

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**VYUŽITÍ APTAMERŮ VE VÝZKUMU A
DIAGNOSTICE**

ALICE NEUMANOVÁ

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. ZUZANA SVOBODOVÁ, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mé vedoucí bakalářské práce Mgr. Zuzaně Svobodové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a především ochotu, kterou mi poskytla během vypracování mé bakalářské práce a za veškerý věnovaný čas.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 11. 5. 2023

Alice Neumanová

OBSAH

1. Abstrakt.....	6
2. Abstract.....	7
3. Úvod	8
4. Cíl práce.....	9
5. Protilátky.....	10
5.1 Polyklonální protilátky.....	10
5.2 Produkce polyklonálních protilátek	11
5.3 Monoklonální protilátky.....	12
5.4 Produkce monoklonálních protilátek	12
5.5 Rekombinantní protilátky.....	15
5.6 Produkce rekombinantních protilátek	15
5.7 Nanoprotilátky.....	16
5.8 Affimery.....	18
6. Aptamery	19
6.1 Vznik a objev aptamerů	19
6.2 Riboswitch.....	20
6.3 SELEX	22
6.4 Modifikace procesu SELEX	24
6.5 Detekční technologie založené na aptamerech	26
6.5.1 ELONA	26
6.5.2 ALFA	27
6.5.3 Aptasenzory.....	29
6.5.4 Aptahistochemie.....	31
6.5.5 Průtoková cytometrie	31
6.6 Využití aptamerů v diagnostice.....	32
6.7 Aptamery na trhu.....	33
6.8 Budoucnost aptamerů v klinické praxi.....	35
7. Protilátky vs aptamery	36

8. Závěr.....	40
9. Použité zkratky	42
10. Seznam tabulek.....	44
11. Seznam obrázků.....	44
12. Použitá literatura.....	45

1. ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá afinitními molekulami, které jsou schopné se specificky navázat na cílovou molekulu. První kapitola je věnována protilátkám, tedy afinitním molekulám proteinového charakteru. Pojednává o jejich struktuře, vývoji, produkci i použití. Hlavní tématem práce jsou aptamery, aneb krátké úseky jednořetězcové DNA nebo RNA, které jsou často nazývány jako syntetické alternativy protilátek. Mají podobné funkce jako protilátky, ale odlišují se strukturou, vývojem i produkcí. S ohledem na jejich podobnost s protilátkami se aptamery používají v různých detekčních technologiích, kde slouží k diagnostice onemocnění. Aptamery jsou stále ve fázi výzkumu, ale pomalu se na trhu začínají objevovat první komerčně dostupné diagnostické sady aptamerů. Závěrečná kapitola srovnává výhody a nevýhody dvou největších rivalů v oblasti afinitních molekul – protilátek a aptamerů.

Klíčová slova: aptamery, protilátky, nanoprottilátky, affimery, diagnostika, výzkum

2. ABSTRACT

The bachelor thesis deals with affinity molecules that are able to specifically bind to the target molecule. The first chapter is devoted to antibodies, i.e., affinity molecules of protein nature. It discusses their structure, development, production, and use. The main focus of the thesis is on aptamers, or short stretches of single-stranded DNA or RNA, which are often referred to as synthetic alternatives to antibodies. They have similar functions to antibodies but differ in structure, development, and production. Because of their similarity to antibodies, aptamers are used in various detection technologies to diagnose diseases. Aptamers are still in the research phase, but the first commercially available aptamer diagnostic kits are slowly starting to appear on the market. The final chapter compares the pros and cons of the two biggest rivals in the field of affinity molecules – antibodies and aptamers.

Key words: aptamers, antibodies, nanoantibodies, affimers, diagnostics, research

3. ÚVOD

Protilátky jsou glykoproteiny, které jsou produkovány imunitním systémem a jejich vlastnosti jim umožňují imunologicky reagovat na cizí látky v organismu. V diagnostice se používají v mnoha proteinových testech jako je např. western blotting, ELISA, průtoková cytometrie, imunoprecipitace nebo imunohistochemie. Použití protilátek má však své nevýhody jako je např. zkřížená reaktivita, špatná reprodukovatelnost nebo snadná změna struktury proteinu vlivem experimentálních podmínek. V posledních letech bylo vyvinuto mnoho alternativních reagensů, které mohou nedostatky klasických protilátek vylepšit. Slibnými konkurenty protilátek se stávají nanobodies, affimery či aptamery. [1]

Aptamery jsou syntetické oligonukleotidy, které se skládají do trojrozměrné struktury, a to jim umožňuje interakci s dalšími molekulami. Lze je zjednodušeně popsat jako chemické protilátky, protože mají molekulární rozpoznávací vlastnosti a dokážou se vysoce specificky navázat na určitý cíl. Produkce aptamerů probíhá in vitro prostřednictvím chemické metody SELEX (Sequential Evolution of Ligands by EXponential enrichment). Od vzniku této metody uplynulo už více než 30 let. Během této doby docházelo k technickému zdokonalování a automatizaci. Vzniklo hned několik modifikací, které umožňují snadnou selekci vysoce specifického aptameru. Aptamery mohou být izolovány proti toxinům, rakovinným buňkám či virovým nebo bakteriálním patogenům. Kromě terapeutického hlediska je možné aptamery využít také v diagnostice, kde je jejich potenciál velice slibný. Největší potenciál mají jako nástroje v biosenzorech. Pomocí aptamerových biosenzorů lze citlivě a specificky detekovat různé cílové molekuly jako jsou nádorové markery nebo virové či bakteriální patogeny. [2]

V souvislosti s afinitními molekulami, především protilátkami se často zaměňuje termín afinita a avidita. Afinita je vazba protilátky s jednou antigenní determinantou, zatímco avidita je vazba protilátky na vícero antigenních determinant v rámci jednoho antigenu. Pojem avidita se nejčastěji objevuje u polyklonálních protilátek, které jsou schopny vazby na více determinant antigenů. [3]

4. CÍL PRÁCE

Tato bakalářská práce se zabývá představením aptamerů a jejich využití ve výzkumu a diagnostice. Cílem práce bylo vypracování rešerše, která shrnuje informace o vzniku, produkci, vývoji a diagnostice afinitních molekul. Zároveň se práce zaměřuje na výhody a nevýhody použití aptamerů a protilátek v klinické praxi.

5. PROTILÁTKY

Protilátky (rovněž také imunoglobuliny) jsou glykoproteiny, které se nacházejí v plazmě i v extracelulárních tekutinách. Jsou produkovány B-lymfocyty a uplatňují se při primární imunitní odpovědi. Skládají se ze dvou řetězců (lehký a těžký), které jsou vzájemně spojeny disulfidickými můstky. Molekula protilátky má tvar písmene Y. U savců je popsáno 5 tříd imunoglobulinů – IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. Jsou schopny se vysoce specificky navázat na antigen a vytvořit pomocí slabých vazebných interakcí imunokomplex. Vysoký stupeň afinity či specifity jim umožňuje použití v nejrůznějších vědeckých disciplínách nebo v klinické praxi, kde se uplatňují převážně v terapii a diagnostice. Jejich objev a následné využití v diagnostických testech či terapii má obrovský dopad na zlepšení zdraví a životních podmínek jak u lidí, tak u zvířat. Na trhu existují protilátky terapeutické, diagnostické a výzkumné. [4]

Protilátky můžeme rozdělit do tří generací. Do první generace se řadí polyklonální protilátky. Polyklonální protilátky (pAbs) byly podávány příjemci jako imunoglobuliny po extrakci z plazmy dárce. I když tato metoda disponuje řadou nevýhod (např. nízká specifita, bezpečnostní problémy či omezené klinické aplikace), stále se dají využít v klinické praxi. Nevýhody první generace odstraňuje druhá generace, tedy monoklonální protilátky (mAbs). Monospecifická povaha jim ale nedovoluje se uplatnit v diagnostice komplexních antigenů. Třetí generace protilátek, reprezentována rekombinantními protilátkami (rAbs), poskytuje odpověď na zmíněné nedostatky a začíná se oprávněně objevovat trhu s protilátkami. Význam protilátek byl rozpoznán v 90. letech 19. století. V té době potenciál protilátek nebyl zcela využit. Až o něco později se začaly uplatňovat v klinickém výzkumu a diagnostice. [5]

