

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **239749**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **435190**

(22) Data zgłoszenia: **14.12.2017**

(62) Numer zgłoszenia, z którego nastąpiło wydzielenie:
423900

(51) Int.Cl.

C12N 15/115 (2010.01)

C12N 9/64 (2006.01)

(54) **Aptamer RNA hamujący aktywność proteolityczną mysiej metaloproteazy ADAM10,
zawierająca go kompozycja farmaceutyczna oraz zastosowanie aptameru**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
17.06.2019 BUP 13/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
03.01.2022 WUP 01/22

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, Kraków, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

JAROSŁAW JUCHA, Kraków, PL

JOANNA BERETA, Kraków, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Piotr Godlewski

PL 239749 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy ogólnie inhibitora metaloproteazy, a konkretniej aptameru RNA (A10.a.1 o sekwencji nukleotydowej SEQ ID NO 1) posiadającego aktywność biologiczną polegającą na hamowaniu procesu proteolizy prowadzonego przez mysią metaloproteazę ADAM10. Szczegółowo wynalazek dotyczy zastosowania aptameru do hamowania aktywności białka ADAM10. Bardziej szczegółowo wynalazek dotyczy aptameru, kompozycji farmaceutycznej go zawierającej oraz zastosowania aptameru do leczenia stanów zapalnych lub nowotworów.

Ograniczona proteoliza to potranslacyjna, nieodwracalna modyfikacja pozwalająca modulować aktywności białek istotnych dla funkcjonowania tak złożonych układów jak komórka, tkanka czy cały organizm. Proces ten prowadzą proteazy. Jedną z ich grup są metaloproteazy, a wśród nich wyróżnić można: metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP), błonowe metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MT-MMP), błonowe metaloproteazy dysintegrynowe z motywem trombospondynowym (ADAMTS) oraz błonowe metaloproteazy dysintegrynowe (ADAM) [1]. Białka z rodziny ADAM (ang. *A Disintegrin And Metalloproteinase*) umożliwiają złuszczenie (*shedding*) z powierzchni komórek ektodomen białek błonowych w wyniku konstytutywnej proteolizy przebiegającej bez wpływu czynników stymulujących lub poprzez aktywowaną proteolizę zachodzącą po zadziałaniu stymulatora [2, 3]. Enzymy zaangażowane w ten proces określane są jako szedazy (ang. *shedases*).

Typowymi substratami dla proteaz ADAM są niektóre czynniki wzrostu, cytokiny, chemokiny oraz niektóre receptory czynników wzrostu i cytokin jak również białka ścieżki sygnałowej Notch i białka adhezyjne [4]. Ogólne konsekwencje procesu złuszczenia białek błonowych to m.in.: (i) wzrost w środowisku stężenia cytokin i czynników wzrostu produkowanych w postaci błonowych prekursorów jak na przykład czynnika martwicy nowotworów (TNF) czy czynników wzrostu z rodziny naskórkowego czynnika wzrostu (EGF); (ii) obniżenie reaktywności komórek na bodźce (gdy złuszczeniu ulegną receptory); (iii) transaktywacja komórek (poprzez międzykomórkowe przekazywanie receptorów np. specyficznego receptora dla IL-6); (iv) stymulacja sygnału wewnątrzkomórkowego przez uwolnione, cytoplazmatyczne domeny receptorów (np. receptory Notch).

Wśród substratów proteaz ADAM znajdują się głównie białka błonowe typu I i II, ale także białka zakotwiczone w błonie komórkowej kotwicą glikozylofosfatydilinozitolową (GPI) okazały się celem dla białek ADAM [5]. Dowiedziono również, że białko neuregulina 1 (NRG1) typu III dwukrotnie przebijające błonę komórkową, jest substratem dla ADAM10 oraz ADAM17 [6, 7]. Dwie, blisko spokrewnione szedazy ADAM10 i ADAM17 zaangażowane są w większość do tej pory poznanych procesów złuszczenia ektodomen białkowych. Obie proteazy odpowiedzialne są za ograniczoną proteolizę ponad stu białek błony komórkowej, natomiast w przedmiotowym opisie efekt tego procesu zostanie opisany na przykładzie tylko kilku z nich. Enzymy te charakteryzuje częściowa redundancja. Niektóre substraty są uwalniane z podobną wydajnością przez obydwa enzymy, inne są specyficznym rozpoznawane albo przez białko ADAM10 albo przez ADAM17, jeszcze inne są preferencyjnie rozpoznawane przez jeden z pary enzymów, ale przy jego braku proteolizy może dokonać drugi enzym.

Wagę procesu ograniczonej proteolizy prowadzonej przez ADAM10 i ADAM17 podkreśla letalność mysich embrionów z nokautami genów kodujących te metaloproteazy lub ich domeny katalityczne. Myszy pozbawione ekspresji *Adam10* umierają w połowie rozwoju embrionalnego (E 9.5) [8]; embriony *Adam10*^{-/-} charakteryzują się zredukowaną masą ciała, defektami w rozwoju centralnego układu nerwowego oraz układu sercowo-naczyniowego. Wyłączenie ekspresji *Adam17* powoduje śmierć myszy na późnym etapie rozwoju płodowego (E 17.5) lub w pierwszych dniach po urodzeniu [9]. Myszy te cechują się zaburzeniami w rozwoju płuc, serca, skóry i układu immunologicznego [10]. Co ciekawe, nokaut genów kodujących inne enzymy z rodziny ADAM (ADAM8, 9, 12, 15, 28 i 33) nie zaburza rozwoju embrionalnego myszy i wydaje się nie mieć większego wpływu na dalsze życie zwierząt [11]. Proteazy ADAM10 i ADAM17 pełnią bardzo ważną funkcję nie tylko na etapie rozwoju embrionalnego, ale również u dorosłych osobników. Co ciekawe, poziom ekspresji białek ADAM10 i ADAM17 jest wyraźnie wyższy od innych proteaz tej rodziny [11].

Patologiczna aktywacja układu odpornościowego może prowadzić do wielu negatywnych skutków, do czego przyczyniają się szedazy. Co ciekawe, przy ostrych i chronicznych stanach zapalnych obserwowana jest nadaktywność i/lub nadekspresja białek ADAM [11–13].

Uwalniany przez ADAM17 TNF jest, obok IL-1, odpowiedzialny za zagrażającą życiu niewydolność wielonarządową będącą skutkiem szoku septycznego w ciężkich przypadkach posocznicy [14].

Nadmierne i długotrwałe działanie TNF-u przyczynia się także do rozwoju chorób o podłożu przewlekłego stanu zapalnego takich jak reumatoidalne zapalenie stawów (RZS), choroba Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego czy łuszczyca [15]. Stosowanie leków blokujących działanie TNF-u w chorobach o podłożu chronicznego stanu zapalnego jest bardzo skuteczne, choć u części pacjentów obserwuje się oporność na terapię lub efekty uboczne np. nawracające infekcje [16, 17]. W związku z tym, poszukuje się uzupełniających lub alternatywnych terapii mających na celu zahamowanie aktywności innych białek zaangażowanych w rozwój chronicznego stanu zapalnego.

Przykładem takiego celu może być rozpuszczalny IL-6R, produkt aktywności ADAM10 i ADAM17. Poziom tego receptora w osoczu i niektórych tkankach koreluje z różnymi stanami patologicznymi o podłożu zapalnym [18–20]. Podczas gdy działanie IL-6 na komórki, które wykazują ekspresję IL-6R (hepatocyty i komórki układu odpornościowego) służy przywracaniu homeostazy organizmu zaburzonej przez stan zapalny, to w przypadku sygnału trans, IL-6 nasila procesy prozapalne.

Rozpuszczalny FasL to kolejny przykład białka o aktywności prozapalnej. U pacjentów z RZS poziom rozpuszczalnego FasL w mazi stawowej koreluje z ostrością przebiegu choroby [21]. Udowodniono również, że FasL stymuluje proliferację synowocytów i sekrecję cytokin prozapalnych przez te komórki co przyczynia się do nasilenia napływu komórek odpornościowych do torebki stawowej i do uszkodzenia tkanki chrzęstnej [22–24].

Nowotwory powstają w wyniku nagromadzenia wielu genetycznych i epigenetycznych zmian w komórkach gospodarza. Fundamentalną nieprawidłowością prowadzącą do rozwoju nowotworu jest ciągła, nieograniczona proliferacja komórek nowotworowych. Komórki nowotworowe nie posiadają zdolności do prawidłowej odpowiedzi na sygnały, które kontrolują zachowania niezmiennych komórek. Dodatkowo, rosnący nowotwór kształtuje swoje własne unikalne mikrośrodowisko tkankowe, które stanowi źródło sygnałów stymulujących wzrost, przeżywalność, zdolność do migracji i przerzutowania [25, 26].

W przypadku wielu typów nowotworów (piersi, płuc, okrężnicy, żołądka, trzustki, nerek, prostaty, jajnika, szyjki macicy, wątroby, czy też w białaczkach) zaobserwowano wzmożoną ekspresję ADAM10 i/lub ADAM17 [27–38]. Wysoka ekspresja ADAM17 w raku piersi koreluje z poziomem inwazyjności nowotworu [39] a w modelach eksperymentalnych wyciszenie ekspresji ADAM10 i ADAM17 często prowadzi do zahamowania wzrostu nowotworu [40–42]. W jaki sposób ADAM10 i ADAM17 przyczyniają się do progresji nowotworów? Obecnie przyjmuje się następującą hipotezę: w wielu typach nowotworów zachodzi nadekspresja czynników wzrostu z rodziny EGF i ich receptorów ErbB, u człowieka określanych też jako HER (ang. *Human EGFR family Receptors*). Powoduje to silną, autokrynną stymulację proliferacji, przeżywalności i migracji komórek nowotworowych. Proces ten jest jednak efektywny tylko wtedy, gdy komórki nowotworowe, produkujące czynniki wzrostu, wykazują ekspresję odpowiednich białek z rodziny ADAM. Czynniki wzrostowe, produkowane w formie błonowych prekursorów, pełną aktywność wykazują jako białka rozpuszczalne, uwolnione z błony przez szedazę ADAM10 (w przypadku EGF, betaceluliny, neureguliny 1) lub ADAM17 (w przypadku transformującego czynnika wzrostu α ($TGF\alpha$), wiążącego heparynę czynnika wzrostu podobnego do EGF (HB-EGF), amfireguliny, neureguliny 1, epireguliny czy epigenu) [10, 43–48]. Uwolnienie czynników wzrostu ułatwia ich oddziaływanie z odpowiednimi receptorami z rodziny HER/ErbB (ErbB1, 3, 4) i konieczną dla przekazu sygnału homo- lub heterodimeryzację receptorów między sobą lub dodatkowo z sierocym receptorem HER2/ErbB2. HER1/ErbB1, 2 oraz 4 posiadają domeny wewnątrzkomórkowe o aktywności kinazowej, natomiast domena HER3/ErbB3 jest pozbawiona tej aktywności. Aktywacja receptorów prowadzi do krzyżowej fosorylacji wewnątrzkomórkowej domeny receptora-partnera i uruchomienia szlaków przekazu sygnału takich jak ERK/MAPK, PI3 K/AKT czy JAK/STAT [49, 50].

Działanie szedaza na nowotwór poprzez aktywację czynników wzrostu nie ogranicza się jedynie do wpływu na proliferację, przeżywanie i migrację komórek nowotworowych. W laboratorium wykazano, że w przypadku mysiego modelu raka jelita grubego, MC38CEA, ADAM17 poprzez autokrynną stymulację z udziałem neureguliny 1 β promuje syntezę VEGF-A (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor A*) i unaczynienie nowotworu [51]. Badania prowadzone na komórkach U87 również wskazują na istnienie korelacji między aktywnością ADAM17 a syntezą VEGF-A; wyciszenie aktywności ADAM17 w tych komórkach prowadziło do obniżenia poziomu wydzielanego VEGF-A [52]. Nie tylko ADAM17, ale również ADAM10 promuje angiogenezę w guzach nowotworowych. ADAM10 został zidentyfikowany jako szedaza białka GPNMB/OA, produkowanego przez komórki nowotworowe [53]. Rozpuszczalna forma tego białka stymuluje sekrecję VEGF-A i zwiększa rekrutację komórek śródbłonkowych, przez co promuje angiogenezę i przerzutowanie komórek z guza pierwotnego [53, 54]. ADAM17 jest także zaangażowany w limfangiogenezę [55], proces który może wspierać rozwój i przerzutowanie nowotworów.

Szedazy ADAM10 oraz ADAM17 wykazują aktywność proteolityczną nie tylko w stosunku do czynników wzrostowych, ale także do niektórych z ich receptorów. ADAM10 został zidentyfikowany jako szedaza dla ErbB2, natomiast ADAM17 dla ErbB4 [56, 57]. Poziom ekspresji ErbB2 w komórkach raka piersi odzwierciedla poziom inwazyjności komórek nowotworowych. W terapii raka piersi stosuje się przeciwciała monoklonalne, Trastuzumab, hamujące aktywność receptora ErbB2. Dowiedziono, że u części pacjentów terapia ta jest nieefektywna ze względu na uwalnianie rozpuszczalnej formy tego receptora przez ADAM10 [58]. Fizjologiczna rola proteolizy receptora ErbB4 nie jest do końca poznana. Podczas rozwoju mózgu myszy złuszczenie ErbB4 indukuje proces RIP, który prowadzi do zahamowania ekspresji genów niezbędnych w różnicowaniu astrocytów [59].

