

Znaczący postęp w dziedzinie genetyki, biologii molekularnej i biotechnologii, który nastąpił w ostatnim czasie, stworzył nowe możliwości diagnozowania oraz leczenia chorób, które do tej pory uważano za nieuleczalne w przypadku zastosowania aktualnie dostępnych strategii farmaceutycznych. Klasą związków doskonale wpisującą się w powyższy trend są aptamery, czyli zróżnicowana grupa jednoniciowych oligonukleotydów, których sekwencja warunkuje związanie się w swoistą strukturę drugo- i trzeciorzędową. Obecność tych elementów strukturalnych determinuje układ przestrzenny aptameru, kluczowy czynnik, który pozwala tym oligonukleotydom związać się z docelowym białkiem i tym sposobem modulować jego aktywność. Ponadto zaobserwowano również, że o powinowactwie i specyficzności aptamerów, podobnie jak w przypadku przeciwciał, decydują głównie trzeciorzędowe interakcje. Doskonałymi przykładami dużej różnorodności strukturalnej aptamerów są oligonukleotydy RE31, RV66 i Toggle-25t, które przyjmują strukturę odpowiednio: G-kwadrupeksu z dodatkowym fragmentem dupleksu, równoległego G-kwadrupeksu z regionami flankującymi 5' i 3' oraz typu spinki do włosów z wypełnieniem wewnętrznym. Aptamery znalazły szereg zastosowań, od atrakcyjnego narzędzia terapeutycznego, poprzez wydajny system dostarczania leków, aż po elementy platform diagnostycznych. Pomimo wielu potencjalnych ról aptamerów i szeregu badań klinicznych z udziałem tych oligonukleotydów, jak dotąd istnieje tylko jeden terapeutyk o nazwie Macugen, zatwierdzony przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków jako lek stosowany w leczeniu zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem. Wszystkie powyższe przykłady obrazują złożoność czynników, które należy wziąć pod uwagę podczas prób wdrażania aptamerów do leczenia klinicznego. Warto zauważyć, że aptamery wykazują szereg zalet w porównaniu z przeciwciałami, takie jak lepsza stabilność termiczna i trwałość podczas przechowywania, krótszy czas przygotowania i niewielkie różnice między partiami produktu, łatwość wprowadzania modyfikacji chemicznych, duża różnorodność potencjalnych celów terapeutycznych bez wymagań, aby miały one immunogeny charakter, a przede wszystkim zdolność rozróżniania blisko spokrewnionych cząsteczek. Szeroko zarysowany zakres korzyści wynikających z zastosowania aptamerów, jako terapeutyków, skłonił naukowców do podejmowania prób opracowania nowych aptamerów o korzystniejszych właściwościach terapeutycznych.

Jednym z kluczowych ograniczeń w zwiększaniu powinowactwa i siły wiązania natywnych aptamerów z docelowym białkiem jest niska różnorodność modyfikowanych reszt nukleotydowych w porównaniu z aminokwasami. Kamieniem milowym w tej dziedzinie okazało się opracowanie modyfikacji reszt nukleotydowych (SOMA-DNA), które lepiej naśladują reszty aminokwasowe i mogą mieć znaczący wpływ na poprawę siły wiązania aptamerów ze względu na obecność dodatkowych oddziaływań hydrofobowych. Powyższe obserwacje dały podstawę merytoryczną i impuls do stworzenia nowatorskich modyfikacji, syntetyzowanych po raz pierwszy w naszym Laboratorium, które nazwano specyficznie funkcjonalizowanymi kwasami nukleinowymi o zwiększonej labilności pierścienia rybozy (z ang. Slow Off-Rate Unlocked Nucleic Acids, SUNAs). Oczekuje się, że połączenie znaczącej elastyczności reszty kwasu nukleinowego o zwiększonej labilności pierścienia rybozy z białkowym łańcuchem bocznym obecnym na reszcie zasady azotowej wzmocni oddziaływanie białko-aptamer. Inną modyfikacją, która mogłaby poprawić oddziaływanie białko-aptamer, jest modyfikacja wiązań międzynukleotydowych, która polega na zastąpieniu jednego atomu tlenu siarką. Stwierdzono również, że wprowadzenie siarki w pozycję C4 urydyny, dające początek modyfikacji o nazwie 4-tiourydyna (s4U), może wpływać na poprawę powinowactwa aptameru do docelowego białka. Ponadto udowodniono również, że wzmocnienie oddziaływania oligonukleotydu z białkiem można osiągnąć poprzez zmianę pierścienia rybozy na resztę 2'-fluoroarabinozy (2'-FANA), charakteryzującej się odmienną konformacją cukrów.

Biorąc pod uwagę powyższe dane, w niniejszym projekcie proponujemy poszerzenie wiedzy na temat przydatności wymienionych modyfikacji do opracowania wariantów aptamerów RE31, RV66 i Toggle-25t o zwiększonym powinowactwie do białek docelowych. Szczegółowe poznanie procesów i mechanizmów na poziomie molekularnym mogłoby pozwolić na zaprojektowanie nowych wersji znanych inhibitorów, co jednocześnie przełożyłoby się na udoskonalenie metod terapeutycznych. Oczekuje się, że badania dostarczą kompleksowych wskazówek dotyczących udoskonalania aptamerów o różnych układach przestrzennych w celu zwiększenia ich powinowactwa do białka docelowego poprzez wprowadzenie zmodyfikowanych reszt nukleotydowych. Warto podkreślić, że nasze badania są pierwszą próbą wykorzystania SUNAs jako wszechstronnego narzędzia do modulowania powinowactwa i selektywności aptamerów o różnej budowie i mechanizmie działania.