5.1 *Polyklonální protilátky*

pAbs jsou produkovány přímo v těle organismu a slouží jako specifická imunitní odpověď na příslušný antigen. Při prezenci antigenu jsou protilátky vylučovány do krve. Sérum člověka obsahuje směs mnoha různých protilátek, které rozpoznávají různé epitopy na molekule. Protilátky v séru mají odlišnou aviditu pro každou antigenní determinantu. Jejich výhodou je, že jsou poměrně snadno vyrobitelné a mají vysokou aviditu k cílům. Na druhou stranu jejich specifita je podstatně nižší, než tomu tak je u jiných druhů protilátek. [6]

Polyklonalita pAbs umožňuje vazbu na více antigenních determinant. Z toho důvodu jsou pAbs citlivější v určitých testech proti cílovým proteinům, buňkám nebo organismům. To se uplatňuje např. v sendvičových reakcích ELISA. U imunohistochemie bylo prokázáno, že pAbs nabízí vyšší citlivost pro detekci proteinů, které jsou přítomny ve vzorku v malých koncentracích, protože více protilátek se naváže na více determinant na proteinu, a to umožňuje zesílení signálu. [7]

5.2 Produkce polyklonálních protilátek

Produkce pAbs vyžaduje použití obratlovců, kdy se jim aplikuje antigen a poté je odebrána krev s protilátkami. Nejběžněji se používají kozy, koně, prasata, ovce a králíci. Jako příklad často využívaného zvířete lze uvést králíky, protože mají adekvátní velikost těla a ideální přístup k marginální ušní žíle i centrální aurikulární tepně, což umožňuje snadný odběr krve. Existuje několik způsobů imunizace králíků. Záleží především na imunogenu, adjuvans a imunizačním schématu. Podání imunogenu může být subkutánní, intradermální, transdermální či intramuskulární. Frekvence opakované imunizace či přeočkování posilovací dávkou je úměrná hladině cirkulujících protilátek. K získání účinné imunizace je nevhodnější aplikovat posilovací dávku, když klesne hladina imunogenu. Vhodně načasovaná aplikace posilovací dávky vede ke stimulaci paměťových B-lymfocytů, a to vede k velké produkci afinitních protilátek. Adjuvans jsou sloučeniny, které zvyšují imunologickou odpověď na daný antigen a aplikují se obvykle již při prvním podání antigenu. Jsou to látky, které fungují jako antigenní depot, transportní vehikulum, inertní nosič nebo imunostimulátor. Bez depotního adjuvans titry protilátek vrcholí 2–3 týdny po imunizaci. U depotních adjuvans to může být o týden až dva později. Depoty se akumulují v místě vpichu. [8] [9]

Tabulka 1 – Příklady tří komerčně dostupných adjuvans [10]

Adjuvans	Typ emulze	Imunomodulátor	Olejová složka
Freundovo adjuvans	Voda v oleji	Usmrcená Mykobakterie	Minerální olej
Ribi Adjuvans System [®]	Olej ve vodě	Mykobakteriální produkt (TDM) a/nebo endotoxinový produkt (MPL [®])	Skvalen
TiterMax [®]	Voda v oleji	Kopolymer CRL-8941	Skvalen

Po odebrání vzorku krve se vyhodnocují protilátky v séru. Frekvence odběru musí být prováděna tak, aby nedošlo u zvířete k anémii. Současně musí být sledován i odebíraný objem krve. Následné vykrvení zvířete musí být provedeno v celkové anestezii a nejlépe se provádí punkcí srdce. [11]

5.3 Monoklonální protilátky

mAbs mají přesně definovanou strukturu a specifitu. Jsou produkovány hybridizovaným klonováním imortilizovaných B-lymfocytů pocházející z jedné mateřské buňky. [12] [13]

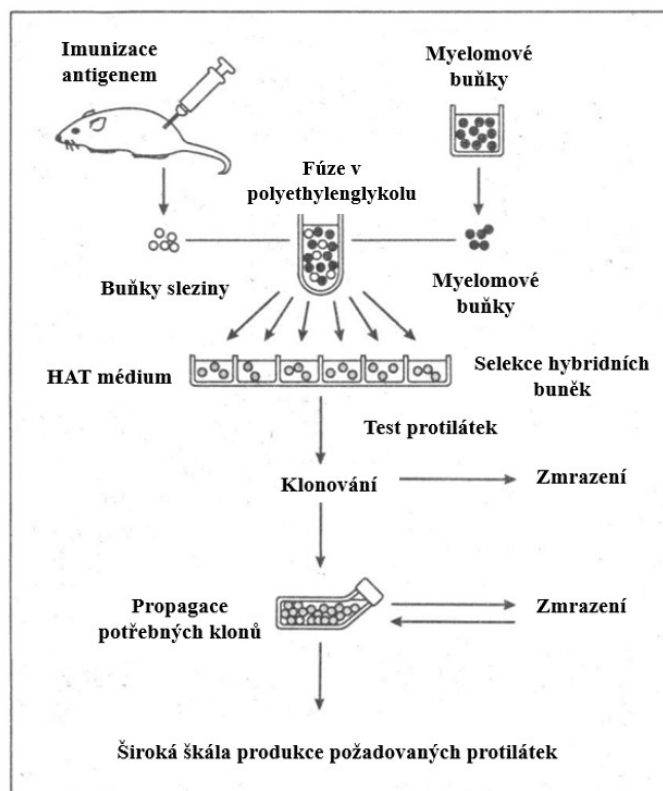
Celý proces jejich produkce neprobíhá přímo v organismu. K získání je sice zvířecí organismus potřeba, ale výsledné mAbs jsou produkovány buněčnou kulturou mimo organismus. K produkci se nejčastěji využívají myši nebo králíci. [3]

5.4 Produkce monoklonálních protilátek

První, kdo se produkcí mAbs zabýval byl George Kohler a Cesar Milstein z Laboratoře molekulární rady a lékařského výzkumu v Cambridge. V roce 1975 poprvé popsali systém produkce čistých protilátek se známou specifitou. Vyvinuli způsob, jak rutinně produkovat mAbs v prakticky neomezeném množství. Samotná produkce je založená na hybridomové technologii. [13] [14]

Myš je opakovaně imunizována požadovaným antigenem. Proces imunizace je obdobný jako u produkce pAbs. Její slezina, která obsahuje proliferující B-lymfocyty, se odstraní z těla a odebraná tkáň je zhomogenizována na buněčnou suspenzi. Vzniklá suspenze obsahuje B-lymfocyty produkující protilátky proti injektovanému antigenu. V následujícím kroku probíhá hybridizace. Dochází k fúzi B-lymfocytů s myelomovou buněčnou kulturou. Myelomové buňky se využívají proto, že mají vysokou schopnost proliferace. Spojením těchto dvou druhů buněk vznikají hybridní buňky, které mají vlastnosti jak B-lymfocytů (produkce specifických protilátek), tak myelomových buněk (nesmrtelný charakter). Hybridomy jsou umístěny do selektivního HAT média (Hypoxantin Aminopetrin Thymidin médium), kde dochází k selekci pouze hybridních buněk. Ostatní buňky nejsou schopny v médiu proliferace a umírají. [14] [15]

Získané hybridní buňky produkují specifické protilátky. Hybridomová kultura se v mikrotitrační destičce zředí na jednu buňku v jamce. Z každé jednotlivé buňky se kultivují kolonie, které produkují specifickou mAb. Před použitím je nutné protilátky purifikovat. Jelikož imunoglobuliny jsou glykoproteiny lze zde využít stejné metody purifikace jako u proteinů. Purifikace se dá provést pomocí iontově-výměnné chromatografie, antigen-afinitní chromatografie, gelové chromatografie či extrakcí na pevnou fázi. [13]



Obrázek 1 – Schématické znázornění produkce monoklonálních protilátek (převzato a upraveno z Llewelyn a kol., 1992) [14]

