

Adaptado y traducido de:

SUN, Hongguang, et al.
Oligonucleotide Aptamers: New Tools
for Targeted Cancer
Therapy. *Molecular Therapy—Nucleic
Acids*, 2014, vol. 3, no 8, p. e182.

APTÁMEROS OLIGONUCLEOTÍDICOS: NUEVAS HERRAMIENTAS EN LA TERAPIA DIRIGIDA AL CÁNCER

Julia M. Coronas Serna
Miguel Seguí Fernández
Julia Pérez López

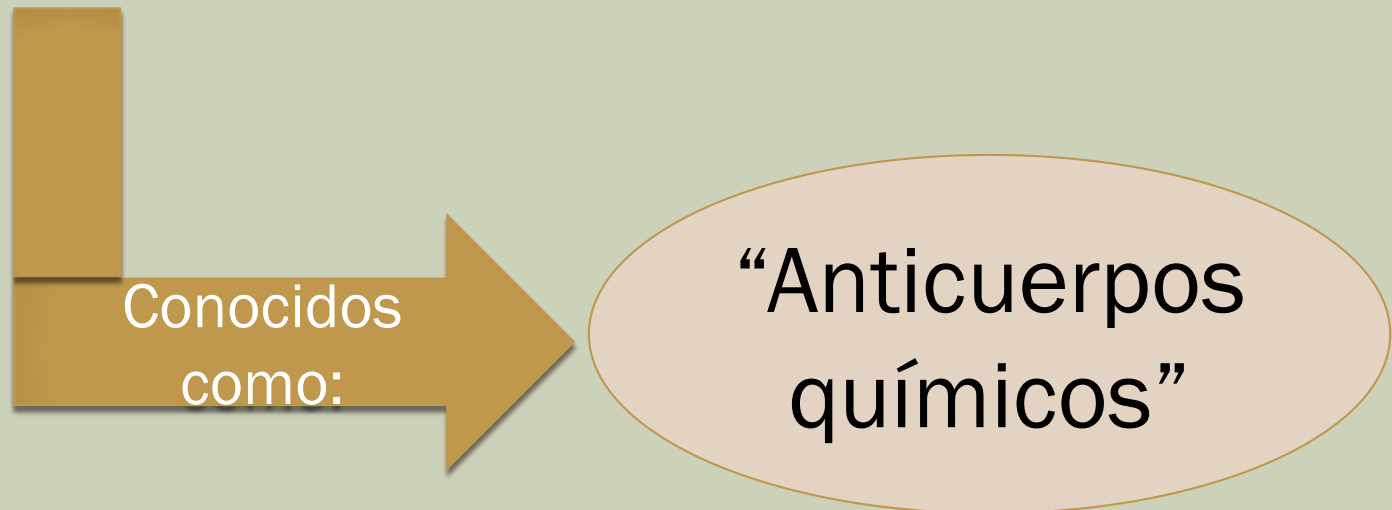
Sistemas de
Liberación de
Fármacos



¿QUÉ SON LOS APTÁMEROS?

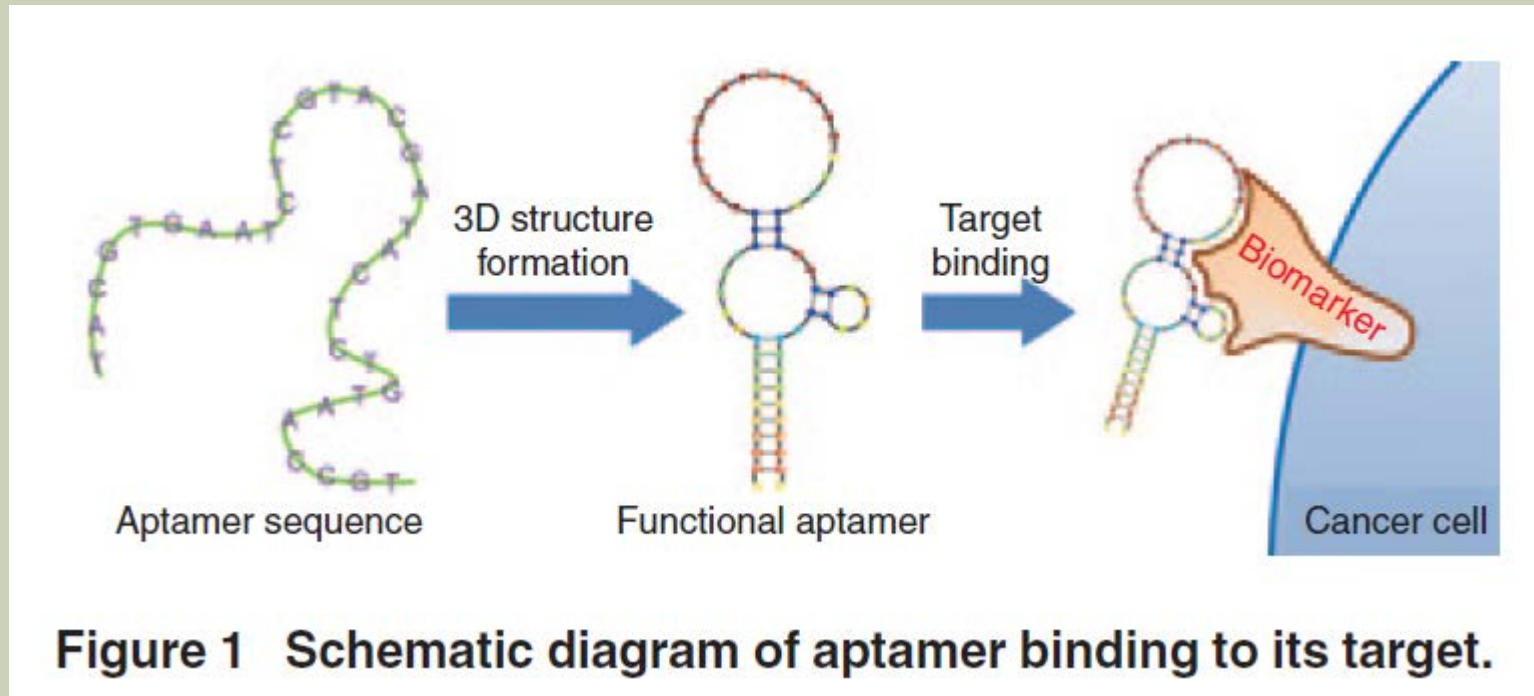
Introducción

- Cadenas oligonucleotídicas de RNA o ssDNA
- Son ligandos de alta ESPECIFICIDAD y AFINIDAD por estructuras **tridimensionales** presentes en las células diana



¿QUÉ SON LOS APTÁMEROS?