Poza autokrynną stymulacją komórek nowotworowych, również czynniki wzrostowe uwalniane przez szedazy z komórek stromy nowotworu mogą w sposób parakrynnny wspierać proliferację i angiogenezę [60]. Badania prowadzone nad nowotworami piersi i glejakami dowiodły, że makrofagi występujące w mikrośrodkowisku guza tzw. TAM (ang. *Tumor Associated Macrophages*) zwiększają inwazyjność komórek nowotworowych poprzez uruchomienie parakrynnnej pętli sygnałowej, w którą zaangażowany jest EGF – uwalniany z powierzchni TAM przez ADAM10, oraz rozpuszczalna forma czynnika stymulującego powstawanie kolonii makrofagów (MCSF) uwalniana przez ADAM17 z komórek nowotworowych [61–63]. MCSF powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego NFκB w komórkach TAM i wzmożone uwalnianie VEGF-A [64–68].

Teoretycznie ADAM10 oraz ADAM17 mogą przyczyniać się do progresji nowotworów poprzez proteolizę cząsteczek adhezji komórkowej takich jak L1, CD44, E-kadheryny, N-kadheryny czy VE-kadheryny, która prowadzi do osłabienia oddziaływań międzykomórkowych i ułatwia migrację, a więc i metastazę komórek nowotworowych [48, 69, 70]. ADAM10 i ADAM17 mogą również uczestniczyć w „ucieczce” komórek nowotworowych przed działaniem układu immunologicznego. W przypadku wielu nowotworów nabłonkowych dochodzi do ekspresji stresowych białek MICA i MICB – ligandów dla receptora NKG2D występującego na powierzchni komórek NK i cytotoksycznych limfocytów T [71]. Aktywacja NKG2D przez błonowe MICA i MICB uruchamia mechanizmy cytotoksyczne komórek odpornościowych w stosunku do komórek nowotworowych [72]. U pacjentów, u których zidentyfikowano nowotwory MIC-pozytywne, obserwowano mierzalny poziom rozpuszczalnych form tych białek w surowicy. Za uwalnianie MICA i MICB są odpowiedzialne ADAM17 i, w mniejszym stopniu, ADAM10 [73, 74]. Uważa się, że rozpuszczalne MICA i MICB konkurują z ich błonowymi prekursorami o wiązanie NKG2D i w ten sposób osłabiają rozpoznawanie i zabijanie komórek nowotworowych.

Również białko B7-H6 występujące na powierzchni niektórych nowotworów stymuluje cytotoksyczność komórek NK aktywując receptor NKp30 [75–77]. Ilość błonowej formy B7-H6 kontrolowana jest przez ADAM10 i ADAM17 a detekcja podwyższonego poziomu rozpuszczalnej formy B7-H6 w surowicy pacjentów chorych na czerniaka, sugeruje, że może dochodzić do obniżenia aktywacji komórek NK [78].

Podsumowując, ADAM10 i ADAM17 to najlepiej poznane białka z rodziny błonowych metaloproteaz dysintegrynowych. Enzymy te, określane jako szedazy odpowiadają za złuszczenie z powierzchni komórek ektodomen białek błonowych takich jak czynniki wzrostu, cytokiny i ich receptory jak również białka adhezji komórkowej. Aktywność ADAM10 i ADAM17 jest szczególnie ważna w procesach wzrostu i różnicowania komórek oraz w funkcjonowaniu układu odpornościowego. Podwyższona ekspresja tych białek może przyczyniać się do rozwoju chorób o podłożu przewlekłego stanu zapalnego oraz chorób nowotworowych. Proteazy ADAM10 i ADAM17 są obecnie szeroko badane jako potencjalne cele terapii w tych schorzeniach.

Otrzymany aptamer RNA A10.a.1 (SEQ ID NO 1) może zostać wykorzystany jako terapeutyk. Pomimo prowadzonych prac mających na celu otrzymanie specyficznych inhibitorów ADAM10 (patrz np. międzynarodowe zgłoszenia patentowe nr PCT/US2004/012672, PCT/JP2007/075121, PCT/US2004/033945, PCT/US2006/029726, PCT/GB2008/003441, PCT/EP2016/050028 i PCT/IB2015/002574), do tej pory nie udało się wprowadzić ich do terapii ze względu na niską specyficzność lub wywoływane efekty uboczne. Alternatywą dla leków małowcząsteczkowych i przeciwciał monoklonalnych, są aptamery mogące spełniać rolę potencjalnych inhibitorów proteaz. Aptamery to jednoniciowe oligonukleotydy RNA lub DNA wyłonione z kombinatorycznej biblioteki, wykazujące wysokie powinowactwo i specyficzność względem docelowej cząsteczki. Są więc nowatorską alternatywą dla przeciwciał monoklonalnych. Synteza aptamerów RNA może być przeprowadzana za pomocą syntezy chemicznej lub sposobów laboratoryjnych (PCR i transkrypcja *in vitro*). W porównaniu do przeciwciał monoklonalnych, których produkcję prowadzi się z wykorzystaniem hodowli komórkowych, koszty produkcji aptamerów są znacznie niższe. Co więcej w stosunku do

aptamerów RNA nie zidentyfikowano występowania swoistej odpowiedzi immunologicznej w układach *in vivo*. Aptamery RNA mogą być w różny sposób modyfikowane co zwiększa spektrum ich potencjalnych zastosowań.

ISTOTA WYNAZKU

Przedmiotem wynalazku jest aptamer wykazujący powinowactwo do białka ADAM10 zawierający sekwencję nukleotydową SEQ ID NO 1 lub jej region zmienny, lub sekwencję kwasu nukleinowego hybrydującego specyficznie w ostrych warunkach roztworu hybrydizacyjnego z kwasem nukleinowym stanowiącym nić komplementarną do kwasu nukleinowego o sekwencji SEQ ID NO 1.

Korzystnie, aptamer zawiera region zmienny sekwencji o SEQ ID NO 1.

Korzystnie regionem zmiennym SEQ ID NO 1 jest:

5'GCGUGAUUCGCUACUUUGGCCGUUGCAGGGCCUGAC3'

Kolejnym przedmiotem jest aptamer jak określono powyżej do zastosowania hamowania aktywności białka ADAM10.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna charakteryzująca się tym, że zawiera aptamer jak określono powyżej.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest aptamer lub kompozycja farmaceutyczna jak określono powyżej do zastosowania w leczeniu choroby mediowanej białkiem ADAM10.

Korzystnie leczoną chorobą mediowaną białkiem ADAM10 jest stan zapalny lub nowotwór.

KRÓTKI OPIS FIGUR

Figura 1 przedstawia schemat sposobu cell-SELEX na przykładzie strategii zastosowanej w celu otrzymania aptamerów RNA hamujących aktywność ADAM10 i/lub ADAM17. Diagram kołowy przedstawia etapy amplifikacji aptamerów. Pozioma strzałka oznacza miejsce wprowadzenia syntetycznej biblioteki ssDNA przed pierwszą rundą selekcyjną. Prostokątny panel przedstawia etap selekcji pozytywnej i selekcji negatywno-pozytywnej z wykorzystaniem komórek. Komórki wykazujące ekspresję docelowego białka (komórki pozytywne) oznaczono jako ciemniejsze kółka, natomiast komórki pozbawione ekspresji tego białka (komórki negatywne) jako kółka jaśniejsze.

Figura 2 przedstawia analizę zdolności wiązania wyselekcjonowanych aptamerów RNA do białek meADAM10_mFc, meADAM17_mFc oraz BSA za pomocą sposobu ELISA. Analizowano następujące aptamery: A10.a.1, A10.b.2, A17.g.3, A10.c.4, A17.e.5, A10.d.6, A17.f.7. Kontrolę negatywną stanowiła pula aptamerów RNA przed selekcją (pula RNA), a w kontroli odczynnikowej zamiast aptamerów wykorzystano bufor PBS. Przedstawiony wynik to średnia z dwóch niezależnych eksperymentów, w których każda próbka to triplikat.

Figura 3 przedstawia analizę potencjału inhibitorowego otrzymanych aptamerów RNA względem białek meADAM9, meADAM10_mFc i meADAM17_mFc. Analizowano następujące aptamery: A10.a.1, A10.b.2, A10.c.4, A10.d.6, A17.e.5, A17.f.7, A17.g.3. Kontrolę negatywną stanowiła pula aptamerów RNA przed selekcją (pula RNA), próbka obrazująca aktywność danego białka ADAM bez obecności aptameru to kontrola. Przedstawiony wynik to średnia z trzech niezależnych eksperymentów, w których każda próbka przygotowana była w duplikacie.

Figura 4 przedstawia wyznaczanie parametru IC₅₀ dla aptameru A10.a.1 poprzez wykreślenie krzywej zależności aktywności enzymatycznej (intensywności fluorescencji) meADAM10_mFc od stężenia aptameru (w μ M, skala logarytmiczna). Wartość IC₅₀ przedstawiono na wykresie w ramce oraz za pomocą przerywanej linii. Przedstawiony wynik to średnia z trzech niezależnych eksperymentów, w których każda próbka przygotowana była w duplikacie.

Figura 5 przedstawia analizę migracji komórek B16F10 w teście „zarastania rany”. A – Zdjęcia mikroskopowe po obróbce w programie TScratch pozwalające rozgraniczyć monowarstwę komórek (jasnoszary kolor) B16F10 (WT) i B16F10-ADAM17-/- (ADAM17-/-) od „ran” (kolor ciemnoszary). Komórki B16F10 (WT) inkubowano z badanymi aptamerami: A10.a.1, A17.e.5 lub A10.d.6 lub z pulą RNA lub z syntetycznym inhibitorem GI254023X albo GM6001 lub z DMSO (rozpuszczalnik dla syntetycznych inhibitorów) przez 18 h. Zdjęcia zostały wykonane w czasie 0 (T=0 h) oraz w tych samych miejscach po 18 h-inkubacji (T=18 h). Na każdym zdjęciu zaznaczono skalę za pomocą jasnego paska odpowiadającego 200 μ m. B – analiza powierzchni płytki zarośniętej przez komórki B16F10 (WT) inkubowane w samej pożywce lub w obecności badanych aptamerów lub syntetycznych inhibitorów szedaz oraz powierzchni zarośniętej przez komórki ADAM17-/- po 18 h inkubacji. Wynik przedstawia średnią z trzech niezależnych eksperymentów, wykonanych w tryplikatach. Za pomocą gwiazdek przedstawiono istotność statystyczną: *** – $p < 0,001$.

Figura 6 przedstawia analizę poziomu uwalniania ludzkiego TNF (hTNF) w komórkach B16F10 (A) i B16F10-ADAM17-/- (B) wykazujących ekspresję białka fuzyjnego EGFP-hTNF-TdTOMATO. Komórki preinkubowano z badanymi aptamerami, wyjściową pulą RNA lub inhibitorami metaloproteaz GM6001, GI254023X, a następnie uwalnianie TNF przez szedazy stymulowano PMA lub jonomycyną. Kontrola odczynnikowa – pożywka hodowlana zawierająca objętość DMSO równą końcowej objętości inhibitorów GM6001 i GI254023X; kontrola – pożywka hodowlana. Stężenie TNF w pożywkach oznaczono testem ELISA. Przedstawiono średnią z trzech niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w tryplikatach wraz z odchyleniami standardowymi. Za pomocą gwiazdek przedstawiono istotność statystyczną: ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

Figura 7 przedstawia analizę poziomu uwalniania mysiego TNF (mTNF) w komórkach RAW264.7 (A) i RAW264.7-ADAM17-/- (B) aktywowanych LPS-em. Komórki preinkubowano z badanymi aptamerami, wyjściową pulą RNA lub inhibitorami metaloproteaz: GM6001 lub GI254023X, a następnie stymulowano uwalnianie TNF przez szedazy stosując PMA lub jonomycynę. Kontrola DMSO + LPS – pożywka hodowlana znad komórek aktywowanych LPS-em, zawierająca objętość DMSO równą końcowej objętości inhibitorów GM6001 i GI254023X; kontrola + LPS – pożywka hodowlana znad komórek aktywowanych LPS-em; kontrola – pożywka hodowlana znad komórek nieaktywowanych LPS-em. Przedstawiony wynik oraz odchylenia standardowe to średnia z trzech niezależnych eksperymentów, w których każda próbka to tryplikat. Za pomocą gwiazdek przedstawiono istotność statystyczną: * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$.

Figura 8 przedstawia analizę poziomu uwalniania mysiego receptora dla IL-6 (IL-6R) w komórkach RAW264.7 (A i B) oraz RAW264.7-ADAM17-/- (C). Komórki preinkubowano z badanymi aptamerami, wyjściową pulą RNA lub inhibitorami metaloproteaz: GM6001 lub GI254023X, a następnie stymulowano uwalnianie TNF przez szedazy stosując PMA (dwugodzinna inkubacja) lub jonomycynę (półgodzinna inkubacja). Kontrola DMSO – pożywka hodowlana zawierająca objętość DMSO równą końcowej objętości inhibitorów GM6001 i GI254023X, kontrola – pożywka hodowlana. Przedstawiony wynik to średnia z trzech niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w tryplikatach wraz z odchyleniami standardowymi. Za pomocą gwiazdek przedstawiono istotność statystyczną: *** – $p < 0,001$.

Figura 9 przedstawia analizę bioinformatyczną aptameru A10.a.1. A – struktura drugorzędowa aptameru A10.a.1 wygenerowana za pomocą programu mFold v 2.3. B – struktura drugorzędowa aptameru A10.a.1 pozbawionego regionu stałego na końcu 5'. Podano wartości AG tworzenia zaprezentowanych struktur, kolorem jasnoszarym zaznaczono wspólny element strukturalny dla pełnej oraz skróconej wersji aptameru A10.a.1 oraz kolorem ciemnoszarym powstałe w jego obrębie pętle. C – Symulacja struktury trzeciorzędowej aptameru A10.a.1 wykonana za pomocą serwera internetowego SimRNAweb.