Nejčastější provedení screeningu protilátek zajišťuje ELISA. ELISA může využívat k detekci antigenu kombinaci mAbs a pAbs. Nepřímá a sendvičová ELISA jsou 2 typy imunotestů, u kterých se k analýze využívají oba typy protilátek. Nejdříve se aplikují mAbs kvůli jejich vysoké specifitě k cíli. pAbs se přidávají jako druhé, protože jsou schopny amplifikovat nízký signál s vysokou citlivostí. V citlivých imunotestech, kde se vyšetřuje neznámý patogen je vhodné použít pAbs, protože ty umí rozpoznat více epitopů na antigenu. Jestliže patogen/antigen byl již dříve charakterizován, je vhodnější v následných aplikacích použít mAbs. mAbs se v klinické praxi využívají k diagnostice různých onemocnění. mAbs se vážou na jediný epitop antigenu, a proto lze přesně identifikovat patogen. [16] [17]

5.5 Rekombinantní protilátky

rAbs jsou synteticky připravené mAbs, které ke své produkci nevyžadují zvíře jako hostitelský organismus. Existuje několik formátů rAbs. Jedno řetězcový variabilní fragment (scFv) je nejmenší formát rAbs, který je schopen vazby na antigen. rAbs se využívají na stejné účely jako mAbs. [18] [19]

5.6 Produkce rekombinantních protilátek

Rekombinantní protilátky se vyrábí geneticko-molekulárními metodami, známé jako fágový displej, kvasinkový displej nebo displej savčích buněk. Nejběžněji využívaný je fágový displej. Fágový displej byl poprvé popsán v roce 1985 Georgem Smithem. Tato strategie zahrnuje vytvoření knihovny, výběr specifické protilátky a afinitní zrání. Knihovny se skládají z fragmentů genů protilátek. Nejčastěji se jedná o Fab (fragment oblasti vázající antigen) nebo scFv (jedno řetězcový variabilní fragment) fragmenty, protože jsou menší, ale stále mají vysokou afinitu ke svým cílům. Fragmenty genů protilátek jsou prezentovány na povrchu bakteriofágu. Každý fág nese odlišný gen protilátky. Zdroj genů protilátek může být buď přirozený nebo syntetický. Syntetický má tu výhodu, že k získání genů není potřeba živý organismus. [18] [19] [20] [21]

Selekční proces, kdy dochází k výběru vhodné protilátky se jmenuje „panning“. V mikrotitrační destičce je umístěn imobilizovaný antigen, který se inkubuje s knihovnou. Během inkubace dochází k navázání protilátek na antigen. Po inkubaci jsou nepotřebné protilátky odstraněny a specifické protilátky jsou eluovány a následně amplifikovány v bakteriálním hostiteli. Výsledná protilátková DNA je klonována do expresních vektorů a transformována do bakterie *Escherichia coli*. Na agarové plotně vznikají kolonie, z nichž každá představuje jednu mAb. Molekuly protilátek jsou testovány na specifitu a poté jsou sekvenovány, aby se identifikovali jednotlivé protilátky. Ty jsou pak exprimovány a purifikovány. Hlavní výhodou rAbs je jejich modifikace pro různá diagnostická využití. rAbs lze použít v diagnostických platformách jako jsou např. laterální chromatografické testy, Luminex (bead-based assays), průtoková cytometrie, test proximální ligace nebo molekulární zobrazování. [19] [20] [21]

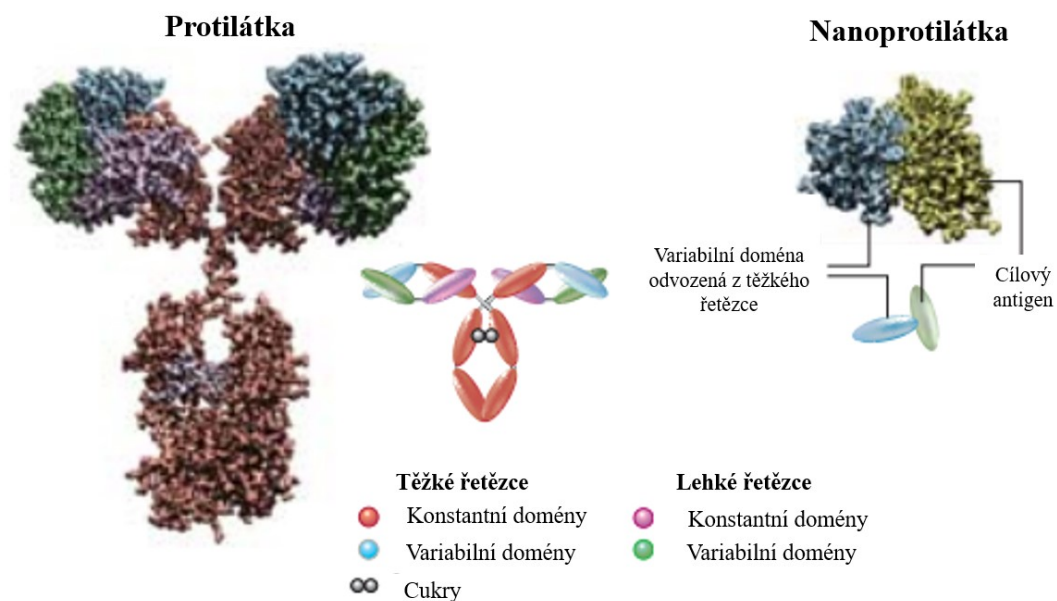
Tabulka 2 – Základní rozdíly mezi hybridomovou technologií a fágovým displejem [21]

Vlastnosti	Hybridomová technologie	Fágový displej
Zvíře	vyžadováno	nevyžadováno
Afinitní zrání	in vivo	in vitro
Up-scaling	intraperitonální metody	bakteriální expresní systém
Značení	chemické	biochemické, chemické
Antigen proti toxinům	nemožné	možné
Terapeutické aplikace	reakce imunitního systému člověka	žádná
Selekční podmínky	malá kontrola nad produkovanou protilátkou	precisní manipulace
Inženýrství	není možné	možné

5.7 Nanoprotilátky

Nanoprotilátky, jinými slovy jednodoménové protilátky jsou rekombinantní, antigen-specifické protilátky, které se skládají pouze z jedné domény odvozené z těžkého řetězce. Tato variabilní doména protilátek s těžkým řetězcem má schopnost vazby na antigen. Z tohoto důvodu je považována za nejmenší přirozeně se vyskytující fragment, který je schopen se vázat na specifický cíl. Jejich velikost se pohybuje v nano molárním měřítku, což jim umožňuje jednoduše pronikat do tkání a tam se navázat na cílovou molekulu. [22] [23]

V roce 1993 Hamers, Muyldermans a kol. zveřejnili publikaci, kde uvedli, že v těle dvouhřbých velbloudů a jihoafrických lamách kolují nekompletní protilátky, které postrádají lehký řetězec. Funkce těchto nově nazvaných nanoproti látek je stejná jako u protilátek normálních. Na rozdíl od normálních jsou menší a hydrofilnější, a to jim umožňuje vyšší rezistenci na vysoké teploty a pH. Produkce nanoproti látek spočívá v imunizaci velblouda nebo lamy cílovým antigenem. Zvíře začne produkovat kompletní protilátky i protilátky jen s těžkými řetězci. Z odebraného krevního vzorku se vyberou pouze ty buňky, které produkují protilátky pouze s těžkými řetězci a zároveň mají vhodnou afinitu ke specifickému cíli. Z této buňky se získá DNA sekvence genů kódující tuto nanoproti látku a tato sekvence se následně zpracovává pomocí genového inženýrství podobně jako u rekombinantních protilátek. [24]



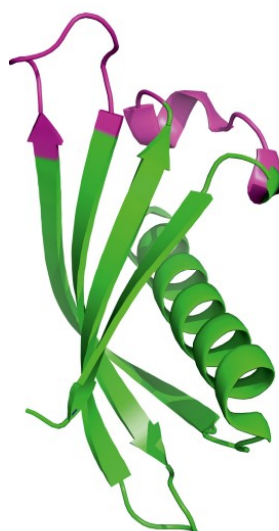
Obrázek 2 – Rozdíly ve struktuře protilátky a nanoproti látky (převzato a upraveno z Gibbs, 2005) [24]