Introducción



¿POR QUÉ DESARROLLAR APTÁMEROS?

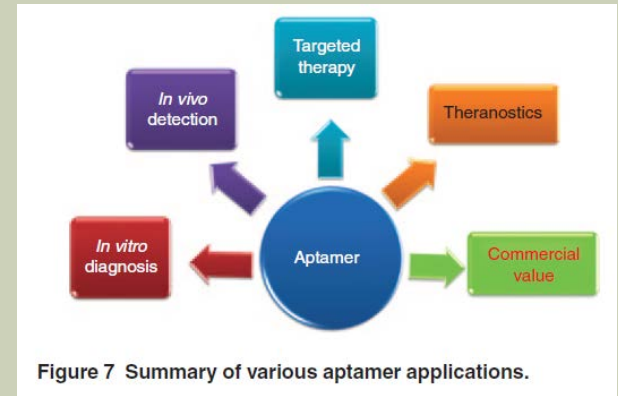
Introducción

- Permite identificar biomarcadores
- Diagnóstico *in vitro*
- Técnicas de visualización *in vivo*

Terapia dirigida o vectorizada



>4000



VENTAJAS QUE OFRECEN

Frente a los anticuerpos clásicos

Introducción

- ✓ Bajo Peso Molecular. Paso de membranas.
- ✓ No inmunogénico (no se inmuniza).
- ✓ Estabilidad térmica y química.
- ✓ Síntesis y purificación a gran escala.
- ✓ Baja variabilidad genética.
- ✓ Para diagnóstico (ensayos de inmunodifusión).
- ✓ Menor coste de producción.

✓ Aplicaciones clínicas

✓ Síntesis industrial

RNA

ssDNA

Introducción

Fle

OH

bas

Modificaciones químicas:

$2'\text{-OH} \rightarrow 2'\text{F}, 2'\text{NH}_2, 2'\text{OMe}$

Enlace fosfodiéster \rightarrow fosforotionato

Degradación *in vivo*
(RNAasa)