Przykłady

W toku prowadzonych badań, do wyodrębnienia aptamerów RNA specyficznych względem białka ADAM10, zastosowano zmodyfikowany sposób SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) wykorzystujący żywe komórki (cell-SELEX). Prowadzono selekcję pozytywną – na komórkach wykazujących ekspresję białek ADAM oraz selekcję negatywną – na komórkach pochodzących z myszy z nokautem *Adam10* lub *Adam17*.

Po kilkunastu rundach selekcyjnych otrzymano szereg aptamerów RNA, których cDNA zsekwencjonowano. Aby scharakteryzować aktywność aptamerów, otrzymano rekombinowane, aktywne proteolitycznie ektodomeny białek ADAM10 oraz ADAM17 wykorzystując system bakulowirusowy. Oczyszczone proteazy pozwoliły na analizę specyficzności uzyskanych aptamerów, analizę aktywności inhibitory (IC₅₀) aptamerów w stosunku do reakcji proteolizy syntetycznego substratu.

Analizowano również specyficzność inhibitorową aptamerów w stosunku do białek ADAM10 i ADAM17 w ich naturalnym środowisku błony komórkowej. Badano wpływ aptamerów na migrację komórek mysiego czerniaka B16F10 promowaną przez białka ADAM oraz na uwalnianie naturalnych substratów enzymów ADAM: TNF-u oraz receptora IL-6 z powierzchni komórek linii monocytarno-makrofagowej RAW264.7 oraz B16F10 typu dzikiego oraz takich, które pozbawiono ekspresji *Adam17* sposobami edycji genomu (TALEN w B16F10 i CRISPR/Cas9 w RAW264.7).

Dla sekwencji aptameru A10.a.1 przeprowadzono także symulację tworzenia struktur drugo- i trzeciorzędowych z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych.

Przykład 1

Selekcja aptamerów RNA pod kątem otrzymania aptamerów anty-ADAM10 i anty-ADAM17 za pomocą sposobu cell-SELEX

Przeprowadzono dwie niezależne selekcje aptamerów RNA za pomocą sposobu cell-SELEX mających na celu: (i) otrzymanie aptamerów anty-ADAM10, z wykorzystaniem mysich linii komórek: MEF [8] (selekcja pozytywna) i MEF-ADAM10-/- [8] (selekcja negatywna) oraz (ii) aptamerów anty-ADAM17, przy wykorzystaniu mysich linii komórek MEF, P388D1 (mysia linia monocytarno-makrofagowa (American Type Culture Collection, CCL-46™) (obie linie używane w selekcji pozytywnej) oraz MEF-ADAM17-/- [9] (selekcja negatywna). Sposób cell-SELEX prowadzono według opublikowanego protokołu [79, 80], wykorzystując bibliotekę aptamerów opisaną przez Ulricha i wsp. [79, 80], z tą różnicą, że zamiast frakcji mikrosomalnych wykorzystano całe, żywe komórki. Selekcje prowadzono według schematu przedstawionego na Figurze 1.

Pokrótce, pozytywne rundy selekcyjne przeprowadzane były w następujący sposób:

Pulę RNA, poddawano selekcji na komórkach P388D1 lub MEF. 15 µg RNA (≈ 1 nmol) mieszano z buforem CSB (roztwór wodny zawierający: 25 mM HEPES pH 7,4, 145 mM NaCl, 5,3 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1,7 mM MgCl₂, 30 µM ZnCl₂) do końcowej objętości 91 µl i denaturowano (65°C, 10 min). Bufor sporządzono z odczynników firmy Bioshop. Do roztworu dodawano 9 µl drożdżowego tRNA (Life Technologies) o stężeniu 20 mg/ml i całość inkubowano (RT, 10 min), aby cząsteczki RNA przyjęły struktury trzeciorzędowe. Komórki P388D1 lub MEF przepłukiwano dwukrotnie PBS-em (Lonza) o temperaturze 4°C, i uwalniano z szalki ($\Phi = 10$ cm) silnym strumieniem PBS-u. Komórki wirowano (200 x g, 5 min, 20°C), zawieszano w 500 µl buforu CSB (w zależności od rundy selekcyjnej liczba komórek mieściła się w zakresie od 1×10^6 do 1×10^7) i mieszano z przygotowaną pulą RNA. Mieszaninę inkubowano przez 45 min w 37°C ratując (20 rpm). Następnie komórki płukano buforem CSB (po 500 µl) – w zależności od stosowanej presji selekcyjnej liczba płukań wahała się od 2 do 7, a zawieszone komórki za każdym razem zbierano poprzez wirowanie (800 x g, 2 min, 20°C). Po ostatnim płukaniu komórki zawieszano w 1 ml buforu CSB. Z komórek izolowano niskocząsteczkowe RNA za pomocą zestawu PureLink® miRNA Isolation Kit (Invitrogen), który umożliwia wzbogacenie oczyszczonego RNA w cząsteczki o wielkości poniżej 100 nukleotydów.

Negatywne rundy selekcyjne przeprowadzano za pomocą sposobu opisanego poniżej:

Pulę RNA uzyskaną po kilku rundach selekcji pozytywnych, poddawano selekcji negatywnej. Polegała ona na inkubacji cząsteczek RNA z komórkami mysich fibroblastów pozbawionymi ekspresji targetowanej metaloproteazy – ADAM10 lub ADAM17. Komórki te powinny wiązać aptamery oddziałujące z wszystkimi powierzchniowymi cząsteczkami fibroblastów poza białkami, odpowiednio, ADAM10 lub ADAM17.

Komórki (w tym przypadku MEF-ADAM10-/- i MEF ADAM17-/-) oraz pulę RNA przygotowywano w ten sam sposób jak do selekcji pozytywnej, opisaną powyżej. Liczba wykorzystywanych komórek MEF-ADAM10-/- i MEF-ADAM17-/- zmieniała się w kolejnych rundach selekcji od 2×10^6 do 2×10^7 . Po 30- lub 45-minutowej inkubacji komórek MEF-ADAM10-/- lub MEF-ADAM17-/- z pulą RNA (37°C, rotacja: 20 rpm), komórki wirowano (800 x g, 2 min, 25°C). Cząsteczki RNA, które nie związały się do komórek pozbawionych ekspresji targetowanej metaloproteazy denaturowano (65°C, 10 min), dodawano do nich drożdżowy tRNA do końcowego stężenia 0,3 mg/ml i inkubowano przez 10 min w 37°C. Tak przygotowaną pulę RNA używano do selekcji pozytywnej na komórkach MEF lub P388D1 opisaną wyżej.

W celu uzyskania aptamerów rozpoznających ADAM10 przeprowadzono 3 rundy selekcji pozytywnej (komórki MEF) i 11 rund selekcji negatywno-pozytywnej (komórki MEF i MEF ADAM10-/-).

W celu otrzymania aptamerów rozpoznających ADAM17 przeprowadzono 5 rund pozytywnych z wykorzystaniem komórek P388D1, 5 rund pozytywnych z wykorzystaniem komórek MEF oraz 8 rund negatywno-pozytywnych z wykorzystaniem komórek MEF i MEF ADAM 17-/-.

Aptamery anty-ADAM10

Po 14 rundach selekcyjnych zaprojektowanych w celu otrzymania aptamerów RNA anty-ADAM10, przeprowadzono analizę sekwencji aptamerów za pomocą programu ClustalX [81]. Do dalszych badań wybrano sekwencje będące reprezentantami 4 najliczniejszych grup (A10.a.1, A10.b.2, A10.c.4, A10.d.6), których sekwencje zamieszczono poniżej w Tabeli 1.

Tabela 1 Zestawienie sekwencji aptamerów RNA wyselekcjonowanych za pomocą sposobu cell-SELEX jako aptamery anty-ADAM10. Regiony stałe aptamerów zostały przedstawione za pomocą pogrubionej czcionki, natomiast regiony zmienne zostały podkreślone.

Nazwa aptameru	Sekwencja aptameru
A10.a.1 (SEQ ID NO 1)	GGGAGAAUUCAACUGCCAUCUAGCGUGAUUCGCUACUUGGCCGUU GCAGGGCCUGACACUACAAGCUUCUGGACUCGGU
A10.b.2 (SEQ ID NO 2)	GGGAGAAUUCAACUGCCAUCUAGACUGAUGGUCUAUUUCAGCAGUA UUGAAUCGGAUGCUUGACUACAAGCUUCUGGACUCGGU
A10.c.4 (SEQ ID NO 3)	GGGAGAAUUCAACUGCCAUCUAGUCGCCAGUUUGUGGACAGACUACU UCGCACGUUGAACUACAAGCUUCUGGACUCGGU
A10.d.6 (SEQ ID NO 4)	GGGAGAAUUCAACUGCCAUCUAGACUGAUAGUCUACUUCGCACGUUG AUAAGGUCUCUCGGGAGCACUACAAGCUUCUGGACUCGGU

Otrzymane aptamery zostały poddane testom mającym na celu sprawdzenie ich specyficzności wiązania się do białka ADAM10 i ADAM17 (patrz Przykład 2).

Przykład 2

Zdolność wyselekcjonowanych aptamerów RNA do oddziaływania z ektodomenami białek ADAM10 (meADAM10_mFc) i ADAM17 (meADAM17_mFc)

Otrzymano i oczyszczono aktywne enzymatycznie, rekombinowane ektodomeny mysich białek ADAM10 (meADAM10_mFc) i ADAM17 (meADAM17_mFc) w systemie bakulowirusowym BaculoDirect (Life Technologies) jako narzędzie dla potwierdzenia specyficznego oddziaływania aptamerów z ich celami oraz zbadania ich właściwości inhibitorowych. Produkcję białek prowadzono zgodnie z zamieszczoną instrukcją producenta. Pokróćce, białka produkowane były w komórkach owadzych SF9 (owadzia linia komórkowa pochodząca ze *Spodoptera frugiperda* (Life Technologies)) transformowanych za pomocą bakulowirusa zawierającego sekwencje DNA kodujące białka meADAM10_mFc lub meADAM17_mFc. Hodowle komórek SF9 zakażonych odpowiednim bakulowirusem prowadzono w zawieszynie przy ciągłym wytrząsaniu z szybkością 140 rpm w 27°C w pożywce ESF 921 (ExpressionSystems). Dzięki temu, że białka fuzyjne zawierające ektodomeny białek ADAM miały też fragment Fc mysich immunoglobulin można było oczyścić je w jednostopniowej procedurze wykorzystując chromatografię powinowactwa na złożu Protein G Sepharose 4 Fast Flow – GE Healthcare Life Sciences. Pożywki po hodowli komórek owadzych Sf9 zainfekowanych odpowiednimi wektorami bakulowirusowymi schłodzono na lodzie i zwirowano (10 000 x g, 5 min, 4°C). Nadsącz zbuforowano przez dodanie buforu BFN 10x (bufor fosforanowy 1 M, NaCl 1,5M, pH – 7,4; odczynniki pochodzące z firmy Bioshop) (1/9 objętości otrzymanego nadsączy) i dodano do niego fenantrolinę z firmy Life Technologies (końcowe stężenie: 1 mM) i PMSF z firmy Life Technologies (końcowe stężenie: 1 mM). Preparat przesączono przez filtr (porowatość 0,45 µm). Rozdział chromatograficzny prowadzono zgodnie z sposobem opisanym w [82]. Próbkę białka nakładano z szybkością 0,5 ml/min w temperaturze 4°C. Niezwiązane białka wymywano buforem BFN, a białka fuzyjne eluowano 0,1 M wodnym roztworem kwasu cytrynowego z firmy Bioshop (pH 2,0) i eluaty natychmiast neutralizowano 2 M wodnym roztworem TRIS (firma Bioshop). Frakcje zawierające białko połączono i dializowano (przepuszczalność membrany < 10 kDa) do 20 mM wodnego roztworu buforu Tris-HCl pH 7,4 z dodatkiem 150 mM NaCl (Bioshop). W otrzymanym preparacie oznaczano stężenie białka sposobem BCA wykorzystując albuminę (Bioshop) jako standard według sposobu opisanego w [83].

Wyselekcjonowane aptamery A10.a.1, A10.b.2, A10.c.4, A10.d.6, A17.e.5, A17f.7 i A17.g.3 analizowano pod kątem ich zdolności do oddziaływania z białkami meADAM10_mFc i meADAM17_mFc wykorzystując test ELONA. W celu zaadaptowania otrzymanych aptamerów RNA tego testu, konieczne było ich wyznakowanie na jednym z końców cząsteczką biotyny. W tym celu wykorzystano zestaw 5'EndTag™ Nucleic Acid Labeling System (Vector Laboratories) stosując protokół dostarczony przez producenta. Do opłaszczania płytek wykorzystano białka meADAM10_mFc lub meADAM17_mFc lub BSA – stanowiącą kontrolę negatywną (wszystkie w stężeniu 10 µg/ml w buforze boranowym pH 8,4). Inkubację białek prowadzono przez noc w 4°C. Wolne miejsca na powierzchni dołków blokowano 3% roztworem BSA w PBS (1 h, 37°C). Następnie do dołków nałożono próbki zbiotynylowanych aptamerów (1 µg/ml PBS). Inkubację prowadzono przez 2 h w 37°C. Po przepłukaniu płytek (5x, 200 µl PBS) związane aptamery wykrywano roztworem streptawidyny-HRP firmy R&D numer katalogowy DY998 (1:500 w 0,5% BSA/PBS, 45 min w 37°C). Aktywność HRP oznaczano wykorzystując odczynniki TMB Substrate Reagent Set (BD OptEIA) i mierząc absorbancję ($\lambda = 450$ nm) z wykorzystaniem czytnika mikropłytek UV-VIS VersaMax (Molecular Devices).

