w internetowej bazie danych PubMed, obejmującej artykuły z dziedziny medycyny i nauk biologicznych, pod hasłem „drug delivery and cancer", można znaleźć około 25 000 publikacji. Istotną kwestią wydaje się zatem być zastosowanie w chemoterapii nowych technik molekularnych, takich jak „enkapsulacja", czy koniugacja stosowanych powszechnie leków, tak aby zwiększyć ilość chemoterapeutyku dostarczanego do komórek nowotworowych [33]. Najlepszym rozwiązaniem byłoby połączenie terapii celowanej i kontrolowanego uwalniania takiego preparatu, który działa nie tylko na w pełni wykształcone komórki nowotworowe, ale także na ich prekursorowe komórki macierzyste. Bez wątpienia, dodatkowym atutem byłaby oporność tkanek zdrowych

na działanie tych preparatów. Dlatego, w dobie współczesnej nanotechnologii, poszukuje się wyspecjalizowanych nośników substancji terapeutycznych, które idealnie spełniałyby wyżej przedstawione kryteria farmakokinetyczne [37].

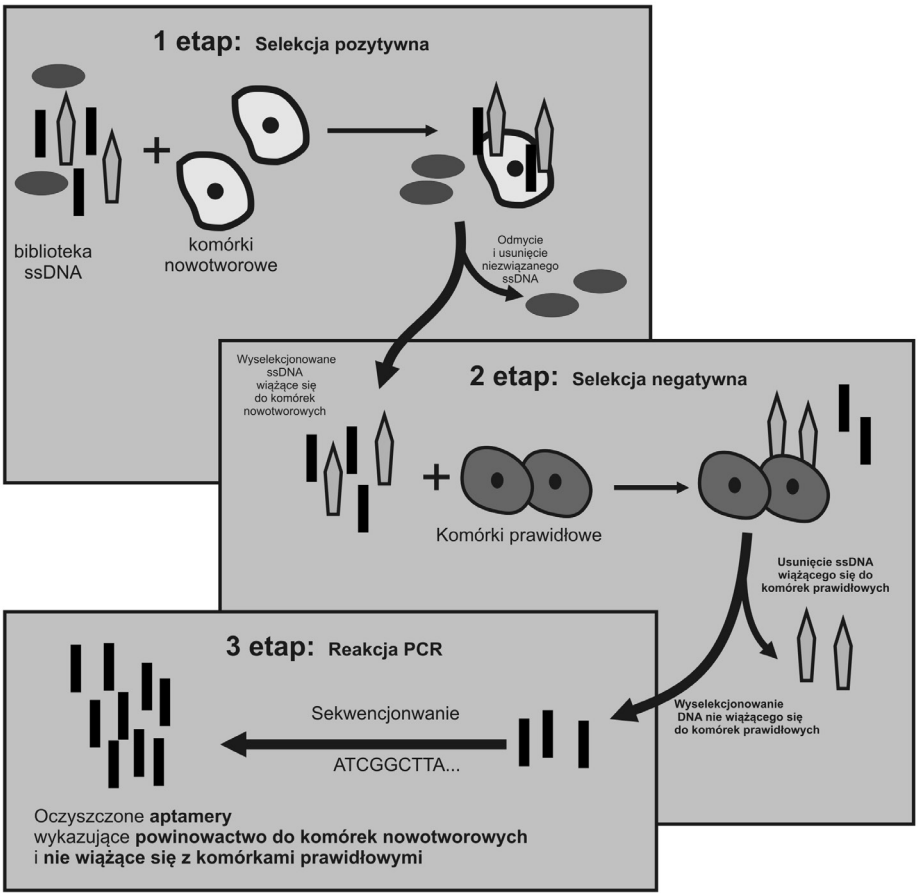
Z grupy potencjalnych nośników leków, wśród których znajdują się przeciwciała monoklonalne, wielkocząsteczkowe białka, dendrymery, czy micelle duże zainteresowanie wzbudzają ostatnio aptamery. Są to krótkie jednoniciowe fragmenty RNA lub DNA (ang. *single stranded DNA,* ssDNA) o masie cząsteczkowej od 4 do 50 kDa. Cechuje je wysokie powinowactwo do szerokiej gamy różnych ligandów, w tym białek, fosfolipidów, cukrów oraz kwasów nukleinowych. Pozyskiwane w procesie taniej i prostej syntezy SELEX (ang. *Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*) aptamery mogą mieć szerokie zastosowanie nie tylko jako narzędzia terapeutyczne, ale i diagnostyczne [24]. Odkąd odkryto, że naturalnie występujące kwasy nukleinowe mogą ulegać degradacji przy udziale nukleaz w środowisku pozakomórkowym, zaczęto rozwijać strategie pozyskiwania aptamerów *in vitro*. W celu poprawy stabilności, otrzymywane aptamery mogą być wzbogacane o chemicznie modyfikowane nukleotydy, koniugaty z polietylenoglikolem (ang. *Polyethylene Glycol,* PEG), czy też połączenia z różnymi enancjomerami cukrów [21].

Ze względu na duży potencjał aplikacyjny aptamerów, niniejsza praca jest próbą usystematyzowania dotychczas przedstawionych wiadomości, które pojawiły się w fachowej literaturze naukowej. Jednakże szerokie możliwości, jakie posiadają aptamery sprawiły, że autorzy artykułu dokonali przeglądu informacji tylko na temat ich zastosowania w terapii przeciwnowotworowej. Szczególną uwagę poświęcono różnym czynnikom terapeutycznym, które mogą być transportowane do komórek nowotworowych za pomocą aptamerów. Mowa tutaj o lekach przeciwnowotworowych oraz interferencyjnym RNA (ang. *small interfering RNA,* siRNA).

MOLEKULARNY POTENCJAŁ APTAMERÓW

Zmienność osobnicza oraz mutacje w obrębie genomu są podstawą procesu nowotworzenia. Morfologiczne różnice między komórkami nowotworowymi a prawidłowymi pozwoliły wykorzystać tomografię komputerową i obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (ang. *Magnetic Resonance Imaging,* MRI) do identyfikowania ognisk nowotworzenia [4]. Diagnostyka obrazowa wymaga jednak zastosowania bezpiecznych dla organizmu środków kontrastujących, o odpowiednim do detekcji sygnale i wysokiej swoistości tkankowej. Taką rolę mogą pełnić aptamery, zdolne do wiązania się z białkami występującymi na powierzchni określonych tkanek lub komórek np. zmienionych nowotworowo. W tym przypadku wysoce pożądanym jest otrzymanie aptameru zdolnego do rozpoznania cząsteczki docelowej w jej naturalnym środowisku – np. wbudowanego w błonę komórkową, a nie w sta-

nie wyizolowanym. Pozyskanie specyficznych aptamerów w procesie SELEX, daje zatem możliwość ich wykorzystania do identyfikacji nieznanych markerów komórek nowotworowych określonego typu, a przez to może umożliwić szybsze wykrycie ognisk rakowych w organizmie i monitorowanie przebiegu leczenia *in vivo*. Szersze zastosowanie aptamerów w diagnostyce wymaga jednak dokładnego zbadania ich właściwości farmakokinetycznych, m.in. sposobów biodystrybucji w ustroju. Warto jednak nadmienić, że przeprowadzone do tej pory testy są obiecujące, a otrzymane wyniki (stosunek otrzymanego sygnału do szumu, szybkość lokowania się specyficznych aptamerów w badanej tkance lub miejscu zapalenia) są lepsze niż w przypadku standardowych przeciwciał klasy IgG [49].



RYCINA 1. Schemat przedstawiający kolejne etapy selekcji *in vitro* aptamerów (na podstawie [49]; zmodyfikowany)
FIGURE 1. The picture shows the following stages of *in vitro* selection of aptamers (based on [49]; modified)

Pierwsza udana synteza aptamerów, których nazwa pochodzi od łacińskiego słowa „aptus" znaczącego dopasowanie, miała miejsce w 1990 roku i dokonali jej niezależnie Tuerk i Gold oraz Szostak i Ellington. Jak do tej pory, aptamery były kierowane przeciwko szerokiej gamie różnych molekuł, od małych organicznych bądź nieorganicznych cząstek, do peptydów, białek, a nawet żywych komórek [9].