Nanoproti látky se uplatňují ve výzkumu, terapii a diagnostice. V in vitro diagnostických testech slouží ke screeningu infekčních či maligních onemocnění. Používají se jak u sendvičové, tak u kompetitivní ELISA metody. Jsou velice citlivé,

proto je lze využít i v elektrochemických metodách, kde je mez detekce až 1000x citlivější než u metody ELISA. V diagnostických testech in vivo jsou nanoprotilátky vhodné indikátory pro neinvazivní zobrazování. Malá velikost, která je hluboko pod hranicí ledvinové clearance, umožňuje nanoprotilátkám rychlou eliminaci z krve. To je přesně potřeba pro dobré in vivo zobrazení. Metody, kde se nanoprotilátky využívají jsou SPECT (jednofotonová emisní počítačová tomografie) nebo PET/CT (pozitronová emisní tomografie/počítačová tomografie). [25] [26]

5.8 Affimery

Affimery jsou malé, stabilní rekombinantní proteiny založené na stabilním proteinovém skeletu, odvozeném od cystatinů ze skupiny cysteinových inhibitorů proteáz. Molekula affimeru se skládá z centrálního β listu, který je obklopený α helixem se dvěma variabilními vazebnými smyčkami a každá z nich obsahuje devět aminokyselin. Přítomné aminokyseliny mohou být nahrazeny různými náhodnými sekvencemi a ty se následně použijí ke generování affimerových knihoven. Affimerová knihovna obsahuje 10^{10} klonů, které umožňují screening molekul vázajících proteiny. Affimerové proteiny jsou generovány z bakteriálních expresních systémů (fágový displej) pomocí genového inženýrství. [27]



Obrázek 3 – Znárodnění struktury affimeru (převzato z Tiede a kol., 2017) [28]

Affimerová technologie je komerčně dostupná prostřednictvím společnosti Avacta Life Sciences. Affimery jsou účinnými nástroji v molekulární či buněčné biologii. Dají se využít v metodách jako je ELISA, western blotting, in vivo zobrazování, v biosenzorech nebo imunohistochemii. Nelze konstatovat, že by affimery zcela zastupovaly funkce protilátek. Spíše se využívají jako doplňkové či alternativní nástroje ke screeningu protilátek. [28]

6. APTAMERY

Aptamery (odvozené od latinského slova aptus – vhodný a řeckého meros – část) jsou oligonukleotidy, neboli krátké řetězce kyseliny ribonukleové (RNA) nebo jednovláknové deoxyribonukleové (ssDNA), které jsou schopné se vázat na specifický cíl jako jsou ionty, malé organické molekuly, proteiny a živé buňky. Aptamery mají trojrozměrnou strukturu a umí specificky rozpoznat cílovou molekulu. Můžeme je proto nazývat chemickými neboli synteticky vyrobenými bioreagenciemi. Aptamery jsou vybírány z obrovských knihoven náhodných nukleotidů. Ty mohou obsahovat až 10^{16} jedinečných sekvencí. Dnes už známe několik aptamerů s vysokou afinitou a specifitou, které lze využít k diagnostickým a terapeutickým účelům. Průmysl, který se zabývá aptamery rychle roste. V současné době se více než 40 firem aktivně podílí na výzkumu těchto syntetických protilátek. Jejich cílem je, aby se aptamery staly globálními a komerčními složkami, které budou běžně dostupné. Některé aptamerové produkty již můžeme nalézt na trhu, jiné se využívají pouze ve výzkumu. [29]

Trojrozměrná struktura a stabilní konformace aptamerů zajišťují specifickou vazbu s cílovou molekulou, a to prostřednictvím vodíkových vazeb či hydrofobními, coulombickými a van der Waalovými interakcemi. Vazebné afinity aptamerů k cílům jsou obecně v rozmezí 1pM a 1 μ M. Vazebné afinity mezi aptamery a proteiny jsou v nanomolárním rozsahu. [30]

6.1 *Vznik a objev aptamerů*

Odborný název „Aptamer“ mu udělil Andy Ellington, který se společně s Jackem Szotakem aptamery zabývali. První byly popsány RNA aptamery a až poté ssDNA aptamery. DNA je stabilnější než RNA, což umožňuje snadnější proces selekce.

Naproti tomu RNA tvoří rozsáhlejší 3D struktury a zároveň mohou být syntetizovány přímo uvnitř buňky. [31] [32]

Prvotní výzkumy aptamerů se prováděly na virech. Bylo zřejmé, že nukleové kyseliny, jak DNA, tak RNA mohou fungovat jako ligandy. To znamená, že mohou upravovat aktivitu cílových proteinů. V roce 1980 probíhal výzkum viru HIV a adenovirů, kde bylo zjištěno, že právě tyto viry jsou schopné kódovat malé struktury RNA, které se s vysokou specifitou a afinitou vážou na buněčné proteiny. Konkrétně bylo prokázáno, že virus HIV vyvinul krátkou strukturovanou RNA sekvenci, která se nazývá trans-aktivační odpověď neboli zkráceně TAR. TAR RNA se váže na buněčné a virové proteiny cyklin T1 a Tat. Oba tyto proteiny se účastní řízení genové exprese a virové replikace. O 10 let později v roce 1990 byla provedena první studie, která potvrzovala, že RNA aptamer může být použit k zastavení aktivity patogenního proteinu. [33] [34]

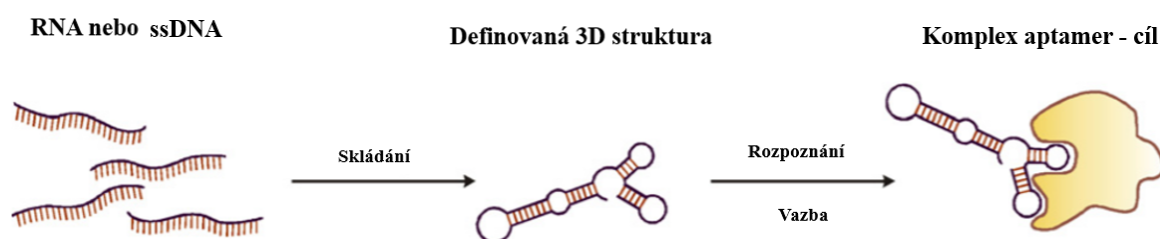
Ve stejném roce prováděly dvě na sobě nezávislé laboratoře intenzivní výzkum, kde se vědci zabývali izolací a amplifikací specifické sekvence nukleové kyseliny *in vitro*. Ukázalo se, že nukleová kyselina je schopná se vázat s vysokou afinitou na specifický cíl. Technika byla nazvána jako SELEX a vzniklé oligonukleotidy byly označeny jako aptamery. Podrobnější popis je popsán v kapitole SELEX. [35]

Právě tyto aptamery v tomto výzkumu prokázaly, že jsou srovnatelné, ne-li lepší než mAbs. Obrovský potenciál aptamerů může být využit v diagnostických, terapeutických a bioanalytických aplikacích. [35]

6.2 Riboswitch

Hlavní funkcí RNA je přenos genetické informace. To však zdaleka není jediná funkce této nukleové kyseliny. RNA je schopna regulace biologických funkcí, a to pomocí riboswitchů. Riboswitche, jinými slovy přírodní aptamery, jsou součástí mRNA. Konkrétně se nachází v 5' UTR (untranslated region) mRNA. Riboswitche se skládají ze dvou částí. Jedné z nich se říká aptamer. Je to efektorová část riboswitche, protože je schopná vazby na ligand. Podle této části jsou pojmenované synteticky vyrobené aptamery. Druhá část – expresní doména – se věnuje expresi. Obsahuje strukturální „přepínač“, který se kříží s transkripčním nebo translačním mechanismem. [36]

Jak riboswitche, tak aptamery vytváří selektivní kapsy, které jsou schopny vazby na cílové metabolity. Jakmile dojde k navázání cílové molekuly, dojde ke strukturální změně v kapse aptameru. Strukturální změny jsou sděleny expresní doméně riboswitche. Ta je propojena s transkripčním a translačním aparátem. Spustí se transkripční a translační mechanismus, poté dojde ke zpracování RNA (např. sestřihu) a tím pádem produkce proteinu je dynamicky regulována. Výsledkem tohoto celého procesu je, že cílové metabolity mohou kvantitativně regulovat genovou expresi v buňkách. [37]