Wyniki wskazały na otrzymanie sześciu sekwencji o bispecyficznym charakterze oraz jednej (A10.a.1), która specyficznie wiąże meADAM10_mFc. Otrzymane wyniki przedstawiono na Figurze 2.

Przykład 3

Właściwości inhibitorowe aptamerów RNA względem metaloproteaz meADAM10_mFc, meADAM17_mFc i meADAM9

W celu sprawdzenia właściwości inhibitorowych otrzymanych aptamerów RNA, przeprowadzono test, w którym badano aktywność w stosunku do syntetycznego, wrażliwego peptydu pochodzącego z proTNF, po ich wcześniejszej inkubacji z badanymi aptamerami RNA. Intensywność fluorescencji, pojawiającej się w wyniku zniesienia jej wygaszania w substracie, odzwierciedla ilość uwolnionego produktu, będącą miarą aktywności enzymatycznej białek ADAM.

Aktywność enzymatyczną rekombinowanych meADAM10_mFc i meADAM17_mFc a także meADAM9 (pochodzący z firmy R&D) w obecności lub bez dodatku testowanych aptamerów oznaczano wykorzystując fluoroforogenny substrat Mca-P-L-A-Q-A-V-Dpa-R-S-S-S-R-NH₂ (Fluorogenic Peptide Substrate III firmy R&D). Jest to peptyd zawierający fluorescencyjną grupę kumaryno-7-metoksyową zlokalizowaną w Mca (amid kwasu kumaryno-7-metoksy-4-karboksylowy). Emitowana fluorescencja jest wygaszana poprzez rezonansowy transfer energii na grupę 2,4-dinitrofenylową w Dpa (N-3-(2,4-dinitrofenylo)-L-2,3-diaminopropionian). Sekwencja peptydu odpowiada fragmentowi pro-hTNF (Pro⁷²-Arg⁸²) rozpoznawanego przez ADAM9, ADAM10 i ADAM17 i zawierającego wiązanie peptydowe Ala-Val hydrolizowane przez te enzymy. Hydroliza tego wiązania znosi wygaszanie fluorescencji, a więc wywołuje wzrost fluorescencji. Stężenia enzymów w teście dobrano eksperymentalnie i wynosiły one dla meADAM9 – 80 nM, meADAM10_mFc – 40 nM, a dla meADAM17_mFc – 4 nM.

Przed eksperymentem badane aptamery lub pulę aptamerów RNA przed selekcją denaturowano w 65°C przez 10 min, a następnie schładzano do temperatury pokojowej przez 10 min. Następnie przeprowadzano preinkubację białek meADAM9, meADAM10_mFc lub meADAM17_mFc z badanymi aptamerami (1 µM) lub pulą aptamerów RNA przed selekcją (1 µM). Kontrolą negatywną testu zahamowania aktywności białek ADAM była woda dodana w takiej samej objętości jak badane aptamery. Objętość całkowita każdej mieszaniny wynosiła 50 µl. Preinkubację prowadzono w dołkach płytki 96-dołkowej do pomiarów fluorescencji w termomikserze firmy Eppendorf (37°C, 45 min, 500 rpm), a następnie do każdej mieszaniny dodawano 50 µl substratu (5 µM; stężenie dobrane eksperymentalnie) rozpuszczonego w buforze FPS (roztwór wodny składający się z: 25 mM tris-HCl pH 9; 2,5 µM ZnCl₂; 0,005% w/o Brij-35; odczynniki pochodziły z firmy Bioshop)). Intensywność fluorescencji produktu mierzono podczas jednogodzinnej inkubacji w 37°C, w czytniku do mikropłytek Synergy H1 (BioTek), stosując następujące ustawienia: wzbudzenie $\lambda = 320$ nm, emisja $\lambda = 405$, pomiar odgórny. Wyniki doświadczenia wskazały, że A10.a.1 specyficznie hamuje aktywność ADAM10. Żaden z aptamerów nie hamuje aktywności ADAM9. Wyniki przedstawiono na Figurze 3.

Do wyznaczenia parametru IC₅₀ wykorzystano zmienne stężenia aptamerów wykonane metodą seryjnych rozcieńczeń w zakresie od 2 µM do 1 nM. Preinkubację prowadzono w dołkach płytki 96-dołkowej do pomiarów fluorescencji w termomikserze (37°C, 45 min, 500 rpm), a następnie do każdej mieszaniny dodawano 50 µl substratu (5 µM; stężenie dobrane eksperymentalnie) rozpuszczonego w buforze FPS. Intensywność fluorescencji produktu mierzono podczas jednogodzinnej inkubacji w 37°C, w czytniku do mikropłytek Synergy H1 (BioTek), stosując następujące ustawienia: wzbudzenie $\lambda = 320$ nm, emisja $\lambda = 405$, pomiar odgórny. Na podstawie otrzymanych danych wykreślono krzywą

zależności intensywności fluorescencji produktu od stosowanego stężenia aptameru dzięki czemu wyznaczono parametr IC₅₀ [84]. Wyniki opracowano przy wykorzystaniu programu GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software). Dla trzech aptamerów-inhibitorów, wyznaczono następujące wartości parametru IC₅₀ czyli stężenia aptamerów potrzebnego do połowicznego zahamowania aktywności enzymatycznej. Otrzymano następujące wartości:

- w stosunku do meADAM10_mFc: A10.a.1 – 32 nM, A10.d.6 – 118 nM, A17.e.5 – 131 nM
 - w stosunku do meADAM17_mFc: A10.a.1 – >1000 nM, A10.d.6 – 227 nM, A17.e.5 – 188 nM.
- Otrzymane wyniki przedstawiono na Figurze 4.

Przykład 4

Wpływ aptamerów A10.a.1, A10.d.6 i A17.e.5 na linie komórek B16F10 oraz B16F10-ADAM17-/-.

W celu potwierdzenia skuteczności działania aptamerów A10.a.1, A10.d.6 i A17.e.5 w układzie biologicznym, otrzymano nową linię komórek: B16F10-ADAM17-/- (z zastosowaniem sposobu edycji genomu TALEN zgodnie z zaleceniami twórców metody [85, 86] przy wykorzystaniu zestawu plazmidów pC-GoldyTALEN [87] i Golden Gate TALEN [88]).

Linia komórek B16F10-ADAM17-/- powstała poprzez zastosowanie sposobu TALEN (rozpoznawane sekwencje przez białka TALEN znajdowały się w egzonie 2 genu *Adam17*: 5'TGATTCTTT-GCTCTCA3' – nić sensowna i 5'GAATCGATTATAAGTCG3' – nić antysensowna) za pomocą, którego wprowadzone zostały mutacje polegające na delecji 28 nukleotydów w pozycji 314–341 w jednym allelu oraz insercji GG pomiędzy 327 a 328 nukleotydem w drugim allelu w egzonie 2 genu *Adam17*.

Przeprowadzono test sprawdzający wpływ otrzymanych aptamerów RNA na migrację komórek B16F10. Pokróćce, komórki B16F10 lub B16F10-ADAM17-/- wysiewano w ilości 1x10⁵ na dołek płytki dwunastodołkowej w pożywce hodowlanej (1 ml) zawierającej 2% FBS. Po zaadherowaniu komórek do powierzchni płytki (ok. 3 h) dodawano badane RNA, inhibitory (kontrolę pozytywną) lub odpowiednie rozpuszczalniki (kontrolę odczynnikową). Opis testowanych odczynników wraz z podaniem stosowanych stężeń zebrano w Tabeli 3 poniżej.

Tabela 3. Zestawienie testowanych odczynników (wraz ze stężeniami) wykorzystywanych przy badaniu wpływu aptamerów RNA na aktywność biologiczną ADAM10 i ADAM17.

Rodzaj odczynnika	Testowany odczynnik
badane RNA	aptamery RNA (250 µM)
	pula aptamerów przed selekcją (250 µM) - kontrola negatywna
inhibitory	GM6001 (25 µM) – kontrola pozytywna, firma Life Technologies
	GI254023X (20 µM) – kontrola pozytywna, firma Life Technologies
roztwarzalniki	bufor CSB – dodana objętość: taka sama jak testowanych RNA
	DMSO ¹ – dodana objętość: taka sama jak GM6001 i GI254023X; DMSO z firmy Bioshop

¹końcowe stężenie DMSO nigdy nie przekraczało 0,1%.

Testowane RNA wstępnie denaturowano (10 min, 65°C), a następnie, aby umożliwić im przyjęcie natywnej struktury, inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej. Po 48 h w monowarstwie komórek wykonywano zadrapanie („ranę”) żółtą końcówką od pipety automatycznej, wskutek czego otrzymywano przerwę w monowarstwie komórek o szerokości ok. 0,3 mm. Monowarstwę przepłukiwano PBS-em, dodawano po 2 ml pożywki DMEM (Lonza) bez surowicy z dodatkiem tych samych substancji, w tych samych stężeniach, co podczas hodowli przed zranieniem (Tabela 3). Kilka konkretnych miejsc każdej z „ran” fotografowano w chwili rozpoczęcia eksperymentu (czas 0) i po 18 h. Zdjęcia w jasnym polu wykonano przy użyciu kamery DFC450C współpracującej z mikroskopem DM IL LED fluo (Leica Microsystems).

Powierzchnię zarośnięcia rany analizowano za pomocą programu TScratch. Program ten wyznacza granicę pomiędzy monowarstwą komórek, a pustą przestrzenią płytki i stosuje algorytm obliczający powierzchnię „rany” jako procent powierzchni zdjęcia [89]. Do obliczenia powierzchni zarośniętej przez migrujące komórki zastosowano poniższy wzór:

$$\text{powierzchnia zarośnięta przez komórki} = \frac{(\% 0 \text{ h} - \% 18 \text{ h}) \times 0,55 \text{ mm}^2}{100\%},$$

gdzie: % 0 h oraz % 18 h – powierzchnie rany w stosunku do powierzchni zdjęcia wyrażone w % w czasie 0 i po 18 h godzinach; 0,55 mm² – powierzchnia wykonanego zdjęcia o wymiarach 0,85 mm x 0,64 mm.

Wykazano, że aptamer A10.a.1, hamuje migrację komórek mysiego czerniaka B16F10 w teście zarastania rany. Wyniki przedstawiono na Figurze 5.

Komórki B16F10 oraz B16F10-ADAM17^{-/-} przejściowo transfekowano skonstruowanym, standardowymi metodami, plazmidem kodującym ludzką formę białka TNF – pcDNA3.1/zeo(-)_EGFP-hTNF-TdTOMATO. W ten sposób komórki te otrzymały zdolność do ekspresji substratu ADAM10 i ADAM17, którym jest TNF.

In vivo TNF jest substratem przede wszystkim dla ADAM17. Stymulacja komórek *in vitro* przez PMA powoduje szybkie uwalnianie rozpuszczalnej formy TNF dzięki aktywacji ADAM17.

Stymulacja komórek *in vitro* jonomycyną wywołuje podobny efekt jak PMA, natomiast w tym przypadku za uwalnianie TNF odpowiedzialny jest ADAM10. Stosowanie odpowiednich induktorów pozwala rozróżnić aktywność białek ADAM w stosunku do badanego, wspólnego substratu.

Po 96 h po transfekcji komórki B16F10 lub B16F10-ADAM17^{-/-} wysiano na płytce 96-dołkowej (2x10⁴/w 100 µl pożywki na dołek). Po 24 h zmieniono pożywkę na bezsurowiczą i inkubowano komórki z badanymi aptamerami lub inhibitorami (w takich samych zakresach stężeń i z takimi samymi kontrolami jak opisano w Przykładzie 4, Tabela 3) przez 1 h, a następnie zmieniono pożywkę na PBS lub PBS zawierający: PMA (100 ng/ml) z firmy Life Technologies lub jonomycynę (500 ng/ml) z firmy Life Technologies lub taką samą objętość DMSO. Po 30 min inkubacji, zbierano PBS z nad komórek, wirowano i w nadsączach oznaczano stężenie hTNF stosując sposób ELISA opracowany w Zakładzie Biochemii Komórki UJ wykorzystujący własne przeciwciała monoklonalne i poliklonalne. Pokrótce, test przeprowadzono zgodnie ze standardowym protokołem [90] używając do opłaszczania płytek szczurzych poliklonalnych immunoglobulin anti-hTNF (2 µg/ml w buforze boranowym pH 8,4), a do detekcji – biotynylowanych, mysich, monoklonalnych IgG (0,5 µg/ml w PBS/1% BSA) oraz roztworu streptawidyny sprzęgniętej z HRP (200x rozcieńczonej PBS/1% BSA, z firmy R&D). Do blokowania użyto 3% roztwór BSA w PBS-ie. Aktywność HRP oznaczano tak, jak opisano w Przykładzie 2. Otrzymane wyniki przedstawiono na Figurze 6.

Otrzymane wyniki wskazują na możliwość zahamowania aktywności ADAM10 jako szedazy TNF-u, przez aptamer A10.a.1.

Przykład 5

Wpływ badanych aptamerów RNA na uwalnianie substratu szedaz – TNF, z powierzchni mysich komórek RAW264.7 oraz RAW264.7-ADAM17^{-/-}

W celu potwierdzenia skuteczności działania aptameru A10.a.1, w układzie biologicznym, otrzymano drugą nową linię komórek: RAW264.7-ADAM17^{-/-} za pomocą sposobu edycji genomu CRISPR/Cas9 [91]).

Komórki RAW264.7-ADAM17^{-/-} otrzymane za pomocą sposobu CRISPR/Cas9 (targetowano sekwencję w obrębie egzonu 2 genu *Adam17*: 5'GTGCTGCTGAATATTAGCTAAGG3') posiadają w obrębie egzonu 2 genu *Adam17* dwie delecje: w jednym allelu 7-nukleotydową w pozycji od 340 do 346 genu *Adam17* oraz w drugim allelu – 4-nukleotydową w pozycji od 343 do 346.