Dotychczas najbardziej popularnymi dla aptamerów celami molekularnymi komórek nowotworowych były: czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor,* VEGF), receptor białkowej kinazy tyrozynowej erbB-3 (ang. *receptor tyrosine-protein kinase,* HER3), czynnik transkrypcyjny NF-kB (ang. *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), swoisty antygen sterczowy (ang. *Prostate Specific Antigen,* PSA) [3]. Ponieważ podczas procedury SELEX nie jest wymagane posiadanie wiedzy dotyczącej budowy komórek nowotworowych, a jedynie ich fizyczna obecność, synteza aptamerów skierowanych przeciw całym komórkom stała się znacznie prostsza niż inne metody syntezy nośników dla leków przeciwnowotworowych.

Niezbędnym warunkiem do powstania aptameru jest posiadanie odpowiedniej biblioteki krótkich jednoniciowych fragmentów DNA, które inkubuje się z komórkami nowotworowymi lub cząsteczkami, z którymi aptamer ma oddziaływać (ryc. 1, etap 1). Niezwiązane sekwencje DNA odpłukuje się i usuwa. Natomiast związane DNA, które z uwagi na duże powinowactwo do komórek nowotworowych mogłoby zostać wykorzystane w terapii, jest następnie inkubowane z komórkami prawidłowymi (kontrolnymi) tak, aby wykluczyć późniejsze niespecyficzne interakcje aptamerów (etap 2) [34]. Ten etap jest konieczny, gdyż niektóre ligandy bądź receptory są wspólne dla komórek prawidłowych i nowotworowych. Jeżeli jakieś fragmenty DNA łączą się z komórkami prawidłowymi, należy je usunąć. Kolejny, trzeci etap, polega na amplifikacji wyselekcjonowanych w dwóch pierwszych etapach sekwencji oligonukleotydowych. Uznaje się je za oczyszczone, gdy zostaną poddane obróbce w około 20 cyklach amplifikacyjnych. Jak dotąd, w badaniach na poziomie *in vitro* wykorzystano aptamery przeciwko ligandom nowotworowym komórek: białaczki limfocytarnej, białaczki mieloidalnej, raka wątrobokomórkowego oraz raka płuc drobno- i niedrobnokomórkowego [38]. Badania te dotyczyły cytotoksycznych właściwości aptamerów oraz ich potencjalnego wykorzystania jako narzędzi molekularnych służących do detekcji komórek nowotworowych.

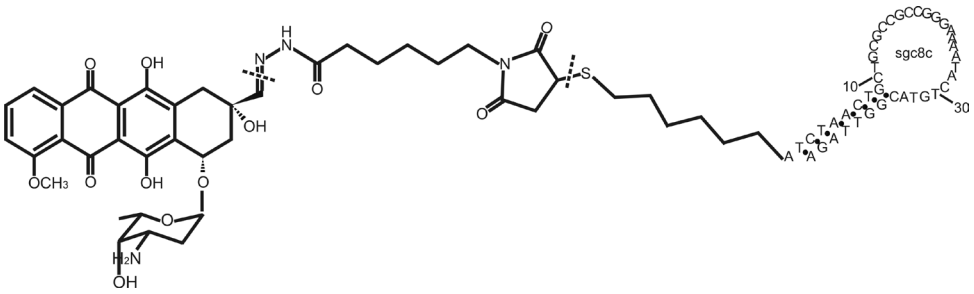
W wielu doniesieniach literaturowych autorzy dokonują zestawienia cech aptamerów i przeciwciał monoklonalnych, gdyż te dwa rodzaje nośników mogą być wykorzystywane jako ligandy dla tych samych celów molekularnych. W porównaniach tych, na korzyść aptamerów przemawia sposób ich otrzymywania, który metodologicznie jest dużo prostszym procesem, a powstałe produkty reakcji SELEX są bardziej stabilne [11]. Aptamery mogą być denaturowane i renaturowane wiele razy oraz przechowywane w postaci liofilizatów bez znaczącego spadku swojej aktywności. Ponadto, cząsteczki aptamerów są dużo mniejsze niż cząsteczki przeciwciał

(~150 kDa), dzięki czemu możliwa jest lepsza penetracja środowiska, do którego dociera aptamer. Wyjątkowym atutem, który zapewnia aptamerom przewagę nad przeciwciałami monoklonalnymi jest brak immunogenności [11]. Z drugiej jednak strony, w porównaniu z przeciwciałami, niska masa cząsteczkowa aptamerów, ale także ich potencjalnie słabsze możliwości wiązania z biomarkerem sprawiają, że aptamery szybciej podlegają procesom wewnątrzkomórkowej biodegradacji. Ponadto, bliżej nieokreślony czas połowicznego rozpadu oraz większa podatność na rozkład w osoczu sprawiają, że nie można w pełni przewidzieć właściwości toksycznych aptamerów [13].

Pierwszym aptamerem, dopuszczonym w 2004 roku przez Amerykański Urząd ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administrartion,* FDA) do zastosowania klinicznego, był Pegaptanib (Pfizer/Eyetech). O sukcesie terapii z wykorzystaniem Pegaptanibu może świadczyć fakt, że ponad 80% leczonych pacjentów zauważyło poprawę ostrości widzenia w trzy miesiące po zastosowaniu aptameru anty-VEGF165. Aptamer ten łączy się z czynnikiem wzrostu śródbłonka naczyniowego i zgodnie z najnowszymi danymi, jest skuteczny w leczeniu zwyrodnienia plamki żółtej (ang. *Age-related Macular Degeneration,* AMD) [24]. Występujące w AMD zjawisko przerostu naczyń krwionośnych jest jednym z pierwszych zjawisk patologicznych, które próbowano ograniczyć stosując aptamery. Proces neowaskularyzacji to skutek lokalnej czynnościowej przewagi czynników proangiogennych, głównie czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*,VEGF) nad czynnikami antyangiogennymi, np. czynnikiem pochodzącym z nabłonka barwnikowego (ang. *Pigment Epithelium Derived Factor,* PEDF). Nowo utworzone naczynia pochodzą z włośniczek naczyniówki i tworzone są tuż pod siatkówką w obszarze plamki, gdzie naturalnie nie występują. Zazwyczaj takie naczynia są kruche i nieszczelne, co prowadzi do miejscowych wysięków i krwotoków. Konsekwencją wszystkich powyżej przedstawionych zmian patologicznych jest pojawienie się blizn i zniszczenie widzenia centralnego, tak istotnego w czytaniu, czy prowadzeniu samochodu. Aptamer anty-VEGF165, po wstrzyknięciu do ciała szklistego, wiąże czynnik wzrostu uniemożliwiając jego interakcję z receptorem i uruchomienie kaskady sygnałów, która pobudza ostatecznie wzrost nowych naczyń. [36].