Obrázek 4 – Schématické znázornění struktury a funkce aptameru (převzato a upraveno ze Stoltenburg a kol., 2007) [31]

V některých situacích bylo prokázáno, že riboswitche vykazují vyšší afinitu než příslušné syntetické aptamery. Například riboswitch pro guanin má afinitu $K_d = 0,0047 \mu\text{M}$, avšak syntetický aptamer $K_d = 1,3 \mu\text{M}$. To už je rozdíl o několik řádů. Je to z toho důvodu, že syntetické aptamery jsou vybrány pomocí cílů imobilizovaných na pevné podložce, a proto je k dispozici méně funkčních skupin, které jsou schopné vazby na aptamer. Naopak riboswitche se vyvíjí s ostatními molekulami v roztoku, a to umožňuje další chemické interakce s nukleovou kyselinou. Syntetické aptamery jsou připravovány in vitro a může se stát, že v in vivo systému budou selhávat. Řešením je vytvořit takový syntetický aptamer, který se svými vlastnostmi, co nejvíce podobá riboswitchi, jehož hlavní výhodou je, že je schopen lépe fungovat v živém prostředí, neboť se jedná o strukturu vyskytující se v přirozených systémech. Na druhou stranu, syntetické aptamery se vážou na malé cílové molekuly jako jsou léčiva či syntetická barviva. Je logické, že organismy nevyvinuly přirozené riboswitche vázající se na tyto typy uměle vytvořených molekul, proto je nelze v těchto interakcích využít. [37]

6.3 SELEX

SELEX je zkratka odvozená od Sequential Evolution of Ligands by EXponential enrichment. Do češtiny bychom to mohli přeložit jako Sekvenční Evoluce Ligandů Exponenciálním obohacováním. SELEX je laboratorní postup, ve kterém dochází k selekci aptamerů z rozmanité knihovny nukleových kyselin. K výběru vhodného aptameru je nutné provést několik SELEX cyklů, aby byl získán aptamer s požadovanými vlastnostmi. [38]

Bylo prokázáno, že nukleové kyseliny jsou vhodné biologické sloučeniny pro kombinatorickou chemii. Jejich atraktivnost je daná tím, že jsou schopny skládat se do sekundárních a terciárních struktur a zároveň mohou být snadno amplifikovány pomocí metody PCR nebo in vitro transkripcí. Tato metoda byla poprvé uvedena na svět v roce 1990 Tuerkem a Goldem. Tito dva vědci využili knihovnu nukleových kyselin k selekci RNA oligonukleotidů (aptamerů), které se pevně a selektivně vážou ke správnému cíli. Nezávisle na tom Ellington a Szostak používali podobný postup izolace a výsledným molekulám dali název aptamer. Z knihovny RNA selektivně izolovali RNA molekuly, které mají tu schopnost se skládat do stabilní trojrozměrné struktury a tím vzniká specifické vazebné místo pro malé molekuly. O dva roky později byl představen úspěšný výběr jednořetězcových sekvencí DNA z chemicky syntetizovaného souboru molekul DNA s náhodnou sekvencí. Tyto DNA aptamery dokázaly rozpoznat a vázat ligandy, a tedy bylo prokázáno, že i DNA molekuly mají schopnost vazby, stejně jako RNA aptamery. Nyní se ve výzkumu i klinické praxi využívají oba typy nukleových kyselin. Od objevení nové technologie SELEX se tato metoda stala velice využívanou, a to nejen v molekulární biologii, ale také ve farmacii a v lékařství. [31]

Vše začíná v oligonukleotidové knihovně. V knihovně jsou shromážděny afinitní řetězce RNA nebo ssDNA, které obvykle obsahují přibližně $10^{13} - 10^{15}$ různých sekvencí. Pro selekci DNA aptamerů můžeme tuto metodu využít přímo, a to bez jakékoli předchozí úpravy. Sense a antisense primer, který je odvozen ze specifických sekvencí na 5' a 3' konci molekuly, umožňují amplifikaci vybraných oligonukleotidů v každém SELEX kole. K amplifikaci se používá metoda PCR. Ta nám rovněž poskytuje několik kopií původních oligonukleotidů a ty nám mohou sloužit jako amplifikační šablony. Naopak u selekce RNA aptamerů je potřeba před zahájením

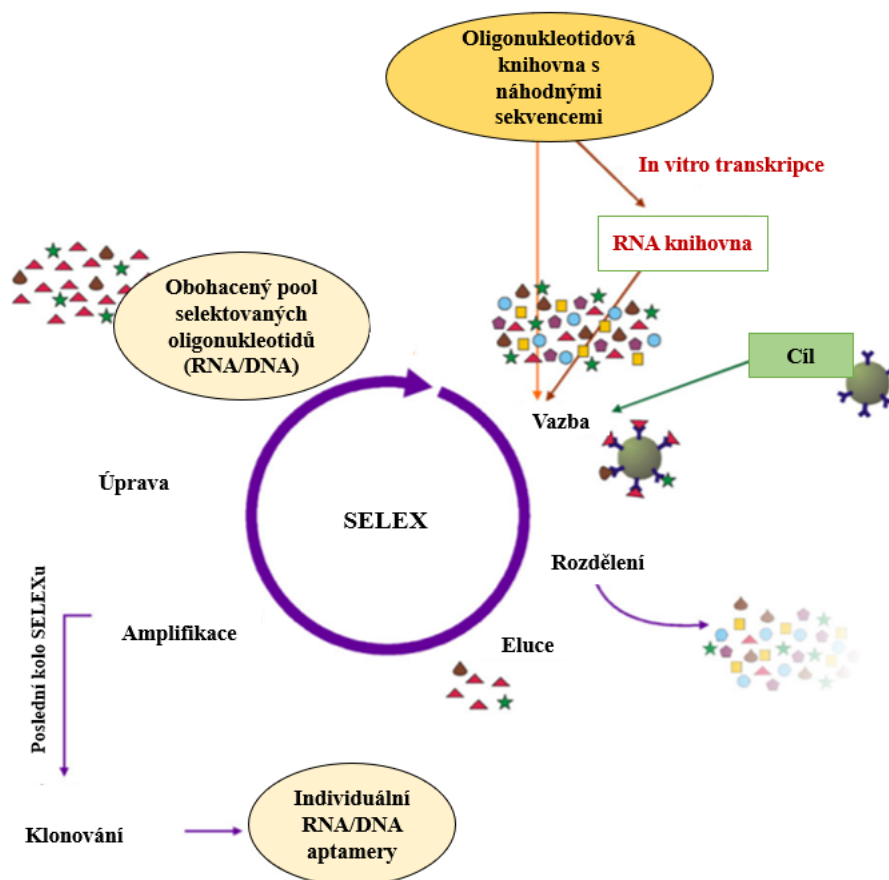
procesu transformovat DNA knihovnu na RNA knihovnu. SELEX určuje, jaké aptamery jsou nejvhodnější vzhledem k cílové molekule. [31] [39]

Celý proces můžeme rozdělit do 3 hlavních kroků:

- 1) *Selekce* – Úkolem je z oligonukleotidové knihovny vybrat aptamer s nejvyšší afinitou a specifitou k cílové molekule. Selekcce zahrnuje další 3 kroky vedoucí k výběru výsledné molekuly – *vazba, rozdělení a eluce*. Nejdříve musí dojít k navázání vhodného aptameru k cílové molekule. Takto dojde k rozdělení oligonukleotidů na ty, které se vážou k cíli a na ty, které se nevážou. Nenavázané oligonukleotidy jsou odstraněny pomocí promývání pufovaným roztokem. Cílová molekula je imobilizována na matricovém materiálu. Matricový materiál je např. agaróza nebo magnetické kuličky. Existují i rozdělovací metody bez využití imobilizace cíle. Takovou metodou je např. ultrafiltrace. Posledním selekčním krokem je eluce navázaných aptamerů. Aptamery se dají eluovat denaturačními metodami nebo látkami jako je urea, SDS nebo EDTA.
- 2) *Amplifikace* – Oligonukleotidy získané selekcí je nutné zmnožit. RNA aptamery musí nejdříve projít RT-PCR, aby bylo dosaženo odpovídající cDNA. Poté je provedena amplifikace pomocí PCR. ssDNA aptamery podstupují pouze PCR. Takto se vytvoří výchozí soubor pro další kola selekce.
- 3) *Kondicionace (úprava)* – před dalším kolem je nutné oligonukleotidy upravit tak, aby mohly být použity v dalším cyklu. Po provedení PCR jsou oligonukleotidy ve formě dsDNA. V případě RNA aptamerů musí následovat transkripce T7 RNA polymerázy. Vzniklé RNA molekuly jsou použité v dalším kole SELEX. U DNA aptamerů je situace o něco složitější, protože musí být provedena separace jednoho řetězce. Existuje několik metod, jak separaci provést, aby se z dsDNA získala ssDNA. Mezi nejvyužívanější se řadí použití systému asymetrické PCR, kdy se použije mnohonásobně větší množství jednoho primeru k získání ssDNA.