Wykazano, że testowane aptamery hamują uwalnianie substratu szedaz – TNF-u, również z powierzchni mysich komórek RAW264.7. Wyniki, przedstawione na Figurze 7, potwierdziły specyficzność aptameru A10.a.1 w stosunku do ADAM10. Zahamowanie uwalniania mysiego TNF w komórkach RAW264.7 za pomocą otrzymanych aptamerów RNA mierzono wykorzystując test ELISA oceniający stężenie rozpuszczalnej formy TNF w pożywce hodowlanej. Pokrótce, komórki linii RAW264.7 lub RAW264.7-ADAM17^{-/-} wysiewano na płytce 96-dołkowej (8x10⁴ komórek w 50 µl pożywki na dołek). Po 18 h zmieniano pożywkę na świeżą bezsurowiczą (50 µl) z dodatkiem LPS-u (50 ng/ml) oraz badanym

odczynnikiem według danych zebranych w Tabeli 3, Przykład 4. RNA uprzednio denaturowano i renaturowano jak opisano w Przykładzie 4. Po 3 h komórki przepłukiwano dwukrotnie PBS-em (100 μ l) i dodawano po 60 μ l bezsurowiczej pożywki zawierającej badany odczynnik (Tabela 3, Przykład 4) z tą różnicą, że do niektórych dołków dodawano aktywatorów białek ADAM17 i ADAM10, odpowiednio PMA (100 ng/ml) lub jonomycyny (500 ng/ml) lub taką samą objętość DMSO (rozpuszczalnik PMA i jonomycyny). Inkubację prowadzono przez 45 min, po czym pożywki z nad komórek zbierano i wirowano (250 x g, 5 min, RT). W nadszczach oznaczano stężenie mTNF sposobem ELISA wykorzystując komercyjny zestaw odczynników (Mouse TNF-alpha DuoSet ELISA, R&D) i postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Aktywność HRP, z którą były sprzęgnięte przeciwciała detekcyjne oznaczano wykorzystując odczynniki TMB Substrate Reagent Set (BD OptEIA) i mierząc absorbancję (λ = 450 nm). Wyniki przedstawiono na Figurze 7.

Przykład 6

Wpływ wybranych aptamerów na poziom uwalniania receptora IL-6 z powierzchni mysich komórek RAW264.7 oraz RAW264.7-ADAM17-/-

Wynik zahamowania migracji komórek przez aptamery sugerował, że aktywność inhibitorowa aptamerów nie ogranicza się do hamowania proteolizy TNF, jednak postanowiono zweryfikować tę hipotezę badając ich wpływ na uwalnianie innego substratu obu szedaz – receptora IL-6 (IL-6R). Aby potwierdzić hamujący wpływ wybranych aptamerów na poziom jego uwalniania, przeprowadzono test, w którym komórki RAW264.7 i RAW264.7-ADAM17-/- stymulowano PMA lub jonomycyną. Pokróćce, Komórki linii RAW264.7 lub RAW264.7-ADAM17-/- wysiewano na płytki 96-dołkowe (1x10⁵ komórek w 50 μ l pożywki na dołek). Po 18 h zmieniano pożywkę na świeżą bezsurowiczą (50 μ l) z dodatkiem badanego odczynnika według danych zebranych w Tabeli 3, Przykład 4. RNA uprzednio denaturowano i renaturowano jak opisano w Przykładzie 4. Po 1 h inkubacji, komórki przepłukiwano dwukrotnie PBS-em (100 μ l) i dodawano po 60 μ l bezsurowiczej pożywki lub bezsurowiczej pożywki zawierającej aktywatory PMA (100 ng/ml) lub jonomycynę (500 ng/ml) lub bezsurowiczej pożywki z dodatkiem DMSO o objętości takiej samej jak jonomycyny lub PMA. Pożywki z dołków zawierających jonomycynę i odpowiednie kontrole zbierano po 30 min inkubacji, natomiast zawierające PMA i odpowiednie kontrole po 2 h inkubacji. Pożywki z nad komórek wirowano (250 x g, 5 min, RT), a następnie oznaczano stężenie rozpuszczalnej formy receptora IL-6 za pomocą testu ELISA wykorzystując zestaw Mouse IL-6R-alpha DuoSet ELISA (R&D). Odstępstwem od protokołu załączonego przez producenta były zredukowane o połowę (do 50 μ l) objętości wykorzystywanych przeciwciał oraz próbek a także standardów do krzywej. Analizę tego sposobu ELISA prowadzono tak samo, jak opisano dla Przykładu 5 a wyniki przedstawia Figura 8.

Pomiar poziomu uwalniania rozpuszczalnej formy receptora dla IL-6 potwierdził inhibitorowy charakter aptameru A10.a.1, w stosunku do białka ADAM10.

Przykład 7

Modele struktur drugo- i trzeciorzędowych wybranych aptamerów RNA

Dla aptameru-inhibitora przeprowadzono symulacje bioinformatyczne, których efektem są modele struktur drugo- i trzeciorzędowych, wyznaczonych za pomocą programów, odpowiednio mFold [92] oraz SimRNAweb [93]. Analiza wygenerowanych struktur drugorzędowych pozwoliła również na wyznaczenie wartości energii swobodnej Gibbsa, określającej możliwość spontanicznego tworzenia przedstawionych struktur dla wszystkich trzech aptamerów. Otrzymane wyniki ΔG w granicach -15 – 20 kcal/mol wskazują, że tworzone struktury są bardzo stabilne.

Symulacja struktury drugorzędowej aptameru A10.a.1 została wygenerowana dla stałej temperatury fałdowania równej 37°C (Fig. 9A). W obrębie otrzymanej architektury zidentyfikowano dwie pętle: (i) pętla utworzona pomiędzy długim (14-nukleotydowym) oraz krótkim (6-nukleotydowym) odcinkiem helikalnym (A₁₈UCU₂₁A₃₅CUU₂₉) z których A₁₈ i U₂₉ oraz U₂₁ i A₃₅ zamykają pętlę tworząc pary zasad stabilizowane wiązaniami wodorowymi, (ii) pętla utworzona na końcu krótkiego, sześcienukleotydowego odcinka helikalnego, w skład której wchodzi 7 nukleotydów G₂₅UGAUUC₃₁, z których pętlę zamykają G₂₅ i C₃₁ tworzące parę nukleotydową stabilizowaną wiązaniami wodorowymi. Przeprowadzono również symulację struktury aptameru A10.a.1 pozbawionego sekwencji ACUACAAGCUUCUGGACUCGGU na końcu 5' wchodzącej w skład regionu stałego. Zabieg ten spowodował utworzenie struktury wykazującej bardzo duże podobieństwo do motywu opisanego dla aptameru A10.a.1 o pełnej długości (Fig. 9B).

Obie wygenerowane struktury drugorzędowe cechują podobne wartości energii swobodnej Gibbsa ΔG = -18,9 kcal/mol i ΔG = -18,0 kcal/mol, określającej możliwość spontanicznego tworzenia

przedstawionych struktur. Wyniki te sugerują, że zaznaczony na szaro motyw może brać udział w bezpośrednim oddziaływaniu z mysim białkiem ADAM10. Aby sprawdzić, czy zlokalizowany motyw aptameru nie jest angażowany w oddziaływanie z innymi elementami struktury trzeciorzędowej, przeprowadzono symulację fałdowania 3D dla aptameru A10.a.1 (Fig. 9C). Otrzymany wynik wykazał, że zidentyfikowany motyw aptameru A10.a.1 nie jest zasłaniany przez pozostałą część struktury.

Podsumowując otrzymane wyniki można stwierdzić, że struktury wszystkich analizowanych aptamerów są różne oraz tworzą motywy, które nie oddziałują z pozostałymi regionami aptamerów. Zidentyfikowane struktury mogą być odpowiedzialne za oddziaływanie z docelowymi białkami. Przeprowadzona *in silico* analiza struktur fragmentów zmiennych wybranych aptamerów wskazuje na to, że na ich tworzenie nie wpływa znacząco obecność części stałych. Jest to istotne, gdyż na ogół w analizach *in vivo* wykorzystuje się jedynie fragmenty zmienne specyficznie oddziałujące z celem.

W dalszej perspektywie badań konieczne będzie przeprowadzenie dodatkowych testów sprawdzających specyficzność oddziaływania oraz specyficzność inhibitorową otrzymanych aptamerów RNA względem innych białek z rodziny ADAM oraz MMP.

Otrzymany aptamer powinien być poddany modyfikacjom chemicznym polegającym na przyłączeniu cząsteczki/cząsteczek PEG do końca 3' lub 5' sekwencji aptameru, co zwiększy jego masę cząsteczkową. Zabieg ten z jednej strony poprawi parametry farmakokinetyczne (zmniejszenie klirensu nerkowego) aptameru a z drugiej zwiększy jego stabilność. Po przeprowadzeniu tego typu modyfikacji możliwe będzie sprawdzenie właściwości otrzymanego aptameru RNA w warunkach *in vivo*. Badania tego typu dadzą odpowiedź na temat możliwości stosowania prezentowanego wynalazku w terapiach chorób o podłożu chronicznych stanów zapalnych oraz chorób nowotworowych. Konieczne będzie także sprawdzenie właściwości inhibitorowych aptamerów RNA w stosunku do ludzkiego białka ADAM10.

Opisany aptamer RNA posiada również potencjał diagnostyczny. Po przyłączeniu odpowiedniego znacznika (fluoroforu, izotopu itp.) możliwe będzie jego wykorzystanie jako molekularnej sondy stosowanej w pracy laboratoryjnej oraz diagnostyce medycznej. Ciekawym pomysłem może być stworzenie detektorów wykorzystujących zjawisko FRET lub wygaszanie fluorescencji. Jeśli w obrębie struktury aptameru dochodzi do znaczących zmian przestrzennych generowanych związaniem do białka ADAM10, to po przyłączeniu do końców 5' i 3' pary fluorofor-wygaszcz, można otrzymać sondę molekularną określaną jako „*molecular beacon*” [95].

Ponieważ w wielu typach nowotworów obserwuje się nadekspresję białka ADAM10, być może prezentowany aptamer będzie można wykorzystać jako narzędzie wspomagające dla oceny stopnia zaawansowania choroby lub określenia najlepszej strategii terapeutycznej.

Kolejnym potencjalnym zastosowaniem aptamerów może być stosowanie ich jako nośników leków w celowanej terapii.

LISTA SEKWENCJI

<120> Tytuł: Aptamer RNA hamujący aktywność proteolityczną mysiej metaloproteazy ADAM10

<130> 32672/17

Sekwencja

<213> Sekwencja sztuczna

<400>

gggagaaauuc aacugccauc uagcgugauu cgcuaauug gccguugcag ggccugacac	60
uacaagcuuc uggacucggu	80

<212> RNA

<211> 80

SEQ ID NO 1

Sekwencja

<213> Sekwencja sztuczna

<400>

gggagaaauuc aacugccauc uagacugaug gucuauuua gcaguauuga aucggaugcu	60
ugacuacaag cuucuggacu cggu	84

<212> RNA

<211> 84

SEQ ID NO 2

Sekwencja

<213> Sekwencja sztuczna

<400>

gggagaaauuc aacugccauc uagucgccag uuuguggaca gacuacuucg cacguugaac	60
uacaagcuuc uggacucggu	80

<212> RNA

<211> 80

SEQ ID NO 3

Sekwencja

<213> Sekwencja sztuczna

<400>

gggagaaauuc aacugccauc uagacugaua gucuacuucg cacguugaua aggucucucg 60

ggagcacuac aagcuucugg acucggu 87

<212> RNA

<211> 87

SEQ ID NO 4

Sekwencja

<213> Sekwencja sztuczna

<400>

gggagaaauuc aacugccauc uacagaugac cgguccuagu gaccuguccu auuuggaguu 60

gaacuacaag cuucuggacu cggu 84

<212> RNA

<211> 84

SEQ ID NO 5

Sekwencja

<213> Sekwencja sztuczna

<400>

gggagaaauuc aacugccauc uacaucguag aucgcucuug acucucgacu uuggguuugg 60

acacuacaag cuucuggacu cggu 84

<212> RNA

<211> 84

SEQ ID NO 6

Sekwencja

<213> Sekwencja sztuczna

<400>

```
gggagaauc aacugccauc uaggugaugg uggucucggu ucugucuugg uacuugacug      60
uuugucaacu acaagcuucu ggacucggu                                         89
```

<212> RNA

<211> 89

SEQ ID NO 7

Literatura:

- [1] Novak U. ADAM proteins in the brain. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2004; 11: 227–35.
- [2] Mullberg J, Rauch CT, Wolfson MF, Castner B, Fitzner JN, Otten-Evans C, et al. Further evidence for a common mechanism for shedding of cell surface proteins. *FEBS letters*. 1997; 401: 235–8.
- [3] Kiessling LL, Gordon EJ. Transforming the cell surface through proteolysis. *Chemistry & biology*. 1998; 5: R49–62.
- [4] Reiss K, Saftig P. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Seminars in cell & developmental biology*. 2009; 20: 126–37.
- [5] Vincent B, Paitel E, Saftig P, Frobert Y, Hartmann D, De Strooper B, et al. The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *The Journal of biological chemistry*. 2001; 276: 37743–6.
- [6] Fleck D, van Bebber F, Colombo A, Galante C, Schwenk BM, Rabe L, et al. Dual cleavage of neuregulin 1 type III by BACE1 and ADAM17 liberates its EGF-like domain and allows paracrine signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013; 33: 7856–69.
- [7] Fleck D, Voss M, Brankatschk B, Giudici C, Hampel H, Schwenk B, et al. Proteolytic Processing of Neuregulin 1 Type III by Three Intramembrane-cleaving Proteases. *The Journal of biological chemistry*. 2016; 291: 318–33.
- [8] Hartmann D, de Strooper B, Serneels L, Craessaerts K, Herreman A, Annaert W, et al. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Human molecular genetics*. 2002; 11: 2615–24.
- [9] Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. 1997; 385: 729–33.
- [10] Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, et al. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*. 1998; 282: 1281–4.
- [11] Drey Mueller D, Uhlig S, Ludwig A. ADAM-family metalloproteinases in lung inflammation: potential therapeutic targets. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2015; 308: L325–43.
- [12] Arribas J, Esselens C. ADAM17 as a therapeutic target in multiple diseases. *Current pharmaceutical design*. 2009; 15: 2319–35.
- [13] Isozaki T, Ishii S, Nishimi S, Nishimi A, Oguro N, Seki S, et al. A disintegrin and metalloprotease-10 is correlated with disease activity and mediates monocyte migration and adhesion in rheumatoid arthritis. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2015; 166: 244–53.
- [14] Zanotti S, Kumar A, Kumar A. Cytokine modulation in sepsis and septic shock. *Expert opinion on investigational drugs*. 2002; 11: 1061–75.
- [15] Aggarwal BB S, A., and Feldmann, M. In *Cytokine reference*. London: Academic Press; 2001.
- [16] Olsen N, Sokka T, Seehorn CL, Kraft B, Maas K, Moore J, et al. A gene expression signature for recent onset rheumatoid arthritis in peripheral blood mononuclear cells. *Annals of the rheumatic diseases*. 2004; 63: 1387–92.
- [17] Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1990; 33: 305–15.