APTAMERY JAKO NOŚNIKI DLA LEKÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH

Proces karcenogenezy jest procesem wieloetapowym, który często następuje na skutek skumulowanego działania zarówno czynników środowiskowych, jak i genetycznych. Prawdopodobieństwo nowotworzenia zwiększa się jeżeli nakładają się na siebie: predyspozycje genetyczne, transformacja wirusami, czy działanie czynników chemicznych lub radiacyjnych. Jak do tej pory chemoterapia jest jedną



RYCINA 2. Struktura koniugatu aptameru sgc8c i doksorubicyny (na podstawie [49])
FIGURE 2. The conjugate of doxorubicin and sgc8c aptamer (based on [49])

z podstawowych metod terapeutycznych, które wykorzystywane są do ograniczenia rozwoju nowotworu. Niestety podczas jej stosowania, wysoka toksyczność, zwiększająca się zwykle wraz z dawką podawanych preparatów, wydaje się niejednokrotnie ograniczać możliwość zastosowania danego leku. Równie częstą przyczyną zgonów wśród pacjentów obciążanych skutkami rozwoju choroby nowotworowej są powikłania wynikające z zastosowania wysoce toksycznej terapii [28]. Przykładem powszechnie stosowanego chemoterapeutyku, którego podanie pociąga za sobą wiele ubocznych skutków dla pacjenta jest doksorubicyna (DOX), należąca do antracyklin pierwszej generacji. Cytotoksyczne działanie tego antybiotyku związane jest m.in. z jej swobodnym wnikaniem pomiędzy pary zasad cytozyna – tymina (uracyl) zarówno w DNA, jak i RNA. Następstwem interkalacji reszty aglikonowej cząsteczki leku pomiędzy pary zasad natywnego heliksu DNA są pęknięcia nici DNA czy stabilizacja kompleksu DNA – topoizomeraza II, w którym DNA znajduje się w otwartej, bardziej podatnej na uszkodzenia konformacji. Duży udział w cytotoksycznym działaniu DOX mają również wolne rodniki, powstające w cyklu redoks tego leku. W konsekwencji dochodzi do zmian w funkcjonowaniu błony komórkowej oraz indukcji procesu apoptozy [43]. Szerokie spektrum stosowania doksorubicyny w leczeniu mięsaków, guzów litych i chorób rozrostowych układu krwiotwórczego jest ponadto ograniczone przez występowanie zjawiska kardiotoksyczności poantracyklinowej, prowadzącej do ostrej zastojowej kardiomiopatii. Dlatego wysoce uzasadnionym wydaje się zastosowanie aptamerowych nośników dla doksorubicyny w terapii zarówno białaczek, jak i nowotworów litych [30].

Pierwsze obiecujące wyniki badań prowadzone w warunkach *in vitro* uzyskano wykorzystując aptamerowy koniugat doksorubicyny A10-DOX. Badania były prowadzone na komórkach nowotworowych raka prostaty LNCAP (ang. *androgen-sensitive human Prostate Adenocarcinoma Cells*). Zastosowano ten typ nośnika dla doksorubicyny, głównie za sprawą wysokiej stałej wiązania (K_d = 2,1 nM) aptameru do występujących w nadekspresji na powierzchni komórek nowotworowych receptorów PSA [41]. Zbudowany z 57 par zasad azotowych aptamer

A10 o masie cząsteczkowej 18,5 kDa, z dużą wydajnością wiązał się z receptorami PSA i był stabilny w medium hodowlanym.

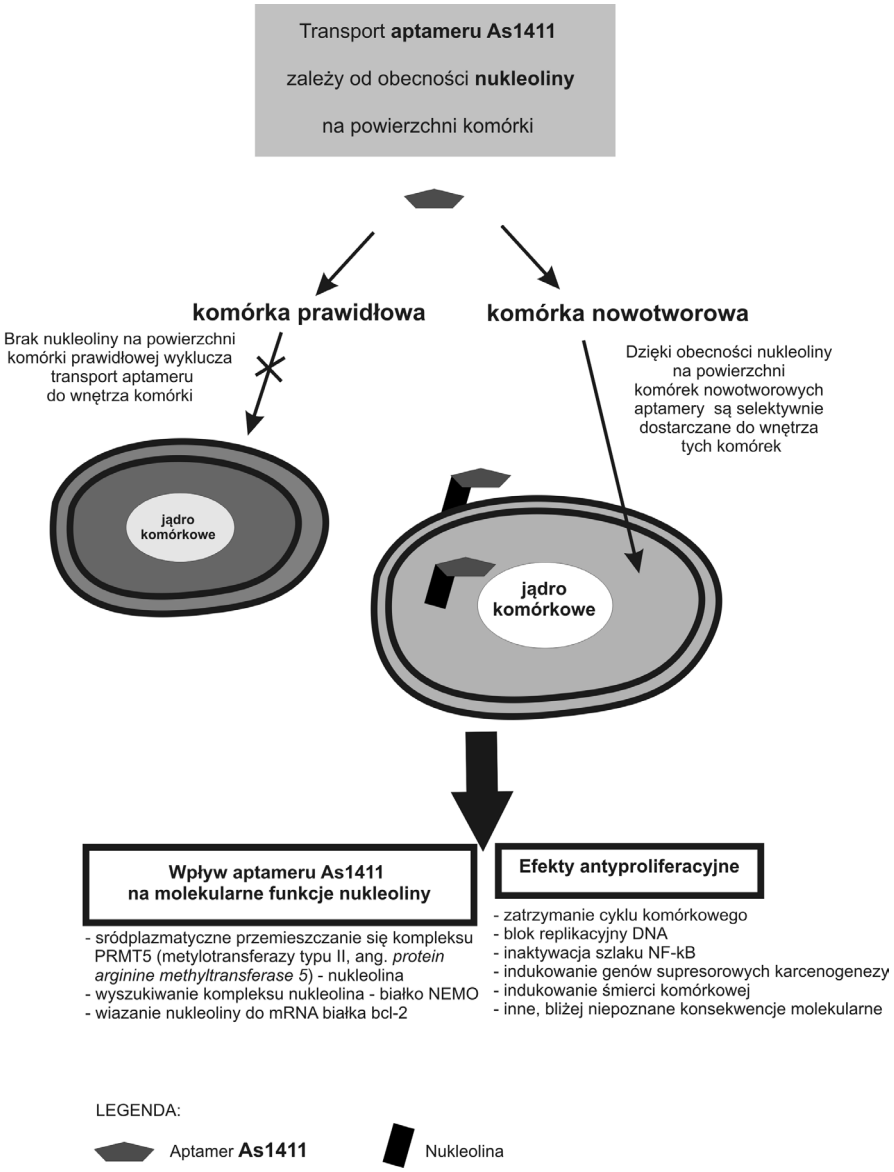
Innym obiecującym aptamerem, który został wykorzystany do tworzenia koniugatowych połączeń z DOX, był aptamer sgc8c (ryc. 2) wyselekcjonowany z użyciem komórek T ludzkiej białaczki limfoblastycznej. Jego wysoka specyficzność substratowa względem aktywnej metabolicznie kinazy tyrozynowej 7 (ang. *Protein Tyrosine Kinase 7,* PK7) sprawiła, że doksorubicyna połączona z takim aptamerem, była dostarczana do komórek nowotworowych w sposób wysoce selektywny, a tym samym bezpieczny dla prawidłowych komórek szpiku kostnego [50]. W warunkach fizjologicznych kinaza tyrozynowa 7 stanowi integralną część receptorów katalitycznych. Należą tu receptory czynników wzrostowych (PDGF, IGF1 oraz EGF), odgrywające kluczową rolę w przekazywaniu sygnałów w komórce [18].

Spośród modelowych komórek białaczki, linią charakteryzującą się nadekspresją PK7 jest linia CCRF-CEM. Udowodniono, że w tych komórkach, będących modelem *in vitro* ostrej białaczki T limfoblastycznej, aptamer sgc8c, oddziałujący z kinazą tyrozynową 7, posiadał wysoką stałą dysocjacji (K_d = 1 nM). Syntezę koniugatu aptameru sgc8c z antybiotykiem antracyklinowym rozpoczęto od utworzenia proleku, tzn. hydrazydowej pochodnej doksorubicyny. Obecność hydrazydu w strukturze koniugatu pozwala na uwolnienie wolnej DOX w niskim pH endosomu (t.j. 4.5-5.5). Dalszym etapam syntezy był proces dializy, podczas którego nadmiar wolnego leku był usuwany z mieszaniny koniugacyjnej DOX/aptamer. W przeprowadzonych badaniach *in vitro* wykazano, że dołączenie DOX nie wpływa na swoistą siłę wiązania aptameru z ligandem, a cytotoksyczność koniugatu i wolnej DOX była taka sama. Parametr IC_{50}, określający dawkę substancji obniżającą przeżywalność komórek do 50%, był identyczny dla koniugatu aptameru sgc8c z hydrazydową pochodną doksorubicyny oraz wolnego leku i wynosił 0.32 μM [18].