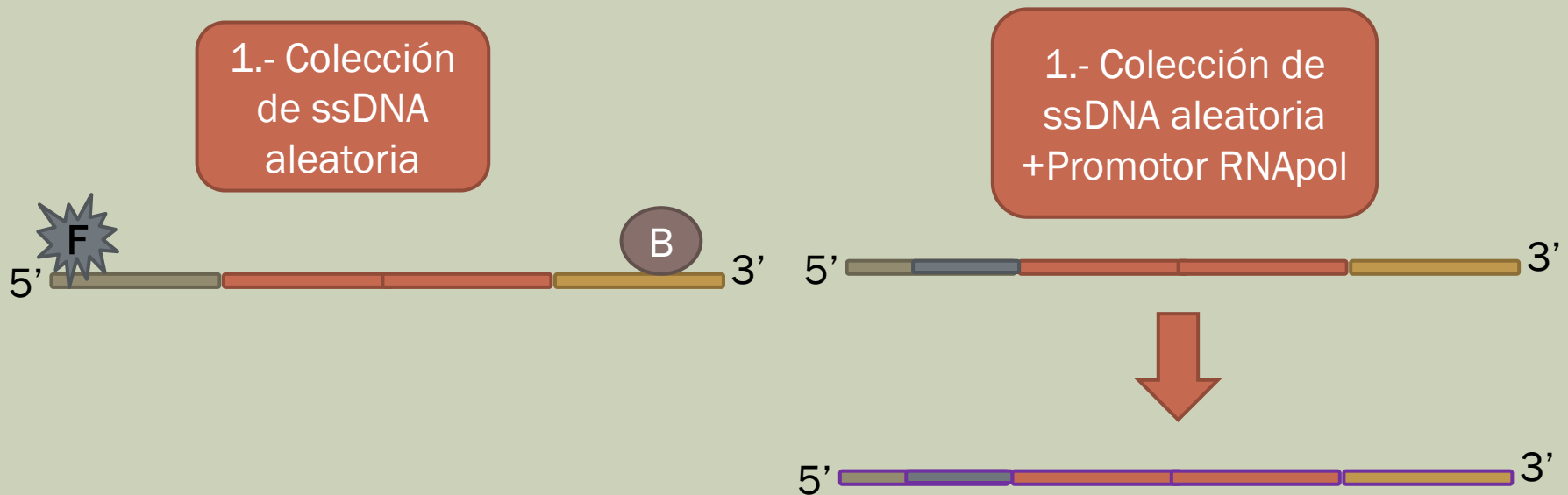
Menos
posibilidades de
estructuras 3D

¿CÓMO SE OBTIENEN? MÉTODO SELEX

Systematic Evolution of Ligands
by Exponential enrichment

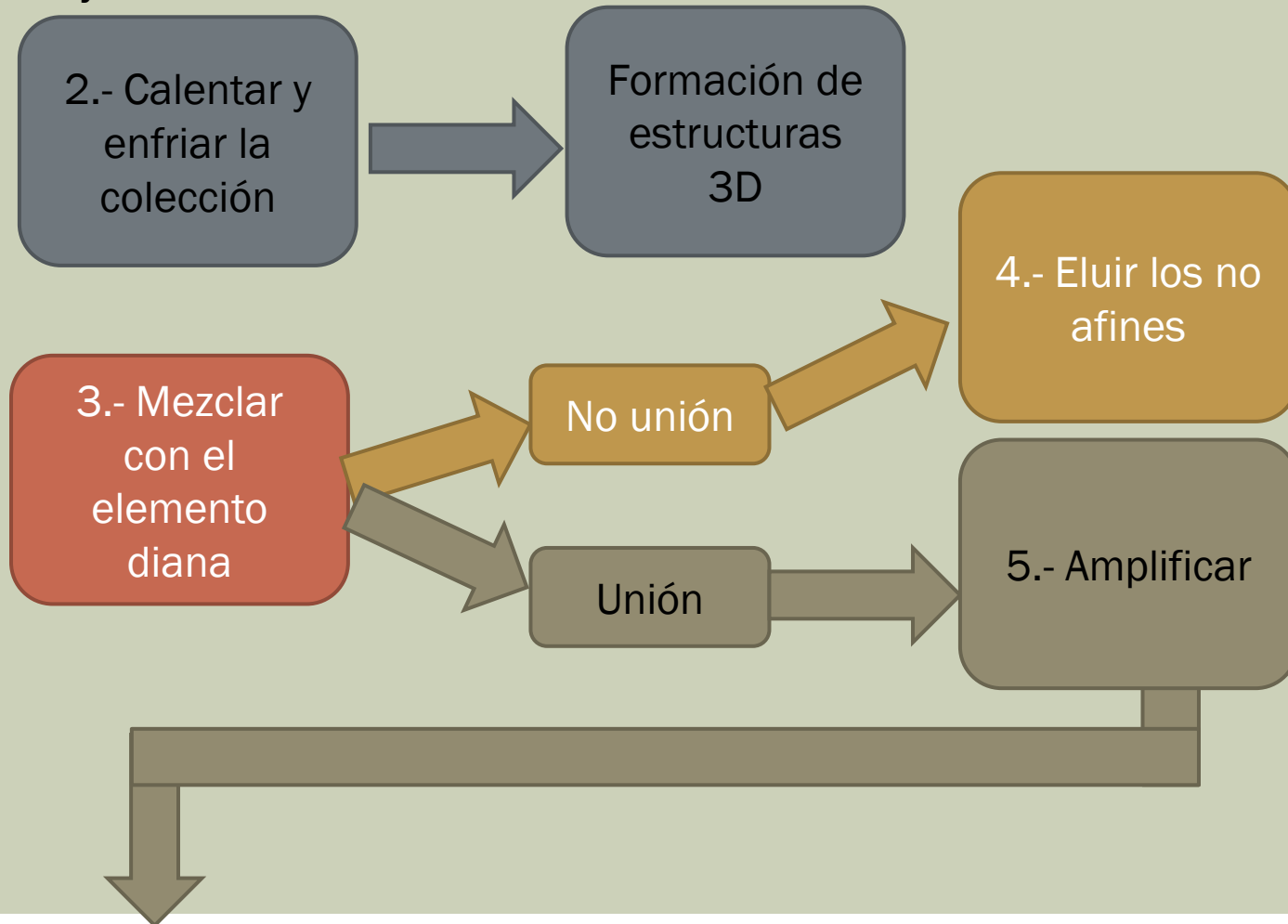
Materia y Métodos

Evolución Sistemática de Ligandos mediante Enriquecimiento Exponencial” (SELEX)