Výsledkem těchto pěti kroků je získání velkého množství RNA nebo ssDNA, které se téměř shodují s cílem. Je potřeba tento proces opakovat několikrát, dokud nenajdeme jeden jediný konkrétní řetězec oligonukleotidu, který se nejlépe váže k cíli.

Obvykle bývá provedeno 6 až 20 jednotlivých provedení SELEX, abychom získali vhodný afinitní aptamer. [31] [40]



Obrázek 5 – Grafické znázornění průběhu procesu SELEX (převzato a upraveno ze Stoltenburg a kol., 2007) [31]

6.4 Modifikace procesu SELEX

V současné době se ve světě aptamerů objevují 2 hlavní překážky, které brání ve vývoji a aplikaci aptamerů. Zaprvé se jedná o to, že SELEX je časově náročný a rovněž míra úspěšnosti je nízká. Druhým problémem je to, že většina současných aptamerů se získává in vitro a není jednoduché určit, zda jejich funkce v in vivo systému bude správná. Dnes se využívá mnoho modifikací, které byly vyvinuty na základě originální metody a pomáhají zrychlit a zkvalitnit celý proces. Originální metoda se používá jen zřídka, ale všechny modifikace z ní vycházejí. [41]

1) Negativní SELEX

V roce 1992 Ellington a Szotak předložili novou metodu, kterou nazvali negativní selekce. Negativní selekce zajišťuje, že sekvence jsou nejprve vystaveny nežádoucím cílům. Dojde k odstranění nescifických vazebných látek, které by v procesu zbytečně interferovaly. Bylo zjištěno, že díky negativní selekci byla afinita aptamerů až 10x vyšší. Dnes se negativní selekce využívá zcela běžně k eliminaci sekvencí, které interagují s imobilizační maticí. Velice podobná metoda negativní selekci se jmenuje Counter SELEX. Ta se odlišuje tím, že se používají podobné cílové molekuly jako inkubační subjekty. Na rozdíl od originální metody SELEX se do Counter SELEX procesu přidává další krok, který spočívá v přidání strukturálně podobných cílů k inkubaci s aptamery. To má za následek účinné oddělení nescifických nukleotidů a tímto se stává metoda ještě specifitější. Hlavní rozdíl mezi Counter SELEX a Negative SELEX je použití odlišných inkubačních objektů. [41] [42]

2) Cell SELEX

Cell SELEX využívá živé buňky jako cíl, a to zvyšuje možnost, že vybraný aptamer může být přímo použit pro diagnostické a terapeutické účely. Další výhodou je, že není potřeba purifikace proteinu nebo předchozí znalost molekulárních cílů na buněčném povrchu před samotnou selekcí. Dále by tato mohla být použita k objevování nových biomarkerů nebo neznámých povrchových proteinů. Využívají se buňky jak prokaryotické, tak eukaryotické. Oligonukleotidová knihovna je inkubována s celými buňkami. Cell SELEX může vyžadovat až 35 selekčních kol, avšak nejčastěji stačí pouze 8-10 kol k získání aptamerů s vysokou afinitou. Touto metodou byly vytvořeny aptamery proti různým druhům rakoviny. [32] [41]

3) In Vivo SELEX

Je známo, že vybrané in vitro aptamery nemusí fungovat v živém organismu, proto byla vyvinuta metoda In Vivo-based SELEX. Ta umožňuje generovat aptamery uvnitř organismu. Využívají se k tomu zvířecí modely s cílovou chorobou. V roce 2010 Mi a kolektiv pokusili selektovat aptamery uvnitř nádoru živého organismu. RNA aptamery byly injekčně podány do ocasní žíly myši s intrahepatálním nádorem. Poté se z jaterních nádorů extrahovaly aptamery a ty byly dále amplifikovány a znovu aplikovány jiným myším se stejným nádorem. Ve výsledku byly úspěšně vybrány aptamery s afinitou k p68 a RNA helikáze. [32]

SELEX modifikací dnes existuje celá řada. Můžeme sem dále zařadit: Kapilární elektroforézní SELEX, Mikrofluidní SELEX nebo Vysoko propustně sekvenující SELEX a mnoho dalších. [41]

S tímto souvisí i post-SELEX modifikace. Molekuly RNA se využívají častěji kvůli jejich rozmanitosti v 3D struktuře, kterou vytváří snáz než DNA. Tento jev je způsoben přítomností další hydroxylové skupiny na 2' pozici ribózy a také kvůli jejich přirozené jednovláknové struktuře. Nicméně jejich značnou nevýhodou je, že všudypřítomné nukleázy štěpí RNA. Z tohoto důvodu jsou do struktury RNA zaváděny chemicky modifikované nukleotidy. Ty zvyšují nukleázovou rezistenci RNA aptamerů. Může se stát, že využití post-SELEX modifikací sníží afinitu aptameru. Z toho důvodu afinita aptameru měla být pečlivě sledována po každém provedení modifikace. [32]

6.5 Detekční technologie založené na aptamerech

V detekčních technologiích se využívá značení aptamerů, aby bylo možné cílový analyt správně detekovat a popřípadě i kvantifikovat. Ke značení se využívají enzymy, nanočástice, komplex streptavidin-biotin, kvantové tečky či fluorescenční barviva. V diagnostice se rovněž uplatňují i neznačené aptamery, u kterých je k detekci využívána jejich změna konformace.

6.5.1 ELONA

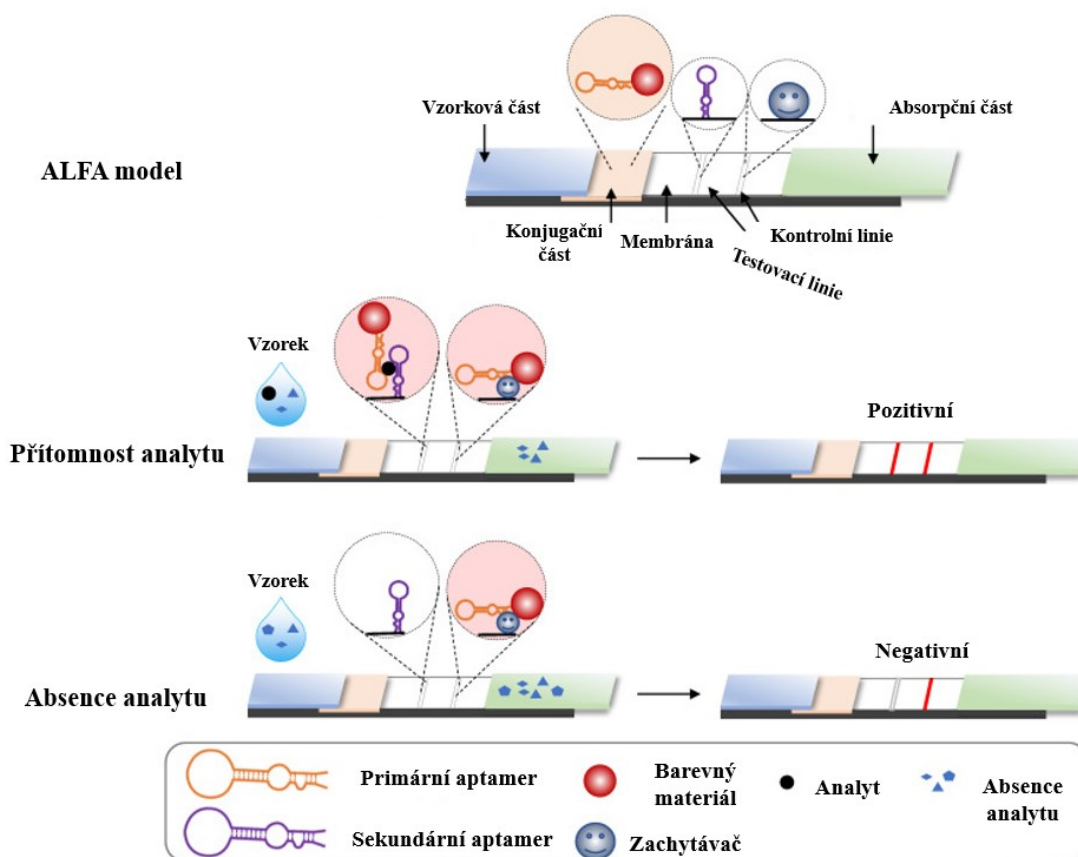
ELONA (Enzyme-linked oligonukleotide assay) funguje na stejném principu jako ELISA. Rozdíl je v tom, že místo protilátek využívaných v ELISA se v metodě ELONA využívají oligonukleotidy. Ty slouží jako hlavní molekulární rozpoznávací prvek. [43]