Łatwość, z jaką aptamery poddaje się modyfikacjom chemicznym, pozwoliła na zastosowanie ich koniugatowych połączeń z wysokocząsteczkowymi strukturami takimi jak liposomy, dendrymery, polimery, w tym glikol polietylenowy (ang. *Polyethylene Glycol,* PEG), czy biodegradowalne micelle [15]. Dzięki temu możliwe było dostarczenie do wnętrza komórek nowotworowych takich aptamerów, które mają ograniczone właściwości wewnątrzkomórkowej penetracji. Sprzęganie z liposomami pozwoliło poprawić przepuszczalność błony komórkowej dla aptamerów i jednocześnie zwiększyć ilość leku dostarczanego do komórki [21]. Ponadto, liposomowe koniutgaty aptamerów wydłużają ich czas półtrwania w ustroju. W takim połączeniu aptamer jest zazwyczaj na zewnątrz, a wewnątrz liposomu znajduje się lek [5].

Wysoką aktywnością cytotoksyczną, zarówno na poziomie *in vitro* jak i *in vivo,* charakteryzowały się połączenia aptamerowych koniugatów z liposomami i docetakselem (ang. *Docetaxel* DTX) [27]. Bez wątpienia przełożyło się to na skuteczniejsze oddziaływanie tego złożonego nośnika z receptorami PSA komórek nowotworowych. W porównaniu z zastosowaniem samego aptameru, czy docetak-

selu, transport koniugatu do wnętrza komórek był możliwy dzięki endocytozie, co w znacznym stopniu poprawiło indeks terapeutyczny leku [50].



RYCINA 3. Proponowany model działania aptameru AS1411 na komórki nowotworowe wykazujące ekspresję nukleoliny (na podstawie [2], zmodyfikowany)
FIGURE 3. Proposed model for AS1411 mechanism of action on cancer cells expressing nucleolin (based on [2], modified]

Pozytywne wyniki badań otrzymano również dla komórek gruczolakoraka piersi MCF-7, w których analizowano wpływ koniugatu aptameru RNA, skierowanego przeciw nukleolinie oraz cis platyny zamkniętej w liposomie. Nukleolina jest wielofunkcyjnym białkiem, pełniącym ważne funkcje w jąderku i w karioplazmie. Główną funkcją nukleoliny jest udział w obróbce rRNA od etapu transkrypcji rDNA po organizację cząstek prerybosomowych. Na ryc. 3 przedstawiono schematycznie mechanizm, za pomocą którego dochodzi do niszczenia komórek nowotworowych z udziałem aptameru As1411. Pozytywny wynik uzyskano dla komórek nowotworowych MCF-7 traktowanych koniugatem aptameru z liposomalną postacią cis platyny. Komórki te charakteryzują się nadekspresją nukleoliny na swojej powierzchni. Natomiast komórki kontrolne były oporne na działanie koniugatu [5].

Podobną do liposomów funkcję spełniają nanostruktury zbudowane z fragmentów DNA oraz polimeru tlenku polipropylenu (ang. *polypropylene oxide,* PPO). W roztworze wodnym taki kopolimer tworzy struktury podobne do micelli, w których zewnętrzny, hydrofilowy płaszcz utworzony jest przez DNA, a wewnętrzny hydrofobowy rdzeń przez blok polimerów [1]. Udowodniono, że koniugat micella – aptamer TDO5 ma 750 razy wyższą stałą wiązania niż sama micella, co wpływa na poprawę jego selektywnego działania [46].

Ostatnio, ze względu na zróżnicowany charakter komórek nowotworowych, coraz bardziej popularne stają się połączenia dwóch różnych aptamerów, z których każdy ma inny, ukierunkowany cel działania. Jest to szczególnie przydatne w leczeniu nowotworów, które charakteryzują się dużym zróżnicowaniem fenotypowym receptorów powierzchniowych. Często łącznikiem między takimi kompleksowymi połączeniami aptamerów o powinowactwie do różnych ligandów, jest streptawidyna. Obiecujące wyniki na poziomie *in vitro* dało połączenie aptameru A10, rozpoznającego receptory PSA i aptameru DUP-1, działającego na komórki nowotworowe raka prostaty, na których nie zaobserwowano receptorów PSA. Dołączenie doksorubicyny do konstytutywnego regionu aptameru A10, znacznie zwiększyło cytotoksyczne działanie tej antracykliny. Modyfikacją tego aptamerowego kompleksu było jego unieruchomienie na termowrażliwych cząstkach jonów żelaza o właściwościach paramagnetycznych (ang. *Thermally Cross-Linked Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles,* TCL-SPION), co jednocześnie sprzyjało monitorowaniu obecności polimeru w komórce [31].

siRNA DOSTARCZANE DO KOMÓRKI ZA POMOCĄ APTAMERÓW – NOWY KIERUNEK W TERAPII GENOWEJ

Za sprawą zjawiska interferencji RNA, wyciszanie genów stało się potężnym narzędziem w rękach biologów molekularnych. Cząsteczki siRNA zbudowane są z 20 do 30 nukleotydów i powstają w komórce przez pocięcie dwuniciowego RNA

(np. wirusowego) przez enzym DICER na fragmenty odpowiedniej długości. Tak powstałe, krótkie odcinki siRNA, nabywają pożądanych właściwości molekularnych, kiedy wiążą się z wielobiałkowym kompleksem wyciszającym indukowany RNA (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*, RISC) [7]. Kompleks ten ulega połączeniu z komplementarną do siRNA cząsteczką mRNA i powoduje jej fragmentację, uniemożliwiając w ten sposób powstanie kodowanego przez nią białka.

Krótkie fragmenty siRNA stanowią teoretycznie idealny środek terapeutyczny, ze względu na możliwość „celowego działania" i specyficznego wyeliminowania niepożądanych, białkowych produktów ekspresji wadliwych genów. Stosowaniu siRNA jako jednej z metod terapii genowej towarzyszą liczne zalety. Technika ta jest wydajna i daje silny efekt fenotypowy. Ponadto zahamowanie ekspresji genu jest swoiste, co skutkuje ograniczeniem efektów ubocznych, w tym odpowiedzi ze strony układu immunologicznego [14]. Mimo obiecujących badań na poziomie *in vitro*, zastosowanie techniki interferencji RNA (ang. *RNA interference,* RNAi) w klinicznym użyciu wciąż stoi pod dużym znakiem zapytania, głównie za sprawą potencjalnej, nukleolitycznej degradacji, jakiej siRNA ulega w cytoplazmie. Dlatego olbrzymi wysiłek naukowy został skierowany na stworzenie jak najbardziej precyzyjnych sposobów dostarczenia siRNA do komórki. Aptamery wydają się być idealnym narzędziem, które zapewniłoby przede wszystkim bezpieczeństwo i stabilność transportowanego do komórki interferencyjnego RNA [12].

Dotychczas zaproponowano dwie strategie umożliwiające połączenie aptamerów z siRNA. Po pierwsze, mowa tutaj o procesie koniugacji poprzez wytworzenie odpowiedniego wiązania chemicznego, po drugie chodzi o kowalencyjne połączenie się aptameru i siRNA, którego skutkiem jest powstanie nukleotydowej chimery [24]. Pierwszym aptamerowym koniugatem, którego zasadniczą funkcją było dostarczenie siRNA do komórki, był biotynylowany aptamer A9 połączony za pomocą mostka streptawidynowego z siRNA zawierającym antysensowny 27-nukleotydowy fragment skierowany przeciwko laminie. Łącznik disulfidowy między sensowną nicią siRNA a biotyną dał możliwość odłączenia siRNA zaraz po jego wniknięciu do wnętrza komórki. Jest to przykład tak zwanego multiwalentnego konstruktu. Ponieważ strepawidyna posiada potencjalnie cztery miejsca wiązania dla biotyny, możliwe jest zatem przyłączenie więcej niż jednego polimeru aptamer/siRNA. Jedyną przeszkodą w takim systemie dostarczania siRNA do komórki jest wysoka immunogenność streptawidyny. Konieczne wydaje się zatem jej zastąpienie przez inne białka cechujące się wysokim powinowactwem do biotynylowanych cząstek aptameru [8].