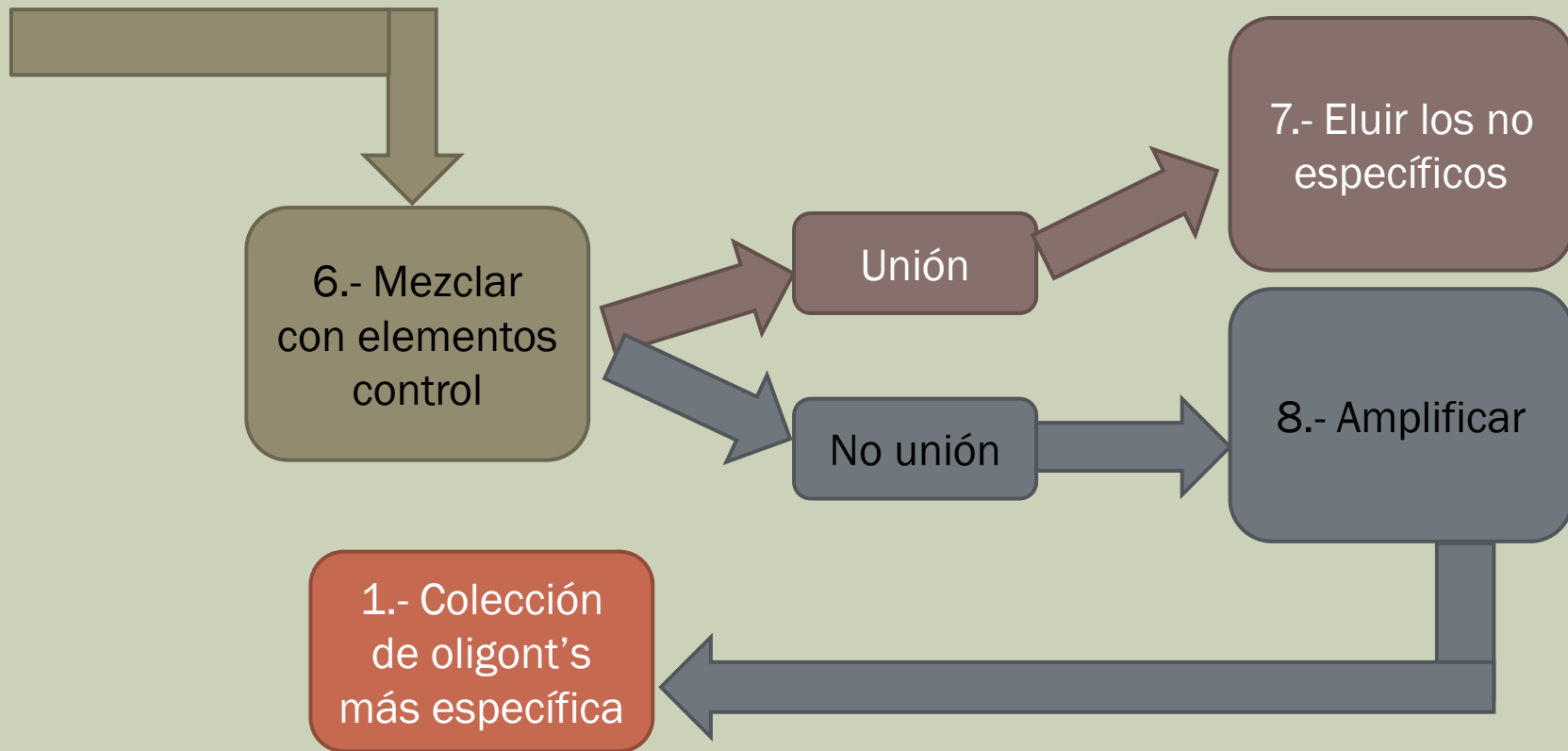
¿CÓMO SE OBTIENEN? MÉTODO SELEX

Material y Métodos



¿CÓMO SE OBTIENEN? MÉTODO SELEX

Material y Métodos



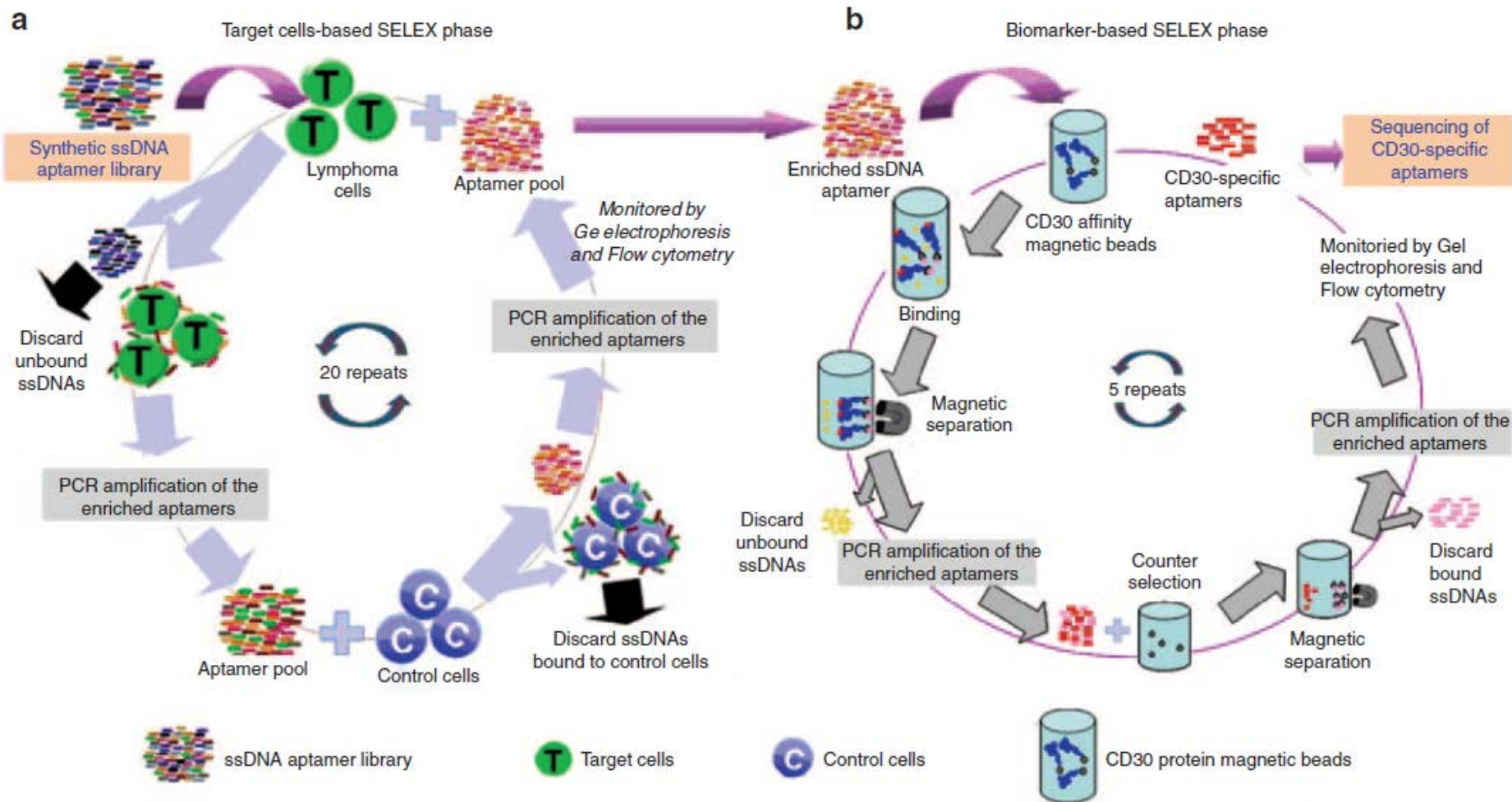


Figure 2 Schematic diagram of our hybrid-SELEX method for selection of CD30-specific ssDNA aptamer. In our experiment, the hybrid-SELEX process is divided into (a) the cell-based SELEX selection and (b) CD30 protein-based SELEX enrichment. First, CD30-expressing lymphoma cells are used for positive selection and CD30-negative Jurkat cells are used in negative counter-selection. After 20 rounds of selection, the enriched aptamer pool is incubated with CD30 protein immobilized on magnetic beads for five additional rounds of enrichment. SELEX, Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment.