- [18] Kallen KJ. The role of transsignalling via the agonistic soluble IL-6 receptor in human diseases. *Biochimica et biophysica acta*. 2002; 1592: 323–43.
- [19] Rose-John S. The soluble interleukin-6 receptor and related proteins. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2015; 29: 787–97.
- [20] Sack U, Kinne RW, Marx T, Heppt P, Bender S, Emmrich F. Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology international*. 1993; 13: 45–51.
- [21] Hashimoto H, Tanaka M, Suda T, Tomita T, Hayashida K, Takeuchi E, et al. Soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1998; 41: 657–62.
- [22] Audo R, Calmon-Hamaty F, Papon L, Combe B, Morel J, Hahne M. Distinct effects of soluble and membrane-bound fas ligand on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis & rheumatology*. 2014; 66: 3289–99.
- [23] Peng SL. Fas (CD95)-related apoptosis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2006; 45: 26–30.
- [24] Calmon-Hamaty F, Audo R, Combe B, Morel J, Hahne M. Targeting the Fas/FasL system in Rheumatoid Arthritis therapy: Promising or risky? *Cytokine*. 2015; 75: 228–33.
- [25] Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell*. 2012; 21: 309–22.
- [26] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646–74.
- [27] Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T, et al. L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *The Journal of cell biology*. 2005; 168: 633–42.
- [28] Blanchot-Jossic F, Jarry A, Masson D, Bach-Ngohou K, Paineau J, Denis MG, et al. Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells. *The Journal of pathology*. 2005; 207: 156–63.
- [29] Ding X, Yang LY, Huang GW, Wang W, Lu WQ. ADAM17 mRNA expression and pathological features of hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology*. 2004; 10: 2735–9.
- [30] Fogel M, Gutwein P, Mechtersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Smirnov A, et al. L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet*. 2003; 362: 869–75.
- [31] Karan D, Lin FC, Bryan M, Ringel J, Moniaux N, Lin MF, et al. Expression of ADAMs (a disintegrin and metalloproteases) and TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3) in human prostatic adenocarcinomas. *International journal of oncology*. 2003; 23: 1365–71.
- [32] Lendeckel U, Kohl J, Arndt M, Cari-McGrath S, Donat H, Rocken C. Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2005; 131: 41–8.
- [33] McCulloch DR, Akl P, Samaratunga H, Herington AC, Odorico DM. Expression of the disintegrin metalloprotease, ADAM-10, in prostate cancer and its regulation by dihydrotestosterone, insulin-like growth factor I, and epidermal growth factor in the prostate cancer cell model LNCaP. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Res* 32672 earch. 2004; 10: 314–23.
- [34] Ringel J, Jesnowski R, Moniaux N, Luttes J, Ringel J, Choudhury A, et al. Aberrant expression of a disintegrin and metalloproteinase 17/tumor necrosis factor-alpha converting enzyme increases the malignant potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer research*. 2006; 66: 9045–53.

- [35] Roemer A, Schwettmann L, Jung M, Roigas J, Kristiansen G, Schnorr D, et al. Increased mRNA expression of ADAMs in renal cell carcinoma and their association with clinical outcome. *Oncology reports*. 2004; 11: 529–36.
- [36] Wu E, Croucher PI, McKie N. Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997; 235: 437–42.
- [37] Yoshimura T, Tomita T, Dixon MF, Axon AT, Robinson PA, Crabtree JE. ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) messenger RNA expression in *Helicobacter pylori*-infected, normal, and neoplastic gastric mucosa. *The Journal of infectious diseases*. 2002; 185: 332–40.
- [38] Zhou BB, Peyton M, He B, Liu C, Girard L, Caudler E, et al. Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer. *Cancer cell*. 2006; 10: 39–50.
- [39] McGowan PM, McKiernan E, Bolster F, Ryan BM, Hill AD, McDermott EW, et al. ADAM-17 predicts adverse outcome in patients with breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2008; 19: 1075–81.
- [40] Franovic A, Robert I, Smith K, Kurban G, Pause A, Gunaratnam L, et al. Multiple acquired renal carcinoma tumor capabilities abolished upon silencing of ADAM17. *Cancer research*. 2006; 66: 8083–90.
- [41] Zheng Y, Saftig P, Hartmann D, Biobel C. Evaluation of the contribution of different ADAMs to tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) shedding and of the function of the TNFalpha ectodomain in ensuring selective stimulated shedding by the TNFalpha convertase (TACE/ADAM17). *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279: 42898–906.
- [42] Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Roessner A, Rocken C. The disintegrin-metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. *International journal of oncology*. 2005; 26: 17–24.
- [43] Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, et al. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *The Journal of cell biology*. 2004; 164: 769–79.
- [44] Sahin U, Blobel CP. Ectodomain shedding of the EGF-receptor ligand epigen is mediated by ADAM17. *FEBS letters*. 2007; 581: 41–4.
- [45] Horiuchi K, Zhou HM, Kelly K, Manova K, Blobel CP. Evaluation of the contributions of ADAMs 9, 12, 15, 17, and 19 to heart development and ectodomain shedding of neuregulins betal and beta2. *Developmental biology*. 2005;283:459-71.
- [46] Yan Y, Shirakabe K, Werb Z. The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *The Journal of cell biology*. 2002; 158: 221–6.
- [47] Ebbing EA, Medema JP, Damhofer H, Meijer SL, Krishnadath KK, van Berge Henegouwen MI, et al. ADAM10-mediated release of heregulin confers resistance to trastuzumab by activating HER3. *Oncotarget*. 2016; 7: 10243–54.
- [48] Weber S, Saftig P. Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Development*. 2012; 139: 3693–709.
- [49] Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001; 2: 127–37.
- [50] Appert-Collin A, Hubert P, Cremel G, Bennasroune A. Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. *Frontiers in pharmacology*. 2015; 6: 283.
- [51] Das S, Czarnek M, Bzowska M, Mezyk-Kopec R, Stalinska K, Wyroba B, et al. ADAM17 silencing in mouse colon carcinoma cells: the effect on tumoricidal cytokines and angiogenesis. *PloS one*. 2012; 7: e50791.

- [52] Zheng X, Jiang F, Katakowski M, Lu Y, Chopp M. ADAM17 promotes glioma cell malignant phenotype. *Molecular carcinogenesis*. 2012; 51: 150–64.
- [53] Rose AA, Annis MG, Dong Z, Pepin F, Hallett M, Park M, et al. ADAM10 releases a soluble form of the GPNMB/Osteoactivin extracellular domain with angiogenic properties. *PloS one*. 2010; 5: e12093.
- [54] Fiorentini C, Bodei S, Bedussi F, Fragni M, Bonini SA, Simeone C, et al. GPNMB/OA protein increases the invasiveness of human metastatic prostate cancer cell lines DU145 and PC3 through MMP-2 and MMP-9 activity. *Experimental cell research*. 2014; 323: 100–11.
- [55] Mezyk-Kopec R, Wyroba B, Stalinska K, Prochnicki T, Wiatrowska K, Kilarski WW, et al. ADAM17 Promotes Motility, Invasion, and Sprouting of Lymphatic Endothelial Cells. *PloS one*. 2015; 10: e0132661.
- [56] Liu PC, Liu X, Li Y, Covington M, Wynn R, Huber R, et al. Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer biology & therapy*. 2006; 5: 657–64.
- [57] Rio C, Buxbaum JD, Peschon JJ, Corfas G. Tumor necrosis factor- α -converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275: 10379–87.
- [58] Feldinger K, Generali D, Kramer-Marek G, Gijssen M, Ng TB, Wong JH, et al. ADAM10 mediates trastuzumab resistance and is correlated with survival in HER2 positive breast cancer. *Oncotarget*. 2014; 5: 6633–46.
- [59] Sardi SP, Murtie J, Koirala S, Patten BA, Corfas G. Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain. *Cell*. 2006; 127: 185–97.
- [60] Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews Cancer*. 2009; 9: 239–52.
- [61] Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ, et al. Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer research*. 2005; 65: 5278–83.
- [62] Coniglio SJ, Eugenin E, Dobrenis K, Stanley ER, West BL, Symons MH, et al. Microglial Stimulation of glioblastoma invasion involves epidermal growth factor receptor (EGFR) and colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) signaling. *Molecular medicine*. 2012; 18: 519–27.
- [63] Rego SL, Helms RS, Dreau D. Breast tumor cell TACE-shed MCSF promotes pro-angiogenic macrophages through NF- κ B signaling. *Angiogenesis*. 2014; 17: 573–85.
- [64] Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, et al. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell*. 1998; 94: 715–25.
- [65] Dumont N, Liu B, Defilippis RA, Chang H, Rabban JT, Karnezis AN, et al. Breast fibroblasts modulate early dissemination, tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics. *Neoplasia*. 2013; 15: 249–62.
- [66] Marsh T, Pietras K, McAllister SS. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochimica et biophysica acta*. 2013; 1832: 1070–8.
- [67] Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2006; 6: 392–401.
- [68] Lin EY, Li JF, Gnatovskiy L, Deng Y, Zhu L, Grzesik DA, et al. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer research*. 2006; 66: 11238–46.
- [69] Mezyk R, Bzowska M, Bereta J. Structure and functions of tumor necrosis factor- α converting enzyme. *Acta biochimica Polonica*. 2003; 50: 625–45.
- [70] Murphy G. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nature reviews Cancer*. 2008; 8: 929–41.

- [71] Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999; 285: 727–9.
- [72] Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, Weinschenk T, Wittenbrink M, Ludwig A, et al. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer research*. 2008; 68: 6368–76.
- [73] Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002; 419: 734–8.
- [74] Chitadze G, Lettau M, Bhat J, Wesch D, Steinle A, Furst D, et al. Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: heterogeneous involvement of the "a disintegrin and metalloproteases" 10 and 17. *International journal of cancer*. 2013; 133: 1557–66.
- [75] Kaifu T, Escaliere B, Gastinel LN, Vivier E, Baratin M. B7-H6/NKp30 interaction: a mechanism of alerting NK cells against tumors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2011; 68: 3531–9.
- [76] Wu MR, Zhang T, Gacerez AT, Coupet TA, DeMars LR, Sentman CL. B7H6-Specific Bispecific T Cell Engagers Lead to Tumor Elimination and Host Antitumor Immunity. *Journal of immunology*. 2015; 194: 5305–11.
- [77] Kellner C, Maurer T, Hallack D, Repp R, van de Winkel JG, Parren PW, et al. Mimicking an induced self phenotype by coating lymphomas with the NKp30 ligand B7-H6 promotes NK cell cytotoxicity. *Journal of immunology*. 2012; 189: 5037–46.
- [78] Schlecker E, Fiegler N, Arnold A, Altevogt P, Rose-John S, Moldenhauer G, et al. Metalloprotease-mediated tumor cell shedding of B7-H6, the ligand of the natural killer cell-activating receptor NKp30. *Cancer research*. 2014; 74: 3429–40.
- [79] Ulrich H, Martins AH, Pesquero JB. RNA and DNA aptamers in cytomics analysis. *Current protocols in cytometry / editorial board, J Paul Robinson, managing editor [et al]*. 2005; Chapter 7: Unit 7 28.
- [80] Ulrich H, Martins AH, Pesquero JB. RNA and DNA aptamers in cytomics analysis. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2004; 59: 220–31.
- [81] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007; 23: 2947–8.
- [82] Kozik A. R-KM, Guevara-Lora I., *Analiza Instrumentalna w Biochemii*. Kraków 2001.
- [83] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. 1985; 150: 76–85.
- [84] Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A, International Union of Pharmacology Committee on Receptor N, Drug C. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacological reviews*. 2003; 55: 597–606.
- [85] Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature biotechnology*. 2011; 29: 143–8.
- [86] Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, Marillonnet S. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type Ms restriction enzymes. *PloS one*. 2009; 4: e5553.
- [87] Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B. A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2008; 16: 698–706.
- [88] Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic acids research*. 2011; 39: e82.