Zastosowaniu aptamerów jako nośników dla siRNA, sprzyja ich konformacja przestrzenna. Potwierdzeniem tej hipotezy jest trójkątna forma aptameru RNA A10. Został on kowalencyjnie połączony ze specyficznym siRNA względem mRNA dla eukariotycznego czynnika elongacji (ang. *Eukaryotic Elongation Factor 2,* EEF2), tworząc mono- bądź biwalentny konstrukt A10-anty-EEF2-siRNA [35]. Po wniknięciu do komórki docelowej, do odłączenie siRNA od koniugatu dochodziło pod

wpływem działania endonukleazy DICER na taki kompleks. Zarówno monowalentna, jak i biwalentna postać koniugatu powodowała obniżenie transkrypcji mRNA dla EEF2, a w następstwie zablokowanie ekspresji białka [45].

Obiecującymi są również badania prowadzone nad zmodyfikowaną fluorescencyjnie formą aptameru A10 w pozycji 2'. Za pomocą wiązania kowalencyjnego, do tego aptameru dołączony został 21 nukleotydowy fragment siRNA, który powodował obniżenie ekspresji dwóch genów istotnych w procesie nowotworzenia: PLK-1 i Bcl-2. Badania prowadzone na poziomie *in vitro,* jak i *in vivo* potwierdziły, że chimeryczna postać aptameru wnikała do komórek wykazujących ekspresję receptorów PSA [16]. Efektem było wyciszenie transkrypcji genów PLK-1 i Bcl-2, prowadzące bezpośrednio do obniżenia poziomu białek, będących produktami ich ekspresji. Aby wyciągnąć tego rodzaju wnioski przeprowadzono eksperymenty, w których zastosowano szereg prób kontrolnych tzn. komórki negatywne pod względem receptora PSA (niewyciszającego siRNA) oraz mało specyficznych aptamerów A10 [47]. Chociaż przedstawione powyżej biwalentne aptamery zawierają struktury w postaci heteroduplekśów, to nie indukowały one odpowiedzi interferonowej, co zwiększa prawdopodobieństwo ich klinicznego zastosowania, głównie ze względu na małe obciążenie układu immunologicznego.

Wciąż prowadzone są badania nad poprawą stałej wiązania ligand – aptamer, przy jednoczesnej, efektywnej inhibicji procesu transkrypcji wybranych genów. W doświadczeniu symulującym leczenie raka prostaty, prowadzonym za pomocą monowalentnej formy aptameru A10, to jest A10-anti-PLK1-siRNA, stwierdzono, że ograniczenie w takim aptamerze liczby nukleotydów z 71 do 39 spowodowało niezmienioną zdolność jego wiązania do ligandu, tzn. do PSA. Dodatkowo, poprzez wprowadzenie strukturalnej modyfikacji, zwiększono jego specyficzność względem enzymu DICER oraz komplementarność siRNA dla regionu RISC. Otrzymano obiecujące wyniki w postaci remisji guzów u 70% badanych osobników, bez zmian morfologicznych organów prawidłowych. Stwierdzono ponadto, że przyłączenie do aptameru polietylenoglikolu zmniejszało w warunkach *in vivo* wielkość wymaganej dawki aptamerów z 10 do 1,25 nmol, co obniżyło koszty leczenia i zminimalizowało skutki uboczne terapii [6].

Ze względu na stosunkowo niskie wartości stałej dysocjacji, koniugaty aptamerów i siRNA stają się coraz bardziej popularne w ograniczeniu zjawiska przerzutowania nowotworów, które to zjawisko jest przyczyną śmierci około 90% pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową. Wysoka inwazyjność komórek nowotworowych jest związana m.in. z ich zdolnością do tworzenia zmodyfikowanych komórek prekursorowych śródbłonka, degradujących macierz zewnątrzkomórkową, czy produkujących wiele czynników wzrostu np. cytokin [21]. Wszystkie

te procesy biologiczne bezpośrednio przekładają się na angiogenezę, to jest powstawanie nowych naczyń krwionośnych biorących początek w pierwotnym środowisku guza. Procesowi angiogenezy, występującemu również w retinopatii cukrzycowej, sprzyjają hipoksja, niskie natlenowanie oraz nadekspresja receptorów należących do grupy tzw. czynników wzrostu np. VEGF, PDF (ang. *Plate Differentiation Factor*) i FGF (ang. *Fibroblast Growth Factor*). Obecnie istnieje wiele leków o zastosowaniu klinicznym, których pierwotne działanie ukierunkowane było na zahamowanie procesu angiogenezy. Większość z nich to uboczne produkty metabolizmu grzybów, które posiadają szersze, wcześniej niescharakteryzowane działanie antyangiogenne [20]. Duże możliwości w zahamowaniu powstawania nowych naczyń krwionośnych dają aptamery. Zgodnie z danymi literaturowymi, pierwszym aptamerem skierowanym przeciw VEGF, był wyżej wspomniany Pegaptanib. Z badań prowadzonych nad antysensownym RNA, tworzącym kompleksy z aptamerami wynika, że koncepcja zastosowania takich koniugatów w ograniczeniu angiogenezy jest jak najbardziej obiecująca. Do komórek niedrobnokomórkowego raka płuc A539 wprowadzono kompleks aptamer/antysensowny RNA przeciwko czynnikowi NF-kB, w celu przełamania oporności tychże komórek na terapię doksorubicyną i wywołania aktywności angiostatycznej, ograniczając produkcję czynników wzrostu komórek nowotworowych [23].

Innym przykładem, może być aptamer anty-PSA połączony z siRNA dla dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase,* GAPDH) przez wiązanie streptawidyna – biotyna i mostek disulfidowy. Po 30 minutach od wniknięcia do komórki, siRNA wyciszał gen docelowy i w konsekwencji prowadził do śmierci komórki nowotworowej, a w środowisku guza obniżał aktywność komórek prekursorowych śródbłonka [23].

Wiedząc, że reszty guaniny są wysoce specyficzne dla pewnych białek komórkowych, w aptamerowych nośnikach zaczęto tworzyć specjalne struktury tzw. kwadrodupleksy o podwyższonej zawartości guaniny [18]. Hipotezę tę potwierdziły badania Bishop i wsp. wykazujące, że wyznakowany radioaktywnym fosforem P33 aptamer anty-HIV, o rdzeniu fosfodiestrowym bogatym w reszty guaniny, miał okres półtrwania od 4 do 5 dni w surowicy, podczas gdy czas półtrwania takiej struktury bez sekwencji bogatych w guaninę, wynosi od 3 do 7 minut. Sekwencje bogate w guaninę, umieszczone w kwadrodupleksach, dodatkowo podwyższały stabilność aptamerów. Dowiedziono, że taka modyfikacja oligonukleotydowego aptameru powodowała nawet 10-krotny wzrost jego stężenia w komórkach raka szyjki macicy HeLa, a dodanie sekwencji bogatej w guaniny na końcu 3'antysensownych nukleotydów powodowało 10-krotny wzrost ilości aptameru w komórkach docelowych – makrofagach [2].

USPRAWNIENIE TERAPII FOTODYNAMICZNEJ ZA POMOCĄ KRÓTKICH FRAGMENTÓW OLIGONUKLEOTYDOWYCH

Istnieją również interesujące doniesienia naukowe dotyczące zintegrowanego działania aptamerów i terapii fotodynamicznej (ang. *Photodynamic Therapy,* PT), będącej jedną z metod leczenia nowotworów, w której kluczową funkcję pełni cząsteczka fotouczulacza. Fotouczulacz dostarczany bezpośrednio do guza, pod wpływem działania promieniowania o odpowiedniej długości fali, powoduje produkcję toksycznych reaktywnych form tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species,* ROS). Fotouczulaczami są zazwyczaj cząstki o właściwościach hydrofobowych, trudno rozpuszczalne w wodzie oraz hydrofilowych płynach biologicznych. Ponieważ, w terapii fotodynamicznej najważniejsze jest precyzyjne dostarczenie fotouczulacza w miejsce guza [26], zaproponowano szereg zabiegów chemicznych, aby ten cel osiągnąć. Fotouczulacze zostały poddane m.in. procesom sprzęgania z białkami, przeciwciałami monoklonalnymi i aptamerami [40]. Dobrym rozwiązaniem w terapii fotodynamicznej wydaje się być zastosowanie aptameru TD05, specyficznego wobec komórek białaczkowych Ramos, będących modelem *in vitro* chłoniaka Burkitt'a. O jego wysokiej selektywności względem nich świadczyć może fakt, że w mieszaninie różnych typów komórek leukemicznych człowieka, aptamer ten łączył się tylko z komórkami Ramos, pozostając obojętnym wobec komórek linii: przewlekłej białaczki szpikowej (K562), ostrej białaczki promielocytarnej (NB-4, HL-60) i ostrej białaczki T limfoblastycznej (CCRF-CEM) [29].