Table 2 Aptamers specifically targeting cell surface biomarkers used in cancer therapy

Cell surface biomarker	SELEX method	Aptamer	Applications
Alkaline phosphatase placental-like 2 (ALPPL-2)	Cell-SELEX	RNA	Pancreatic carcinoma diagnosis or therapy ⁴⁶
AXL	Cell-SELEX	RNA	Inhibitory aptamer for AXL-dependent cancer ^{99,123}
B-cell activating factor receptor (BAFF-R)	Protein-SELEX	RNA	Targeting aptamer for BAFF-R-dependent cancer therapy ¹⁰⁴
Carcinoembryonic antigen (CEA)	Protein-SELEX	RNA	Inhibition of CEA-mediated cancer metastasis ¹²⁴
CD16 α (Fc γ RIII α)	Hybrid-SELEX	DNA	Targeting CD16 α for immunotherapy ¹¹³
CD28	Protein-SELEX	RNA	Agonistic aptamer that enhances cellular immune response against lymphoma ¹²⁵
CD30	Protein-SELEX or Hybrid-SELEX	RNA and DNA	Targeting or immunotherapy of T-cell lymphoma ^{23,28}
CD44	Protein-SELEX	RNA and DNA	Targeting aptamer for cancer stem cells ^{21,127,128}
CD71 (Transferrin receptor)	Intensified-SELEX	RNA	Targeting of CD71-dependent cancer ⁸⁷
CD124 (IL-4R α)	Protein-SELEX	DNA	Blocking CD124 and inducing Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) apoptosis ²⁹
CD133	Cell-SELEX	RNA	Aptamer that targets cancer stem cells ²⁴
c-MET	Protein-SELEX	DNA	Targeting aptamer for c-MET-driven cancer ¹⁰
EGFR (ErbB1/HER1)	Cell-SELEX or Protein-SELEX	RNA	Antagonist for EGF-dependent cancer proliferation ^{92,130}
ErbB2/HER2	Protein-SELEX or Cell-SELEX or Intensified-SELEX	RNA and DNA	Targeting of HER2-driven cancer for therapy or diagnosis ^{43,48,64,115,131}
ErbB3/HER3	Protein-SELEX	RNA	Inhibition of heregulin-induced growth of MCF7 cells ¹³²
E-Selectin	Protein-SELEX	DNA	Targeting of cancers with upregulated E-Selectin expression for diagnosis or therapy ¹²⁰⁻¹²⁵
EpCAM	Protein-SELEX	DNA and RNA	Targeting of EpCAM-expressing cancer cells for diagnosis or therapy ^{39,137}
Fractalkine (CX3CL1)	Protein-SELEX	DNA	Antagonist for Fractalkine-related inflammatory diseases or cancer ¹³⁸
HPV-16 E7	Protein-SELEX	RNA	HPV-infected cervical cancer therapy or diagnosis ¹³⁹
Immunoglobulin Heavy Mu Chain (IGHM)	Cell-SELEX	DNA	Targeting aptamer for Burkitt lymphoma diagnosis and therapy ^{47,48}
Integrins- α v β 3	Protein-SELEX	RNA	Inhibition of integrin-dependent cancer cell proliferation ¹⁴⁰
Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)	Protein-SELEX	RNA	Targeting aptamer for MMP-9 to promote cancer diagnosis or therapy ⁴¹
MUC1	Protein-SELEX	DNA	MUC1-targeted aptamer that enhances cancer diagnosis or therapy ^{65,76,142}
Nucleolin	Non-SELEX	DNA	Targeting or biotherapy for nucleolin-expressing cancers ¹⁵
Prostate specific membrane antigen (PSMA)	Protein-SELEX	RNA and DNA	Targeting aptamer used in prostate cancer therapy or diagnosis ^{99,143}
PTK7	Cell-SELEX	DNA	Targeting aptamer for acute lymphoblastic leukemia therapy or diagnosis ^{11,49}
RET	Cell-SELEX	RNA	Neutralizing aptamer that inhibits RET-dependent intracellular signaling pathway ²⁵
Tenascin-C	Hybrid-SELEX	RNA	Aptamer that targets Tenascin-C-driven cancer for therapy or diagnosis ⁹³

APLICACIONES Y EJEMPLOS

Terapia dirigida por aptámeros

Aplicaciones y ejemplos

- Conjugados fármaco-aptámero
- Nanopartículas
- Terapia génica
- Inmunoterapia
- Terapia biológica