- [89] Geback T, Schulz MM, Koumoutsakos P, Detmar M. TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *BioTechniques*. 2009; 46: 265–74.
- [90] Baumgarten H, Peters JH. Monoclonal antibodies. Berlin; New York: Springer-Verlag; 1992.
- [91] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013; 339: 819–23.
- [92] Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research*. 2003; 31: 3406–15.
- [93] Magnus M, Boniecki MJ, Dawson W, Bujnicki JM. SimRNAweb: a web server for RNA 3D structure modeling with optional restraints. *Nucleic acids research*. 2016.
- [94] Cload S.T. MTG, Keefe A.D., Healy J.M., Wilson C. The Aptamer Handbook. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.; 2006. p. 363–416.
- [95] Li JJ, Fang X, Tan W. Molecular aptamer beacons for real-time protein recognition. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002; 292: 31–40.

Zastrzeżenia patentowe

1. Aptamer wykazujący powinowactwo do białka ADAM10 zawierający sekwencję nukleotydową o SEQ ID NO 1 lub jej region zmienny, lub sekwencję kwasu nukleinowego hybrydującego specyficznie w ostrych warunkach roztworu hybrydizacyjnego z kwasem nukleinowym stanowiącym nić komplementarną do kwasu nukleinowego o sekwencji SEQ ID NO 1.
2. Aptamer według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera region zmienny sekwencji SEQ ID NO 1.
3. Aptamer według zastrz. 1, **znamienny tym**, że regionem zmiennym SEQ ID NO 1 jest: 5'GCGUGAUUCGCUACUUUGGCCGUUGCAGGGCCUGAC3'.
4. Aptamer jak określono w którymkolwiek z zastrz. 1–3 do zastosowania hamowania aktywności białka ADAM10.
5. Kompozycja farmaceutyczna, **znamienna tym**, że zawiera aptamer jak określono w którymkolwiek z zastrz. 1–3.
6. Aptamer jak określono w zastrz. 1–3 lub kompozycja farmaceutyczna jak określono w zastrz. 5 do zastosowania w leczeniu choroby mediowanej białkiem ADAM10.
7. Aptamer do zastosowania według w zastrz. 6, przy czym leczoną chorobą mediowaną białkiem ADAM10 jest stan zapalny lub nowotwór.

Rysunki

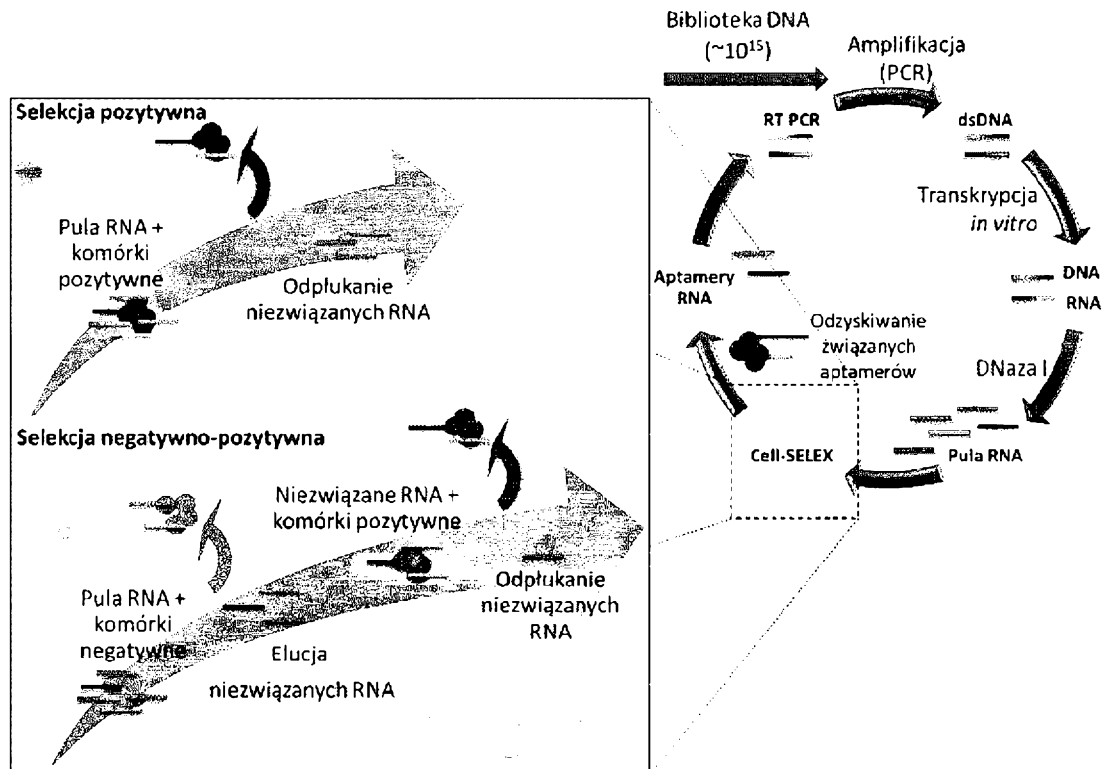
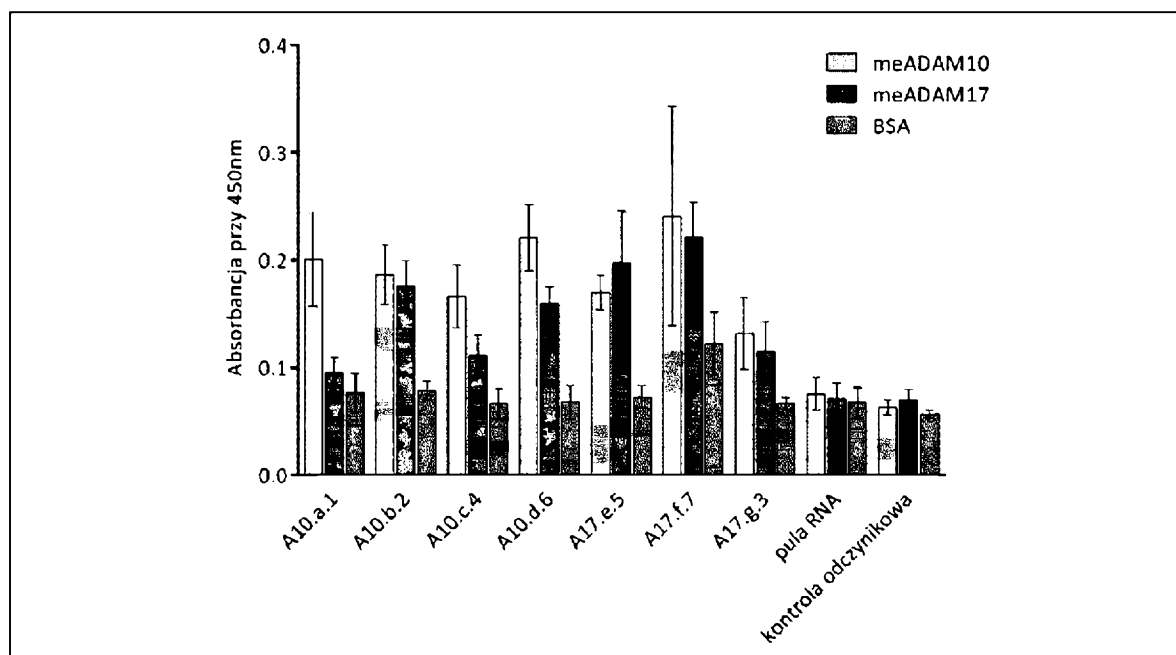
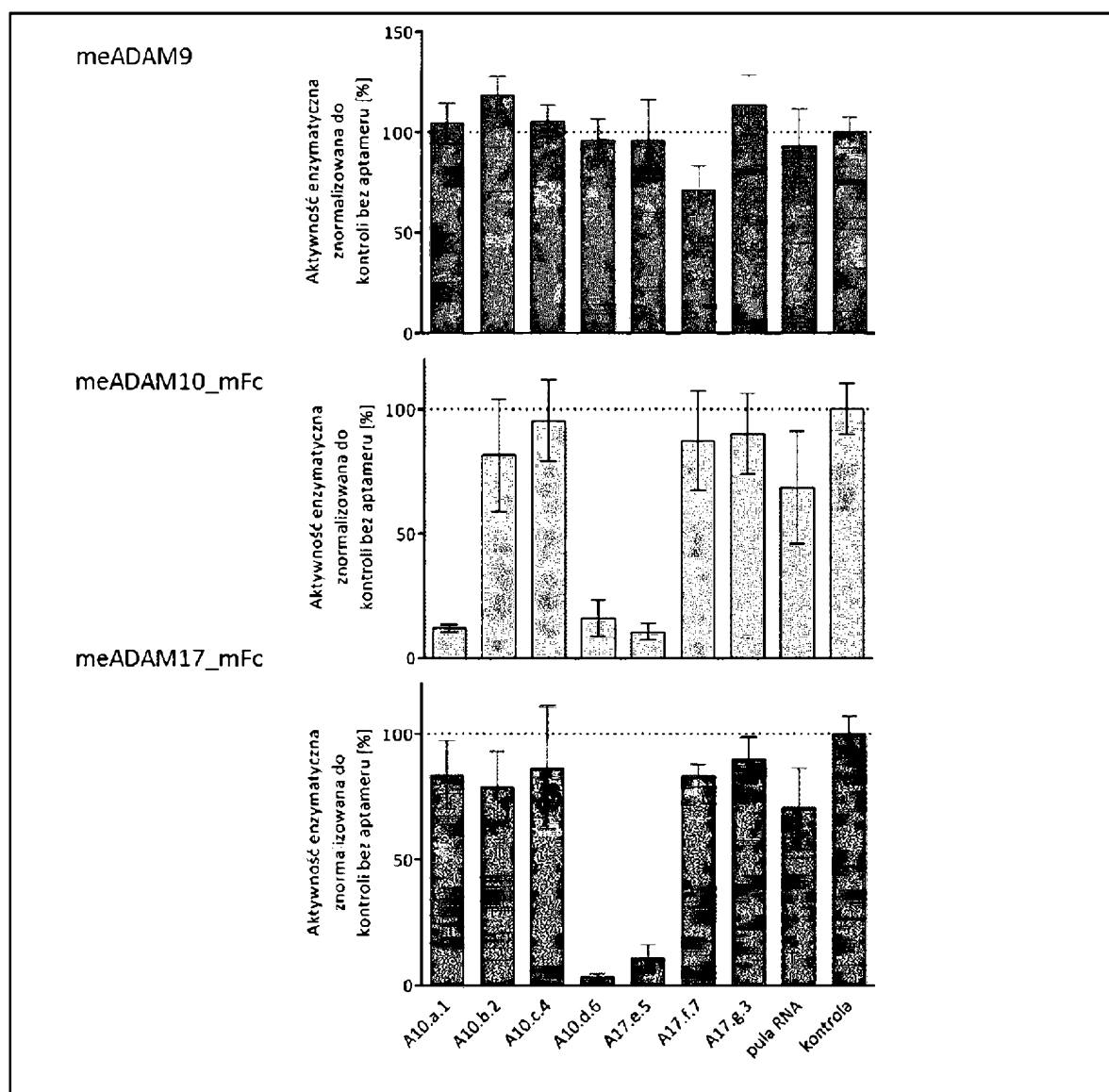
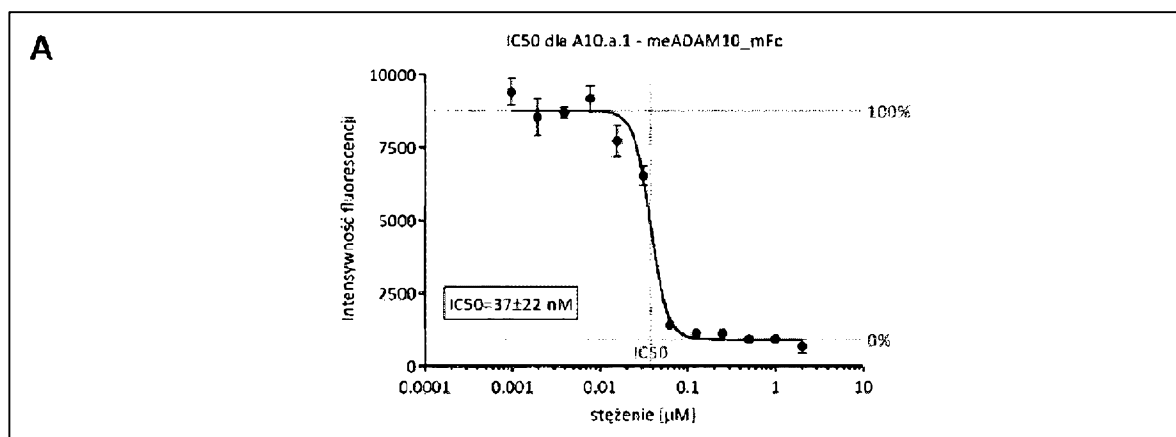