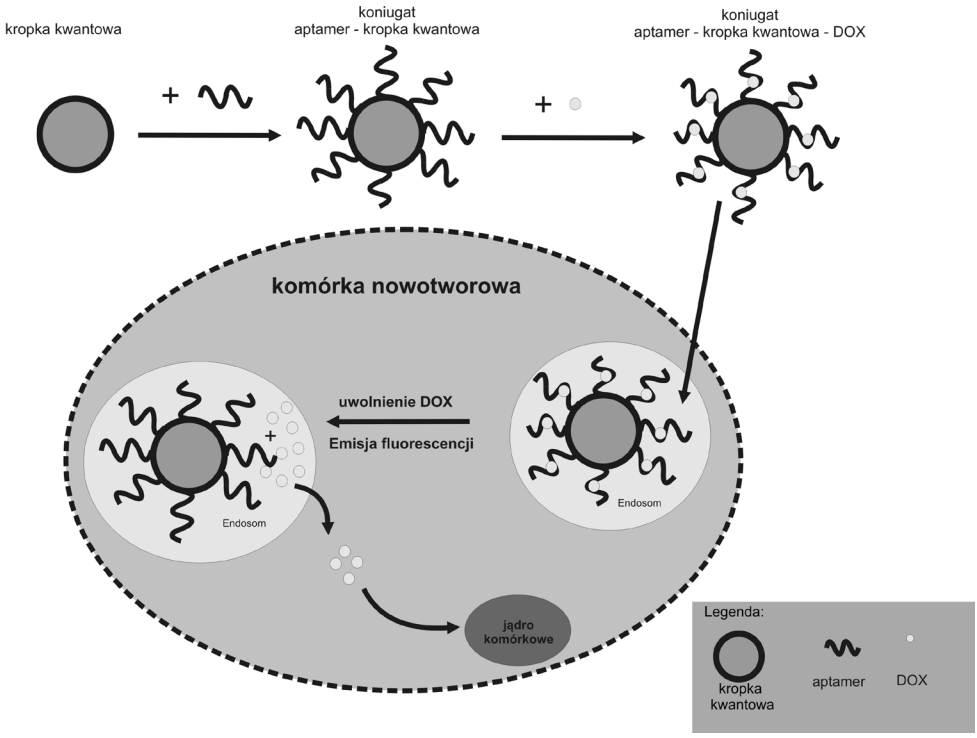
Niektóre komórki nowotworowe charakteryzują się obecnością o-glikanowych peptydów w zewnętrznej części błony komórkowej. W procesie SELEX specyficzne aptamery zostały wyselekcjonowane jako anty-cząstki dla tych peptydów. Dodatkowo, na końcu 5' aptamery te zmodyfikowano resztami chloryny e6 (Ce6), czynnika używanego w terapii fotodynamicznej. Chloryna e6 może być aktywowana promieniowaniem laserowym, w celu produkcji wysoce reaktywnych, krótko żyjących cząsteczek tlenu singletowego. Zmodyfikowany w taki sposób aptamer ma o wiele większą cytotoksyczność niż jego macierzysta cząsteczka, a komórki niemające o-glikanowych peptydów nie są wrażliwe na jego działanie [10]. Chloryna e6 była również składową koniugatu utworzonego z aptamerem TD05. Porównując efektywność generowania reaktywnych form tlenu przez Ce6 wolną i skoniugowaną, nie zaobserwowano różnic w poziomie ilości tlenu singletowego, uwalnianego po działaniu promieniowania laserowego [17]. Dokonano również analizy właściwości cytotoksycznych koniugatu TD05 – Ce6 traktując nim komórki przez 4 godziny, przy jednoczesnym poddaniu hodowli ekspozycji na światło białe. Następnie prowadzono 36-godzinną inkubację w warunkach standardowych. Po tym czasie wykonano test przerwania ciągłości błony komórkowej z zastosowaniem jodku

propidyny oraz oznaczono zmiany przeżywalności komórek. Stosując dodatkowe próby kontrolne, tzn. komórki traktowane samym aptamerem TD05 oraz samym fotouczulaczem Ce6, nie zaobserwowano toksycznego działania żadnego z powyżej przedstawionych preparatów [29].

APTAMERY JAKO RÓWNOCZESNE NARZĘDZIE DIAGNOSTYCZNE I TERAPEUTYCZNE

Na progresję nowotworu składają się m.in. aktywny wzrost guza, inwazja tkanek prawidłowych i w konsekwencji, po utworzeniu się sieci naczyń krwionośnych, powstanie wtórnego mikrośrodowiska nowotworu. Mutacje sprzyjające procesowi nowotworzenia prowadzą do zaburzeń cyklu komórkowego, procesu apoptozy oraz różnicowania komórkowego [39]. Dlatego w dobie współczesnej chemoterapii zastosowanie nośników leków jest niezwykle ważne, ponieważ pozwala na jednoczesne połączenie ukierunkowanego działania substancji cytotoksycznych oraz zjawiska obrazowania diagnostycznego. Kwestia ta jest o tyle istotna, że we wczesnych etapach procesu nowotworzenia, komórki nowotworowe charakteryzują się małą liczbą swoistych dla siebie markerów. Toteż tradycyjne metody diagnostyczne, takie jak tomografia komputerowa, rezonans magnetyczny czy pozytonowa tomografia emisyjna, nie pozwalają na prawidłowe rozpoznanie choroby [42]. Dzięki potencjalnym modyfikacjom aptamerów możliwe jest odróżnienie nie tylko komórek prawidłowych od nowotworowych, ale także wychwycenie różnych subpopulacji komórek nowotworowych.

W wielu doniesieniach naukowych potwierdzono, że coraz częściej dodatkowym składnikiem aptamerowych koniugatów są kropki kwantowe (ang. *Quantum Dots,* QD). Zastosowanie tych struktur jako składowych połączeń aptamer – lek nie jest przypadkowe. Kropki kwantowe to nieorganiczne cząstki, posiadające właściwości fluorescencyjne dzięki, m.in. zjawisku rezonansowego transferu energii. Własności fluorescencyjne, jakie posiadają kropki kwantowe, dają możliwość monitorowania obecności chemoterapeutyku w komórce. Możliwa jest zatem obserwacja m.in. biodegradacji aptamerowych koniugatów leków przeciwnowotworowych i kropek kwantowych. Przykładem takiego połączenia jest koniugat Bi-FRET QD-Apt-DOX (ryc. 4). W takim polimerze dochodzi do utworzenia wiązania kowalencyjnego aptameru A10 z kropką kwantową QD, przy jednoczesnej interkalacji doksorubicyny pomiędzy zasady azotowe apameru [48]. Fluorescencja QD jest wygaszana w obecności doksorubicyny, a ta z kolei traci swoją zdolność do fluorescencji po interkalacji do aptameru. Kiedy dochodziło do połączenia się takiego kompleksu z ligandem tj. receptorem PSA, całość wnikała do wnętrza komórki



RYCINA 4. Koniugat aptameru, doksorubicyny i kropki kwantowej. Połączenie QD-Apt- DOX nie emituje kwantów promieniowania, ponieważ fluorescencja doksorubicyny jest wygaszana po jej interkalacji do aptameru. Kiedy koniugat QD-Apt- DOX dostanie sie do wnętrza komórki nowotworowej, lek zostaje uwolniony i emitowana jest fluorescencja (na podstawie [50], zmodyfikowany)
FIGURE 4. The conjugate of aptamer, doxorubicin and quantum dot. Initially, the combination QD-Apt- DOX does not emit the fluorescence. When QD-Apt- DOX gets inside the cancer cells, DOX is gradually released from the conjugate and the fluorescence of QD is emitted (based on [50], modified]

na zasadzie endocytozy. W kwaśnym środowisku pęcherzyka endocytarnego miało miejsce odłączenie DOX przy jednoczesnej emisji fluorescencji z kropki kwantowej. Opisany proces jest przykładem możliwości monitorowania uwalniania leku z koniugatu, przy jednoczesnej obserwacji jego efektu cytotoksycznego [44]. Alternatywą dla kropek kwantowych w aptamerowych koniugatach mogą być nanocząstki TCL-SPION. W dotychczas przedstawionych doniesieniach literaturowych wykazano, że aptamerowe koniugaty z nanocząstkami SPION mogłyby mieć zastosowanie w obrazowaniu diagnostycznym, np. w tomografii komputerowej [25].