Při použití aptamerů se metoda nazývá ELASA (enzyme-linked aptasorbent assay). Existuje několik různých konfigurací jako je např. přímá, nepřímá nebo sendvičová ELASA. Aptamery se dají snadno označit biotinem, což vzájemně neovlivňuje specifitu ani afinitu. ELASA má stejné možnosti využití jako ELISA. Může být použita ke screeningu nelegálních drog či k domácí detekci těhotenství. Je to také užitečný nástroj pro posouzení vazby mezi poolem nukleových kyselin z každého jednotlivého cyklu SELEX a cílovým antigenem. To např. usnadnilo generování aptameru proti *Shigella sonnei*. ELASA metoda má výhodu oproti ELISA v tom, že je

znovupoužitelná. Protilátky trpí trvalou degradací, která znemožňuje opakování testu. Aptamery v ELASA metodě lze opakovaně regenerovat a následně použít. Regeneraci lze provést uvolněním antigenu pomocí tepla nebo horké vody. [44]

6.5.2 ALFA

Aptamery můžeme použít místo protilátek při laterálním chromatografickém testu (lateral flow assay, LFA). Oproti protilátkovému LFA testu je ALFA test (Aptamer-based lateral flow assay) flexibilnější a je schopný detekovat širší rozsah cílů. Metoda je založená na bázi papírového testu navrženého pro detekci molekul v kapalných vzorcích. Princip u ALFA je totožný jako u protilátkového LFA. Jde o afinitní interakce, kdy je cíl zachycen imobilizovaným senzorem na viditelné čáře. Testovací proužek se skládá z několika částí: vzorková část, konjugační část, testovací linie s imobilizovanými sekundárními aptamery, kontrolní linie a absorpční část. ALFA má dva formáty provedení – sendvičový a kompetitivní. U sendvičové ALFA se používají dva druhy aptamerů – primární (značený) a sekundární (imobilizovaný). Na vzorkovou část se aplikuje vzorek. Jestliže se ve vzorku nachází cílová molekula, naváže se na primární aptamer označený značkou. Tento konjugát následně putuje do střední části proužku na testovací linii. V oblasti testovací linie se primární aptamer s cílovou molekulou naváže na sekundární aptamer a dojde ke zbarvení proužku. V případě správného provedení testu dojde ke zbarvení i na kontrolní linii. Pokud se ve vzorku nenachází cílová molekula, nedojde k navázání na primární aptamer. Ten se nemůže navázat na aptamer sekundární, proto se značený aptamer zachytí až na kontrolní linii. Ke zbarvení tedy dojde až tam. Na papírovém proužku se objeví pouze jedna čárka v oblasti kontrolní linie. [43] [45]



Obrázek 6 – Schématické zobrazení funkce ALFA (převzato a upraveno z Wan a kol., 2021) [43]

Proces kompetitivní ALFA je mírně odlišný a lze ho využít jen pro malé molekuly s jedním epitopem. Existuje vícero metod detekce. Záleží na tom, jaká záchytná molekula na testovací linii se použije. Např. Ochratoxin A (OTA) je druh malomolekulárního mykotoxinu pouze s jedním vazebným epitopem. Wang a kol. vyvinuli kompetitivní biosenzor založený na OTA aptamerech, které jsou značeny zlatými částicemi sloužící k vizuální detekci. Biotinem modifikovaný komplementární řetězec (DNA sonda 1) je imobilizován vazbou streptavidinu na testovací linii. Biotinem modifikovaná DNA sonda 2 je imobilizovaná na kontrolní linii. Princip detekce je založen na kompetitivní reakci mezi DNA sondou 1 a cílovou molekulou OTA o vazbu na AuNP-aptamer (aptamer značený zlatými nanočásticemi). Jestliže je OTA přítomný ve vzorku, naváže se na AuNP-aptamer, což snižuje koncentraci volného AuNP-aptameru. Volný AuNP může hybridizovat se sondou DNA 1 na testovací linii, a to způsobuje zbarvení proužku. Při přítomnosti cílové molekuly ve vzorku je intenzita zbarvení proužku slabší. Z toho vyplývá, že koncentrace analytu ve vzorku je nepřímo

úměrná intenzitě barevného signálu. Platí, že čím více OTA je ve vzorku, tím slabší je intenzita na testovací linii. Na kontrolní linii dochází k hybridizaci se sondou 2 bez ohledu na přítomnost nebo nepřítomnost cílové molekuly. [46] [47]

Očekává se, že v blízké budoucnosti by se ALFA mohla objevit na trhu. Před uvedením ALFA na trh musí být provedeno testování, aby bylo možné použít test i mimo výzkumnou laboratoř, protože podmínky v laboratoři nejsou shodné s podmínkami v praxi. Komerční využití ALFA bude mít značný význam na diagnostiku. Jelikož umožňuje detekci s vysokou citlivostí i reprodukovatelností, bude ji možné využít k diagnostice proteinů, hormonů, mikroorganismů i antibiotik. [48]

6.5.3 Aptasenzory

Biosenzory jsou detekční systémy pro biologické analyty. Jako snímací prvek obsahují biologickou složku. U aptasenzoru tuto funkci zastupují aptamery. Aptasenzory mohou být optické, elektrochemické a hmotnostně citlivé. [43]

Optické senzory se dělí na značené a neznačené. Značené aptamery se konjugují s opticky aktivními molekulami jako je např. fluorescenční barvivo fluorescein. Na jeden konec aptameru se naváže fluorescenční sonda a na ten druhý zhášec (obvykle guanin). Sonda a zhášec jsou blízko sebe, a proto je intenzita fluorescence minimální. Při přidání analytu se změní konfigurace aptameru. Fluorescenční sonda se vzdaluje od zhášeče a dochází ke zvýšení intenzity fluorescence. Tento jev je vnímán jako odezva senzoru, která je následně detekována. V optických biosenzorech našly své uplatnění i kvantové tečky. Kvantové tečky jsou koloidní nanokrystalické polovodiče. V kombinaci s aptamery tvoří různé detekční systémy a přináší více možností pro bioanalýzu. Používají se v aptasenzorech díky svým fluorescenčním vlastnostem. Kvantové tečky připojené k aptameru vysílají optický signál, to znamená, že jsou v zapnutém stavu. Jakmile se přidá analyt, okamžitě dojde k vazbě aptamer-analyt a tento komplex zháší emisi kvantových teček a přechází do stavu vypnutého. Z toho vyplývá, že vazba aptamer-analyt způsobuje změnu signálu, který lze jednoduše detekovat. [43] [49] [50]

Nejběžnější metoda využívaná u opticky neznačených senzorů je metoda plazmonové rezonance (SPR). Principem SPR je excitace povrchových plasmonů na kovovém povrchu (Ag, Au). Laserový paprsek dopadá skrz hranol na kov pod určitým úhlem. Plasmony jsou excitovány a při určitém úhlu dopadu dochází k rezonanci.