Fig. 1

**Fig. 2**

**Fig. 3**

*Fig. 4*

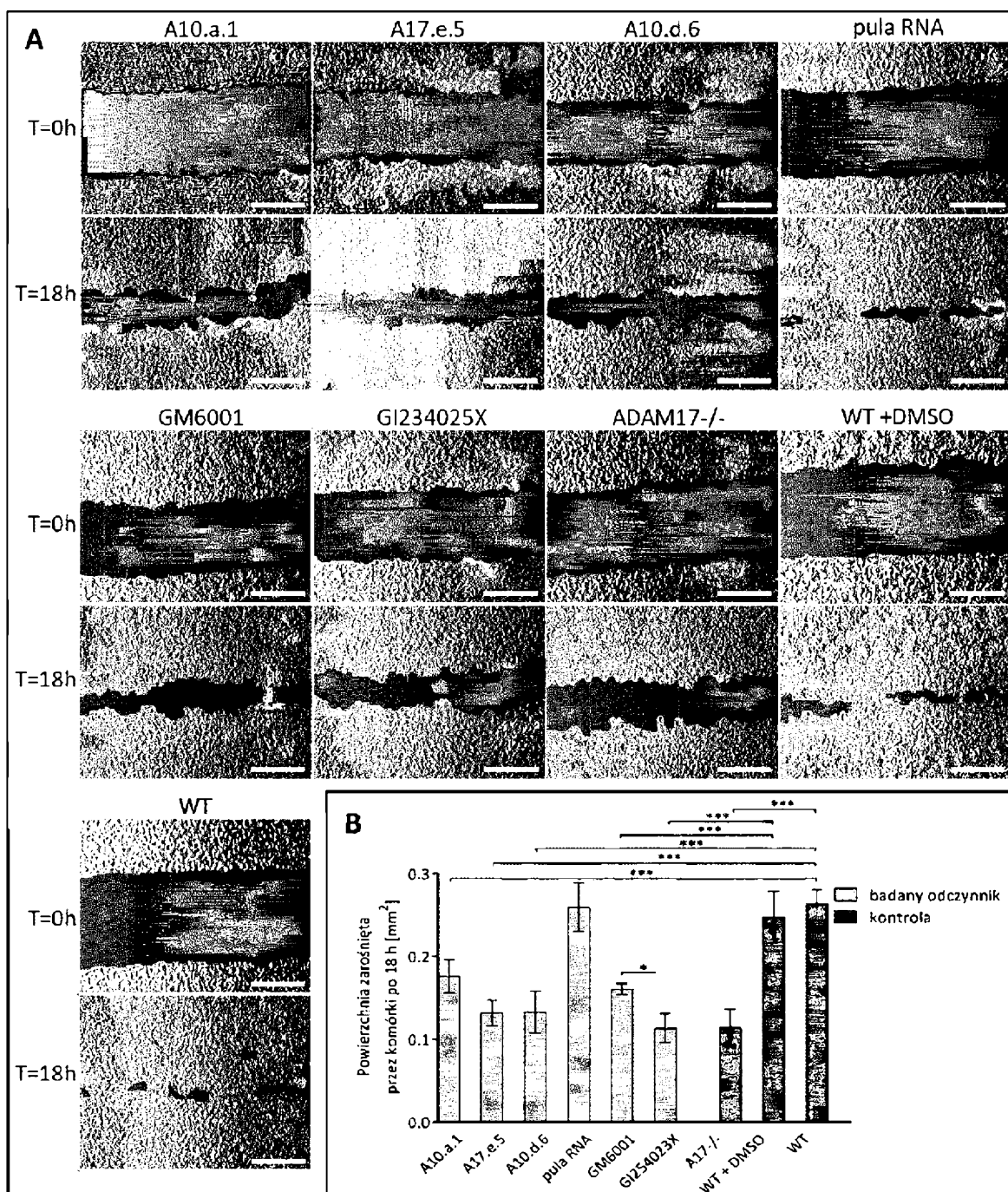


Fig. 5

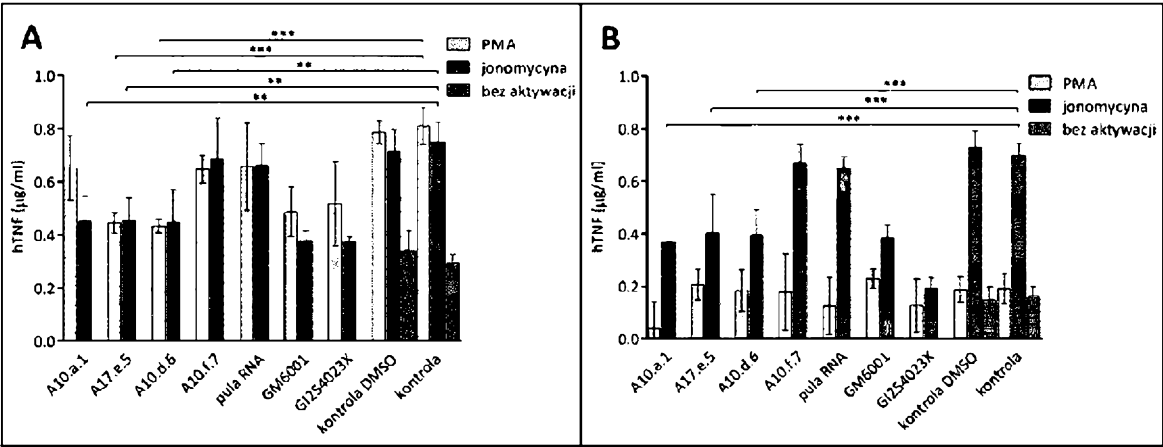


Fig. 6

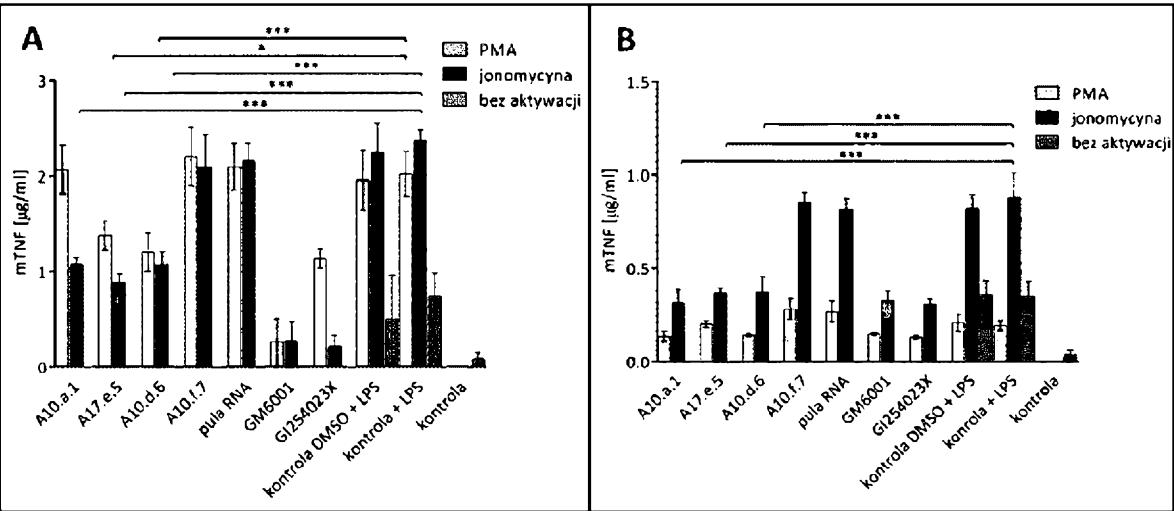


Fig. 7

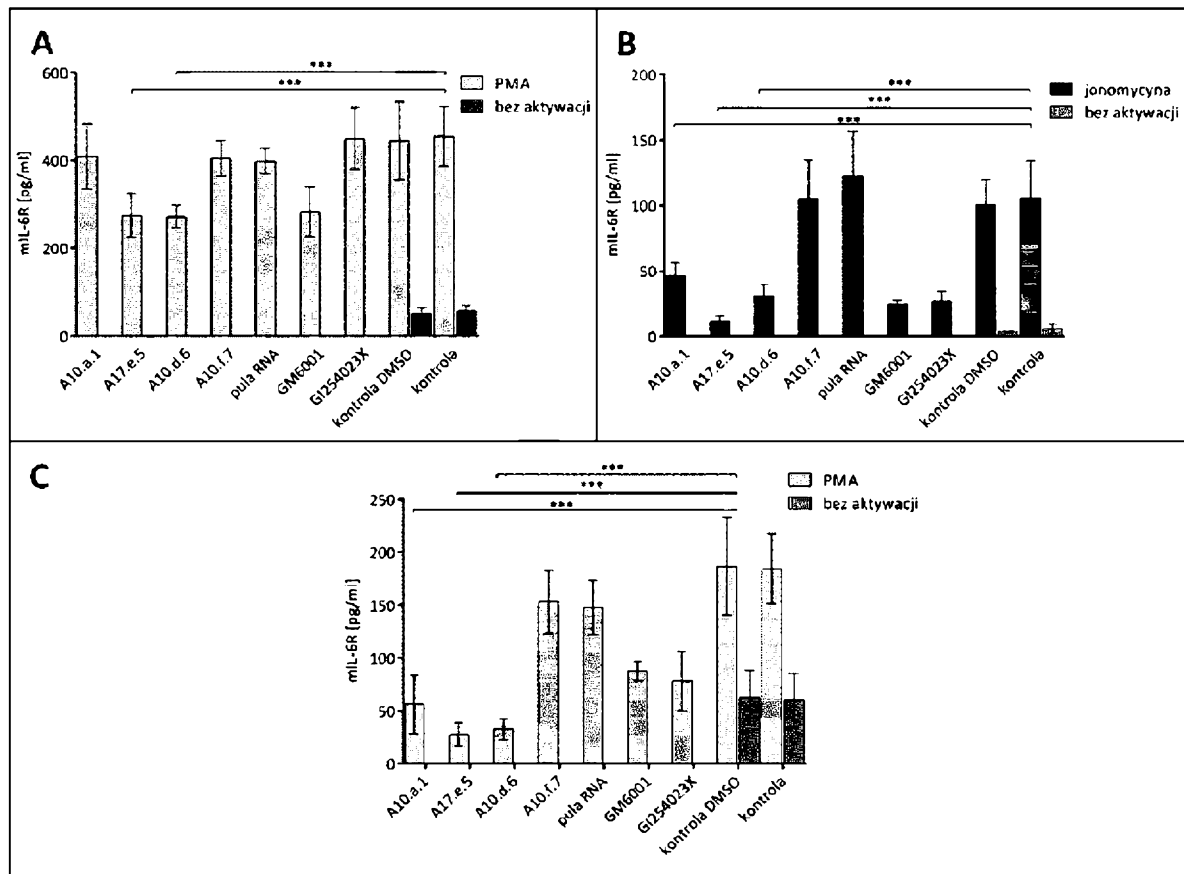


Fig. 8

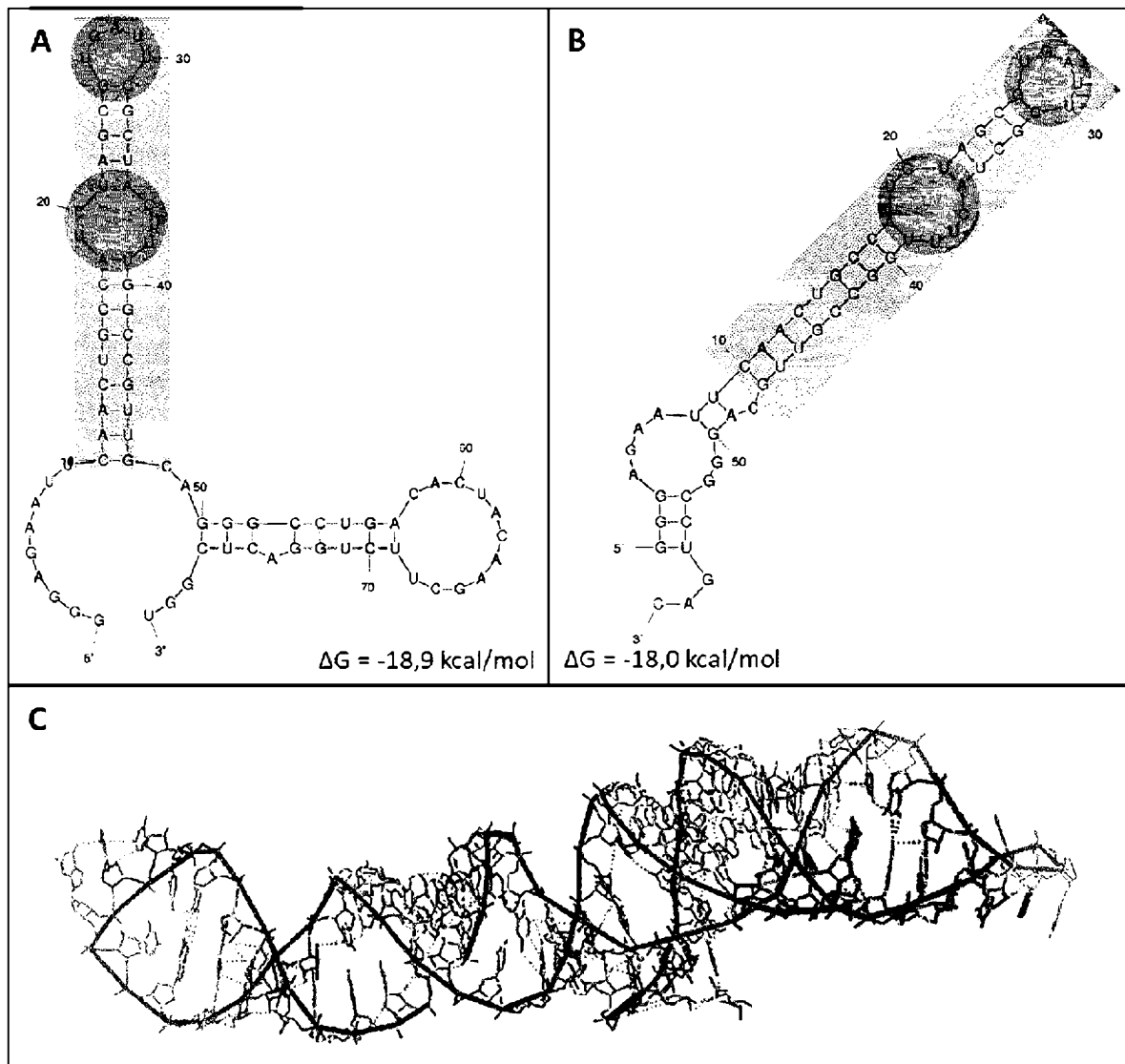


Fig. 9