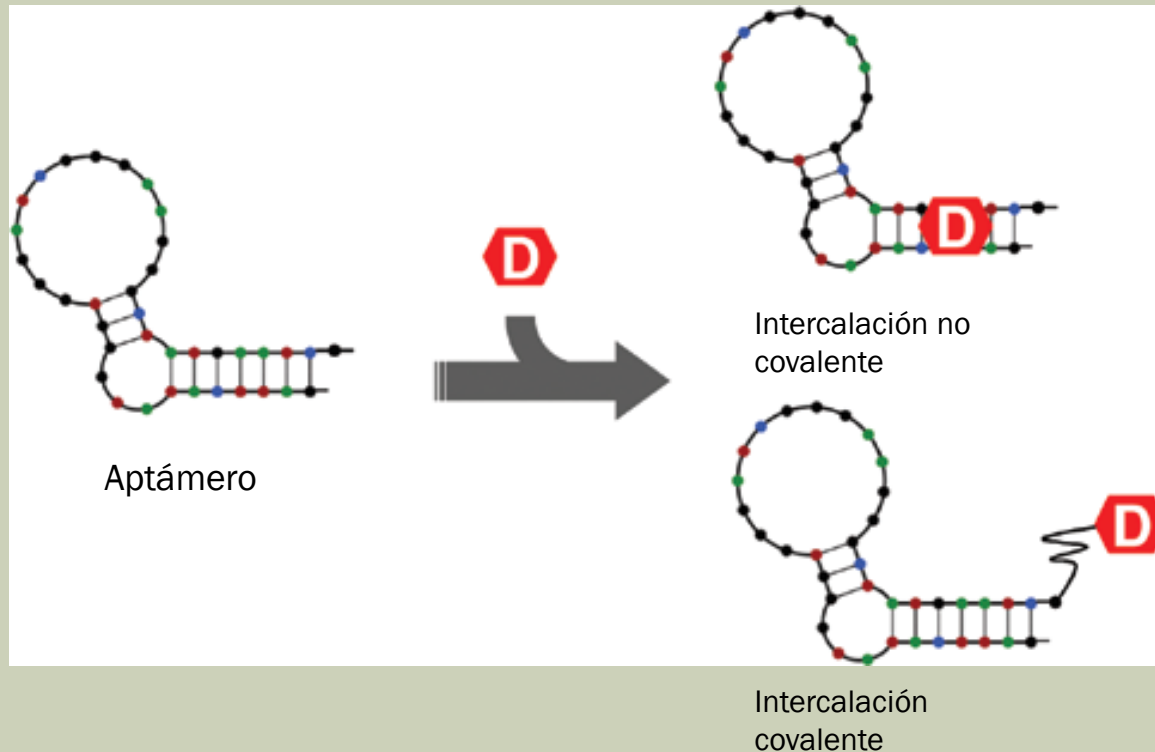
CONJUGADOS FÁRMACO-APTÁMERO

Aplicaciones y ejemplos

- Método simple y efectivo
- Eficacia mayor frente a fármaco solo
- Varios problemas de los conjugados:
 - a) Inestabilidad (en uniones no covalentes)
 - b) Baja vida media *in vivo* (bajo peso molecular)
 - c) Baja cantidad de fármaco conjugada (estructura de los aptámeros es simple)

CONJUGADOS FÁRMACO-APTÁMERO

Aplicaciones y ejemplos



a) Solución: Unión covalente con un linker sensible a condiciones controlables (ejemplo: pH bajo)

CONJUGADOS FÁRMACO-APTÁMERO

Aplicaciones y ejemplos

b) Aumento de peso molecular:

Conjugación con polímeros:

- Ejemplo: polietilenglicol (PEG), produjo:
- Aumento en peso molecular (y vida media)
- Aumento de estabilidad
- Menor acumulación en tejidos no diana

CONJUGADOS FÁRMACO-APTÁMERO

Aplicaciones y ejemplos

c) Aumento de cantidad de fármaco conjugada

Varias estrategias:

- “Nanotrenes” (aptNTrs):
 - Aptámero= Locomotora
 - Sondas DNA= Vagones
- Aptámeros con fármacos fotosensibles
- Aptámeros bi- o tri-específicos

NANOPARTÍCULAS

Aplicaciones y ejemplos

- Biocompatibilidad
- Gran superficie (unión del aptámero y del fármaco)
- Otras características según tipo

NANOPARTÍCULAS

Aplicaciones y ejemplos

- Tipos
 - a) Copolímeros y liposomas
 - b) Nanomateriales metálicos
 - c) VLPs (virus-like particles)

COPOLÍMEROS Y LIPOSOMAS

Aplicaciones y ejemplos

- Mayor degradación y biocompatibilidad
- Ejemplo: Bioconjugado: PLGA-lecitina-PEG y aptámero con paclitaxel
- Gran eficiencia en encapsulación
- Mayor vida media

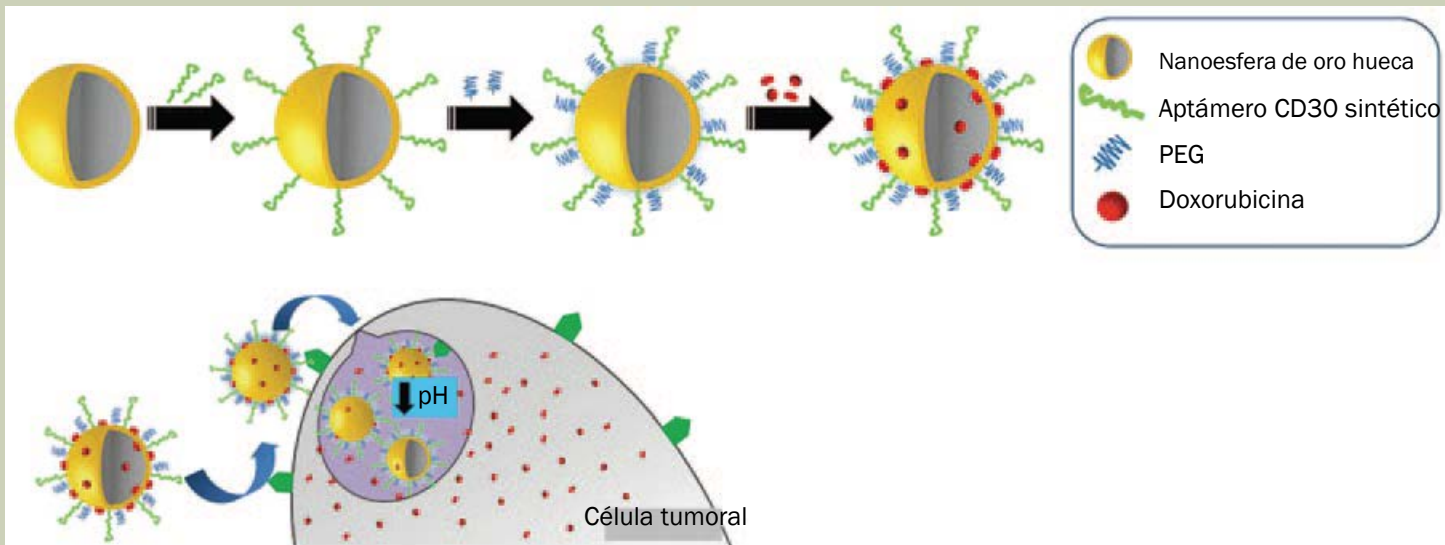
NANOMATERIALES METÁLICOS

Aplicaciones y ejemplos

- Propiedades ópticas
- Propiedades electromagnéticas
- Estabilidad
- Biocompatibilidad