W 2008 roku Madley i wsp. skomercjalizowali kolorymetryczny test, który pozwolił na detekcję komórek nowotworowych z wykorzystaniem chimerycznych

aptamerów połączonych z nanocząsteczkami złota. Jako komórki docelowe zastosowano linię CCRF-CEM. Kontrolnie eksperymenty wykonywane były również na komórkach leukemicznych Ramos. Zastosowane aptamery podzielono ze względu na rozmiary wykorzystanych nanocząstek złota (5-100 nm). Takie koniugaty łączyły się z receptorami na powierzchni komórek nowotworowych, czemu towarzyszyła widoczna zmiana zabarwienia środowiska reakcji, powstała na skutek przesunięcia się widma emisyjnego dla cząsteczek złota. Najkorzystniejsze wyniki otrzymano dla nanocząstek złota o wielkości 50 nm, dających w medium czerwone zabarwienie, którego intensywność mierzono przy długości fali 600 nm. Metodę udało się standaryzować już dla 90 komórek, znajdujących się w laminarnym strumieniu cieczy [18].

Inną modyfikacją aptamerowych koniugatów jest zastosowanie wiązania multiwalentnego, głównie w celu zwiększenia intensywności oczekiwanego sygnału. Wiązanie takie umożliwia wykrycie komórki nowotworowej we wczesnym stadium karcenogenezy, nawet jeżeli komórka taka posiada małą liczbę charakterystycznych dla siebie markerów. Jako przykład posłużyć może zastosowana przez Huanga i wsp. modyfikacja aptameru [19], w której wykorzystano połączenie nanoprętów złota i srebra oraz apatmeru sgc8c [18]. Dzięki zastosowaniu nanoprętów Au – Ag obserwowano 26-krotny wzrost stałej wiązania aptamer – ligand, ale również widoczne było zwiększenie natężania intensywności sygnału fluorescencji aptameru o około 300 razy [17].

Dużym wyzwaniem w diagnostyce chorób nowotworowych jest detekcja komórek nowotworowych w płynach ustrojowych. Należy wiedzieć, że komórki nowotworowe w jednodniowym strumieniu krwi osiągają liczbę 1 mln, to jest około 10 komórek w 1 ml całej krwi. Takiemu wyzwaniu może sprostać jedynie zastosowanie komórkowo – specyficznej chromatografii. W 2009 roku Dharmasri i wsp., w celu wychwycenia z ustroju komórek nowotworowych zaproponowali poly-metylo-metakrylowy „mikroczip", na którym unieruchomiono aptamer anty-PSA. Efektem końcowym było wychwycenie z hodowli około 90% komórek linii raka prostaty LNCaP [22].

Innym systemem mikroprzepływowym był przedstawiony przez Xu i wsp. [32] system posiadający 3 potencjalne miejsca wiązania dla różnych typów komórek leukemicznych: CCRF-CEM, Ramos i Toledo. Detekcję umożliwiło zastosowanie różnych aptamerów, to jest odpowiednio: scg8c, TDO5 i sgd5. Z podawanej mieszaniny komórkowej, wychwyconych zostało 95% „aptamerowo – specyficznych komórek". Należy podkreślić, że tak pozyskane komórki nowotworowe nie traciły swoich cech fenotypowych i genotypowych, a zatem mogły być wykorzystywane w innych eksperymentach. Wartym podkreślenia jest fakt, że jeśli narzędzie mikroprzepływowych systemów będzie zastosowane w badaniach *in vivo*, to otrzymane w taki sposób komórki mogą okazać się niezwykle przydatne szczególnie, jeżeli weźmie się pod uwagę różnice osobnicze pacjentów [32].

PODSUMOWANIE

Na podstawie wiadomości przedstawionych w niniejszej pracy, hipoteza dotycząca obiecujących możliwości aplikacyjnych oraz diagnostycznych, jakie posiadają aptamery wydaje się jak najbardziej słuszna. Przytoczone argumenty dowodzą, że w wielu przypadkach aptamery, które tworzyły z lekami przeciwnowotworowymi koniugaty, poprawiały ich właściwości cytotoksyczne i farmakokinetyczne. Niestety, duże ryzyko w wykorzystaniu aptamerów jako cząsteczek nośnikowych wynika z obecności w środowisku komórki enzymów nukleolitycznych. Najnowsze badania wskazują jednak, że cząsteczki jednościennych nanorurek węglowych (ang. *Single-Walled carbon Nanotubes,* SWNTS) mogą być wykorzystane jako substancje chroniące przed ich działaniem. Ponadto obiecujące jest także zastosowanie w aptamerach nukleotydowych łączników bogatych w zasady azotowe. Taka modyfikacja chemiczna umożliwiłaby poprawę nie tylko ich dystrybucji w obrębie komórki czy tkanki, ale i w znaczący sposób zahamowałaby proliferację komórek nowotworowych i ograniczyła ich właściwości metastatyczne.

PODZIĘKOWANIA

Opublikowanie niniejszej pracy było możliwe dzięki środkom finansowym dostępnym z Young Investigator FEBS Fellowship

LITERATURA

[1] Alemdaroglu FE, Wang J, Börsch M, Berger R, Herrmann A. Enzymatic control of the size of DNA block copolymer nanoparticles. Angew Chem Int Ed Engl. 2008; **47**: 974-976.
[2] Bates PJ, Laber DA, Miller DM, Thomas SD, Trent JO. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. Exp Mol Pathol. 2009; **86**: 151-164.
[3] Berezovski MV, Lechmann M, Musheev MU, Mak TW, Krylov SN. Aptamer-facilitated biomarker discovery (AptaBiD). J Am Chem Soc. 2008; **130**: 9137-9143.
[4] Bhagat M, Halligan S, Sofou S. Nanocarriers to solid tumors: considerations on tumor penetration and exposure of tumor cells to therapeutic agents. Curr Pharm Biotechnol. 2012; **13**: 1306-1316.
[5] Cao Z, Tong R, Mishra A, Xu W, Wong GC, Cheng J, Lu Y. Reversible cell-specific drug delivery with-functionalized liposomes. Angew Chem Int Ed. 2009; **48**: 6494-6498.
[6] Dassie JP, Liu XY, Thomas GS, Whitaker RM, Thiel KW, Stockdale KR, Meyerholz DK, Mccaffrey AP, McNamara JO, Giangrande PH. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. Nat Biotechnol. 2009; **27**: 839-849.
[7] Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA, Yen Y, Heidel JD, Ribas A. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. Nature. 2010; **464**: 1067-1070.
[8] Di Primo C, Dausse E, Toulmé JJ. Surface plasmon resonance investigation of RNA aptamer-RNA ligand interactions. Methods Mol Biol. 2011; **764**: 279-300.