NANOMATERIALES METÁLICOS

Aplicaciones y ejemplos



VLPS

Aplicaciones y ejemplos

- Ejemplo:
- Estrategia oxidativa
- 60 copias de aptámero sgc8 en cada cápsida de bacteriófago MS2
- Unión fuerte a células diana
- Internalización y degradación por lisosomas

TERAPIA GÉNICA

Aplicaciones y ejemplos

small interfering RNA (siRNA)

microRNA (miRNA)



Quimera

INCONVENIENTES:

- Poca carga útil
- Vida media corta
- Biodistribución indeseable

- Conjugación covalente
- Conjugación no covalente

- Terapia de cáncer

- Enfermedades infecciosas, pej VIH

NANOTECNOLOGÍA

Falta de especificidad *in vivo*

Baja actividad eficaz células diana

TERAPIA GÉNICA. EJEMPLO

Aplicaciones y ejemplos

Sun et al.

Nanonúcleo con polímero transportador

PEI

Alta eficacia de transfección celular

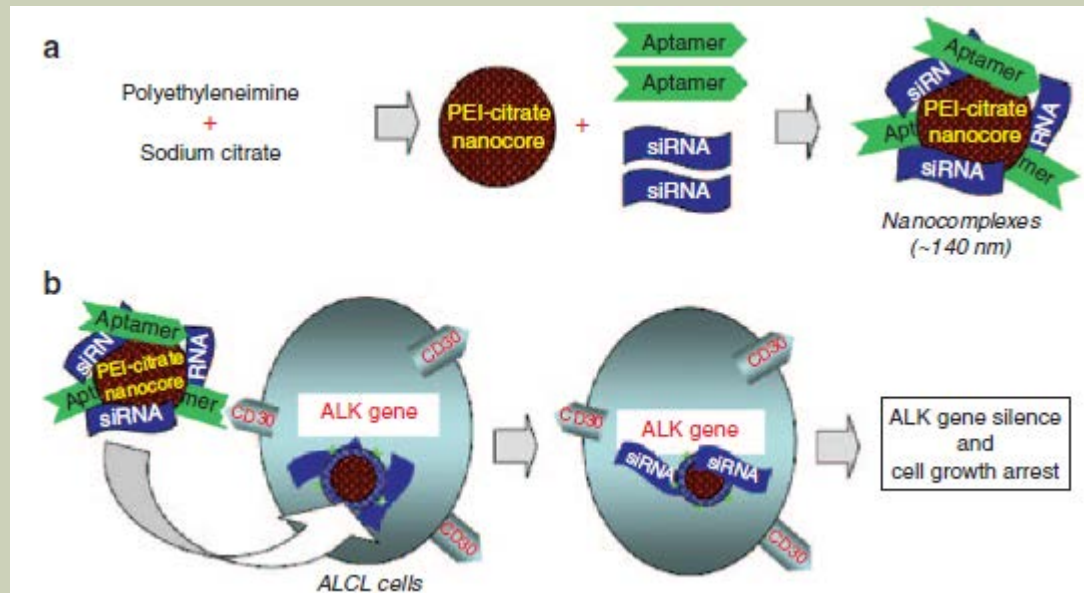
Internalización: endosomas → citoplasma

Linfoma

Expresión de CD30



- Downregulation del gen ALK
- Inhibición proliferación celular



INMUNOTERAPIA

Aplicaciones y ejemplos

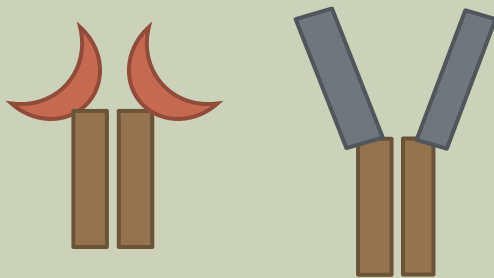
Bajo potencial de efectos adversos
Alta especificidad



Anticuerpos
artificiales



Reconocimiento – internalización
en macrófagos (Bruno *et al.*)

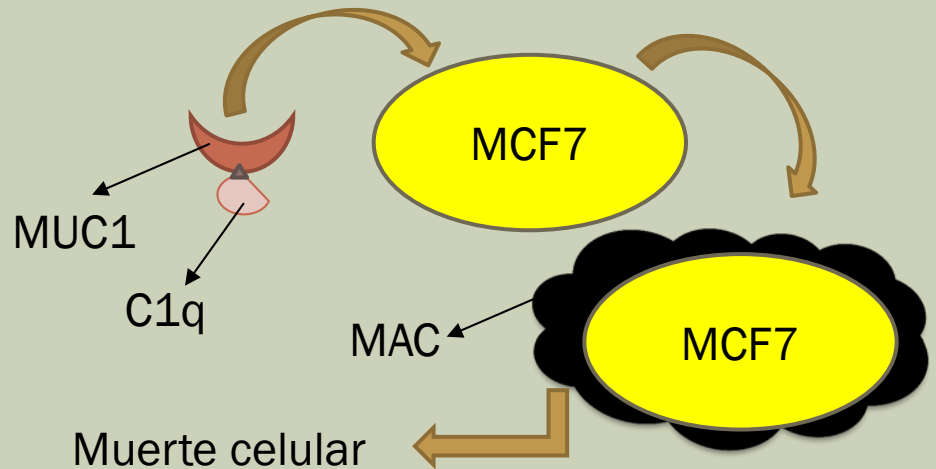


INMUNOTERAPIA. EJEMPLOS

Aplicaciones y ejemplos

Stecker et al.

Línea de células de cáncer de pulmón (MCF7)
Formación de un complejo de ataque a membrana (MAC)



Xiong et al.

Células de leucemia (K562)

+ Ligando PEG



Protección conformación 3D (aptámero)

+ Cola: lípido diacetilado



Facilita y mejora incorporación a membrana

TERAPIA BIOLÓGICA

Aplicaciones y ejemplos

Vías de transducción
Agonistas o antagonistas

Aptámeros monovalentes
(diana: biomarcadores)



Activar vías de señalización *downstream*

Aptámeros multivalentes



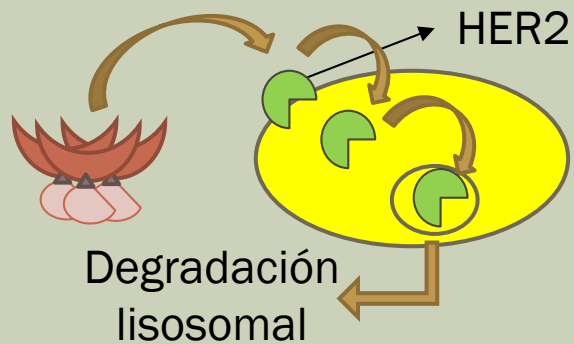
Activar vías de señalización *downstream*
(multimerización del receptor)

TERAPIA BIOLÓGICA. EJEMPLOS

Aplicaciones y ejemplos

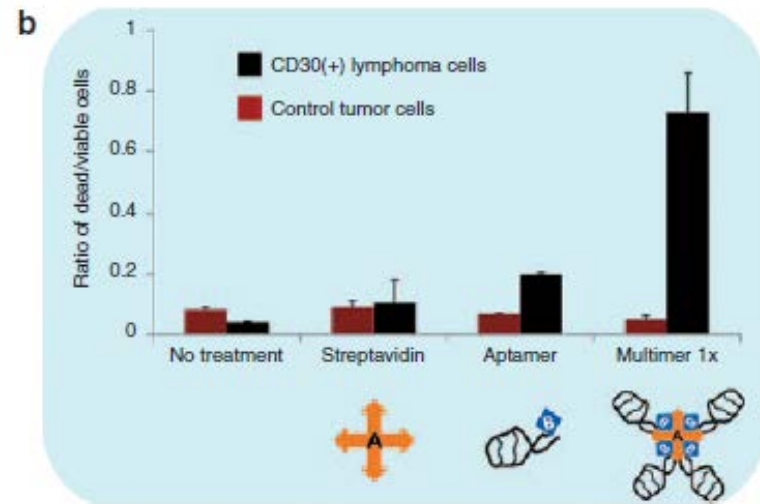
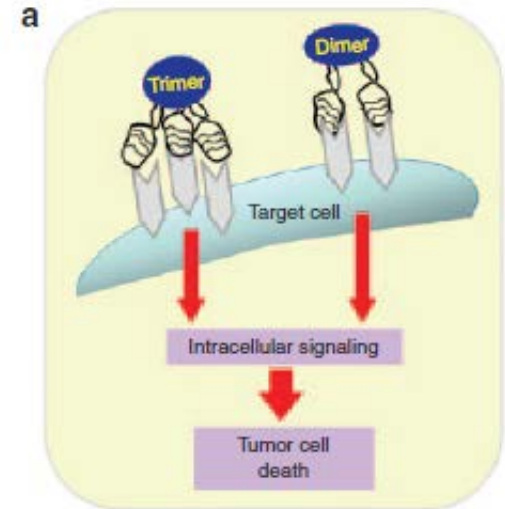
Mahlknecht et al.

Modelo de cáncer de estómago



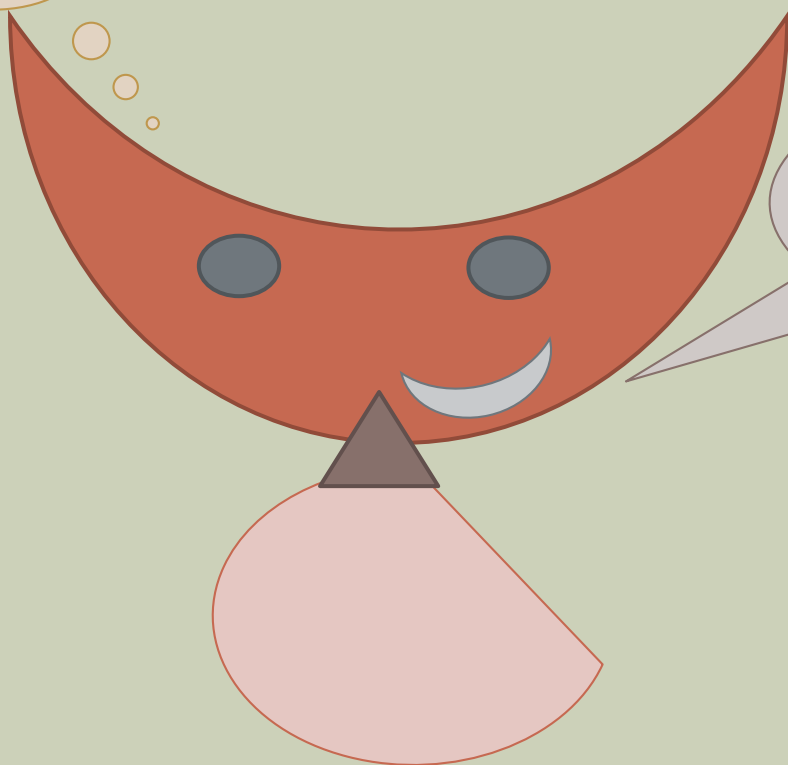
Sun et al.

Linfoma
Expresión CD30



CONCLUSIONES

- Los aptámeros suponen un gran avance con respecto a los anticuerpos en el campo de la terapia dirigida.
- Por otro lado, aún resulta necesaria la optimización de algunos aspectos técnicos:
 - SELEX mejorado, para mayor rapidez de selección de las estructuras.
 - Búsqueda de elementos diana relevantes.
 - Mejora de la estabilidad *in vivo*.
 - Liberación efectiva del principio activo.
- En definitiva, los aptámeros prometen ser una atractiva herramienta en la terapia dirigida al cáncer.



**¿Dudas?
¿Comentarios?**

**¡¡MUCHAS
GRACIAS!!**