[9] Dwivedi HP, Smiley RD, Jaykus LA. Selection and characterization of DNA aptamers 990 with binding selectivity to campylobacter jejuni using whole-cell SELEX. Appl 991 Microbiol Biotechnol. 2010; **87**: 2323-34.
[10] Ferreira CS, Cheung MC, Missailidis S, Bisland S, Gariepy J. Phototoxic aptamers selectively enter and kill epithelial cancer cells. Nucleic Acids Res. 2009; **37** :866-876.
[11] Friedman AD, Claypool SE, Liu R. The Smart Targeting of Nanoparticles. Curr Pharm Des. 2013, Mar.
[12] Germer K, Leonard M, Zhang X. RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications. Int J Biochem Mol Biol. 2013; **31**: 27-40.
[13] Gilboa E, McNamara J, Pastor F. Use of oligonucleotide aptamer ligands to modulate the function of immune receptors. Clin Cancer Res. 2013; **19**: 1054-1062.
[14] Hong H, Zhang Y, Cai W. In vivo imaging of RNA interference. J Nucl Med. 2010; **51**: 169-172.
[15] Hong H, Zhang Y, Sun J, Cai W. Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles. Nano Today. 2009; **4**: 399-413.
[16] Hu Y, Duan J, Zhan Q, Wang F, Lu X, Yang XD. Novel MUC1 aptamer selectively delivers cytotoxic agent to cancer cells in vitro. PLoS One. 2012; **7**: e31970. doi: 10.1371/journal.pone.0031970.
[17] Huang YF, Chang HT, Tan W. Cancer cell targeting using multiple aptamers conjugated on nanorods. Anal Chem. 2008; **80**: 567-672.
[18] Huang YF, Shangguan D, Liu H, Phillips JA, 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.
[19] Huang Z, Wang X, Gao G. Analyses of SELEX-derived ZAP-binding RNA aptamers suggest that the binding specificity is determined by both structure and sequence of the RNA. Protein Cell. 2010; **1**: 752-759.
[20] Jiang H, Tao W, Zhang M, Pan S, Kanwar JR, Sun X. Low-dose metronomic paclitaxel chemotherapy suppresses breast tumors and metastases in mice. Cancer Invest. 2010; **28**: 74-84.
[21] Kang H, O'donoghue MB, Liu H, Tan W. A liposome-based nanostructure for aptamer 1069 directed delivery. Chem Commun (Camb). 2010; **46**: 249-251.
[22] Kang WJ, Chae JR, Cho YL, Lee JD, Kim S. Multiplex imaging of single tumor cells using quantum-dot-conjugated aptamers. Small. 2009; **5**: 2519-2522.
[23] Kanwar JR, Mahidhara G, Kanwar RK. Antiangiogenic therapy using nanotechnological-based dee livery system. Drug Discov Today. 2011; **16:** 188-202.
[24] Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 2010; **9**: 537-550.
[25] Kim D, Jeong YY, Jon S. A drug-loaded aptamer-gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer. ACS Nano. 2010; **4**: 3689-3696.
[26] Kohl E, Karrer S. New developments in photodynamic therapy. Hautarzt. 2013; **64**: 363-369.
[27] Lee JH, Yigit MV, Mazumdar D, Lu Y. Molecular diagnostic and drug delivery agents based on aptamer-nanomaterial conjugates. Adv Drug Deliv Rev. 2010; **62**: 592-605.
[28] Little MP. Cancer models, genomic instability and somatic cellular Darwinian evolution. Biol Direct. 2010; **20**; 5-19.
[29] Mallikaratchy P, Tang Z, Tan W. Cell specific aptamer-photosensitizer conjugates as a molecular tool in photodynamic therapy. Chem Med Chem. 2008; **3**: 425-428.
[30] Menna P, Paz OG, Chello M, Covino E, Salvatorelli E, Minotti G. Anthracycline cardiotoxicity. Expert Opin Drug Saf. 2012; **11**: 21-36.
[31] Min K, Jo H, Song K, Cho M, Chun YS, Jon S, Kim WJ, Ban C. Dual-aptamer-based delivery vehicle of doxorubicin to both PSMA (+) and PSMA (−) prostate cancers. Biomaterials. 2011; **32**: 2124-2132.
[32] Phillips J, Xu Y, Xia Z, Fan Z, Tan W. Enrichment of cancer cells using aptamers immobilized on a microfluidic channel. Anal. Chem. 2009; **81**: 1033-1039.
[33] Rajendran L, Knolker HJ, Simons K. Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. Nat Rev Drug Discov. 2010; **9**: 29-42.
[34] Sefah K, Tang ZW, Shangguan DH, Chen H, Lopez-Colon D, Li Y, Parekh P, Martin J, Meng L, Phillips JA, Kim YM, Tan WH. Molecular recognition of acute myeloid leukemia using aptamers. Leukemia 2009; **23**: 235-244.

[35] Shan L. Indotricarbocyanine-loaded AS1411 DNA aptamer- and TGN peptide-modified poly(ethylene glycol)-poly(ε-caprolactone) nanoparticles. Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD) [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004-2013
[36] Sin M, Jakubcová M, Chrapek O, Pracharová Z, Simicák J, Rehák J. The effect comparison of ranibizumab and sodium pegaptanib on the retinal pigment epithelium ablation size in the treatment of age-related macular degeneration. Cesk Slov Oftalmol. 2012; **68**: 57-60.
[37] Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. Oncogene. 2010; **29**: 4741-4751.
[38] Sook BG, Cho S, Lee N, Lee BR, Kim JH, Kim BG. Rational design of modular allosteric Q71247 aptamer sensor for label-free protein detection. Biosens Bioelectron. 2013; 39: 44-50.
[39] Statkiewicz M, Małecki M. Macierzyste komórki nowotworowe, a oporność nowotworów na terapię. Nowotwory 2008; **58**: 221-224.
[40] St Denis TG, Hamblin MR. Synthesis, bioanalysis and biodistribution of photosensitizer conjugates for photodynamic therapy. Bioanalysis. 2013; **5**: 1099-1114.
[41] Taghdisi SM, Abnous K, Mosaffa F, Behravan J. Targeted delivery of daunorubicin to T-cell acute lymphoblastic leukemia by aptamer. J Drug Target. 2010; **18**: 277-281.
[42] Ulrich H, Wrenger C. Identification of aptamers as specific binders and modulators of cell-surface receptor activity. Methods Mol Biol. 2013; **986**: 17-39.
[43] Visani G, Isidori A. Doxorubicin variants for hematological malignancies. Nanomedicine (Lond). 2011; **6**: 303-306.
[44] Wang FB, Rong Y, Fang M, Yuan JP, Peng CW, Liu SP, Li Y. Recognition and capture of metastatic hepatocellular carcinoma cells using aptamer-conjugated quantum dots and magnetic particles. Biomaterials. 2013; **34**: 3816-3827.
[45] Wu Y, Phillips Ja, Liu H, Yang R, Tan W. Carbon nanotubes protect DNA strands during cellular delivery. ACS Nano. 2008; **2**: 2023-2028.
[46] Wu Y, Sefah K, Liu H, Wang R, Tan W. DNA aptamer-micelle as an efficient detection/delivery vehicle toward cancer cells. PNAS. 2010; **107**: 5-10.
[47] Yang J, Xie SX, Huang Y, Ling M, Liu J, Ran Y, Wang Y, Thrasher JB, Berkland C, Li B. Prostate-targeted biodegradable nanoparticles loaded with androgen receptor silencing constructs eradicate xenograft tumors in mice. B Nanomedicine (Lond). 2012; **9**: 1297-1309.
[48] Zhang H. Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD) [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004-2013.
[49] Zhang Y, Chen Y, Han D, Ocsoy I, Tan W. Aptamers selected by cell-SELEX for application in cancer studies. Bioanalysis. 2010; **2**: 907-918.
[50] Zhang Y, Hong H, Cai W. Tumor-targeted drug delivery with aptamers. Curr Med Chem. 2011; **18**: 4185-4194.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 01.07.2013
Przyjęto: 23.08.2013
Agnieszka Marczak
Katedra Termobiologii
Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź
tel.: 042-635-44-77
fax: 042-635-44-73
e-mail: aszwar@biol.uni.lodz.pl