Rezonanční úhel se velmi citlivě mění v přítomnosti biomolekul. Povrchové plasmony jsou citlivé na absorpční jevy. Změny úhlu dávají signál. Ten je úměrný hmotnosti biomolekul. U aptasenzorů jsou biomolekuly reprezentovány aptamery, které jsou imobilizovány na kovovém povrchu. Když se analyt naváže na aptamer, zvětšuje se hmotnost biomolekul, a tedy dochází ke změně indexu lomu. Změny úhlu se zaznamenávají a mohou sloužit jako kalibrační křivka pro stanovení různých sloučenin. [43] [51]

Jako elektrochemické aptasenzory se nejčastěji využívají senzory voltametrické (amperometrické) a impedimetrické. Principem je převedení mikroproudu nebo mikronapětí na pozorovatelný signál. Při navázání molekuly analytu na aptamer, dochází ke změně konformace aptameu. U redoxních molekul změny indukují tok náboje, který je následně detekován a kvantifikován. [43]

U amperometrických biosenzorů lze provést detekci značenými i neznačenými aptamery. Ke značení se nejčastěji využívají kovalentně vázané enzymy, které jsou přinášeny na povrch elektrody. Ikebukuro et. al představily první elektrochemický aptasenzor. Jejich cílem byla detekce trombinu, ke které využili dva odlišné aptamery selektivní pro trombin. Thiolovaný aptamer byl imobilizován na zlaté elektrodě a druhý byl označen enzymem, konkrétně glukosovou dehydrogenázou. Do měřicího systému obsahující imobilizovaný thiolovaný aptamer se přidal trombin a došlo k vzájemnému navázání. Následně se do systému přidal enzymem značený aptamer, který se hned navázal na trombin. Přidaná glukóza, jakožto substrát pro enzym, vygenerovala proud. Proud byl detekován a měřen. Při detekci neznačenými aptamery se využívá jiných značených molekul, což nevyžaduje proces značení aptameru. [43] [52] [53] [54]

Hmotnostně citlivé aptasenzory neboli aptasenzory quartz crystal microbalance (QCM) fungují na základě piezoelektrického jevu. Piezoelektrický jev indukuje akustické vlny tím, že přivede střídavý proud na křemenný krystal. Aptamer je připojený na povrchu křemenných krystalů potažených zlatem a interaguje s cílovými molekulami. Při vzájemném navázání aptameru a cílové molekuly dojde k povrchovému zatížení. Změní se frekvence vibrací a vzniká fázový posun, který lze detekovat. [43] [55] [56]

6.5.4 Aptahistochemie

V medicíně je imunohistochemie (IHC) nepostradatelná metoda k potvrzení diagnózy různých nádorových onemocnění. [57]

IHC se provádí tak, že vzorek lidské tkáně se zalije do parafinu, zmražený bloček s tkání se nakrájí a obarví. V případě průkazu rakoviny nestačí pouze morfologické zhodnocení vzorku, nýbrž se provádí IHC, kde se využívají protilátky, aby se zjistilo, zda jsou ve tkáni přítomné nebo nepřítomné specifické biomarkery. I v této oblasti mohou být protilátky nahrazeny aptamery. Různé studie prokázaly, že aptamery jsou mnohem citlivější při detekci cíle. Navíc jsou to jsou schopné zvládnout za kratší inkubační dobu (15-20 minut). [58]

DNA aptamer MF3Ec byl použit v aptahistochemickém testu k detekci rakoviny prsu. Ukázalo se, že tento fluorescenčně značený aptamer je schopen rozeznat i různé podtypy tohoto onemocnění. Aptamer MF3Ec dokázal odlišit podtyp rakoviny prsu Luminal A od podtypu Luminal B, a to navzdory tomu, že diferenciální diagnostika těchto podtypů je značně obtížná. [57]

6.5.5 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie se používá k detekci vazby aptamerů na proteiny umístěné na buněčných površích. Např. DNA aptamer, který se váže na lidskou neutrofilní elastázu, je upravován tak, aby navázal fluorescein v různých polohách, daleko od cílového vazebného místa. Intenzita signálu závisí na tom, jakým způsobem byl fluorescein připojen. [59]

Aptamery používané v průtokové cytometrii mají takovou výhodu, že lze na ně navázat jakýkoliv fluorofor. Fluorofor fykoerythrin se konjuguje s aptamerem v poměru 1:1, což umožňuje spolehlivě provádět testy více markerů buněčného povrchu na stejné buňce. Výzkum, který se zaměřuje na testování aptamerů v průtokové cytometrii odhalil, že aptamery konjugované s malými fluorofory i velkými proteiny si zachovávají své vazebné vlastnosti. To podmiňuje jejich schopnost přizpůsobit se různým molekulám používaných v diagnostice. V průtokové cytometrii se aptamery využívají k detekci rakovinných buněk, patogenů nebo v enviromentální analýze, kde se pomocí nich dají detekovat různé patogenní mikroorganismy ve vodě. [58] [59] [60]

6.6 Využití aptamerů v diagnostice

Aptamery nabízejí obrovské využití v biomedicínské diagnostice, protože se používají k detekci biomarkerů onemocnění. [61]

Využívají se pro diagnostiku zejména v oblasti onkologie, kardiologie a očního lékařství. Ilyas et. al. využil aptamer k detekci rakovinných buněk pomocí biosenzoru. Vybral aptamer, který je schopný se navázat na receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR). Tento růstový faktor je exprimován u mnoha typů rakoviny a je to jeden z nejčastěji se vyskytujících onkogenů. U onkologických pacientů je celková koncentrace EGFR zvýšená a podle jeho zastoupení lze určit stádium nemoci nebo progresi v léčbě. I nepatrné změny koncentrace tohoto proteinu v séru mohou být kritické, proto je nutné, aby citlivost detekce proteinu byla co nejvyšší. Následně pomocí biosenzoru, který jako biologickou složku využívá právě aptamer, lze přesně určit koncentraci EGFR v plazmě. [30]

Byly vyvinuty aptamery, které dokážou odhalit rakovinu plic již v brzkých stádiích. Li et. al objevili panel šesti DNA aptamerů, které dokážou rozlišit pacienty s rakovinou plic od zdravých jedinců. Tento systém byl mnohem citlivější než tradiční diagnostické metody, proto by se mohl využívat k záchytu onemocnění již v brzkých stádiích. [29] [62]

Podobně jako u rakoviny plic včasná detekce rakoviny vaječníků je také velmi obtížná. Tsai et al. navrhli mikrofluidní čip, který pomocí magnetických kuliček a aptamerů je schopen detekovat OCC (Ovarian cancer cells) z krve i ve velmi nízkých koncentracích. [29] [63]

Aptamery lze použít k diagnostice virových i bakteriálních infekcí. Dokážou detekovat např. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* a *Mycobacterium tuberculosis*. I když v posledních letech bylo provedeno mnoho výzkumů ohledně použití aptasenzorů k diagnostice infekčních nemocí, stále jich je na trhu nedostatek. Je to dáno tím, že mnoho studií ke svým výzkumům používají bakterie z laboratorních kultur. Tyto kmeny se však mohou lišit od kmenů izolovaných z těla pacientů a mohly by vést k potenciálním falešně negativním/falešně pozitivním výsledkům. [29] [64]

Nedávno byla vyvinuta technologie aptamerových mikročipů. Cílem výzkumu aptamerů na čipu bylo odstranit nevýhody a omezení protilátkových mikročipů. Myšlenka vytvoření aptamerů na čipu je ale obtížně proveditelná v praxi. V mikročipu jsou aptamery imobilizovány na pevném povrchu, což může vést ke ztrátě jejich flexibility, která je důležitá pro jejich skládání do 3D struktury a ta je nezbytná pro vazbu na cílové molekuly. Aby se aptamery mohly vhodně skládat, musí být splněny určité podmínky, které jsou v čipové technologii obtížně proveditelné. [65]

Hlavním problémem použití aptamerů v diagnostice souvisí s nedostatkem standardizovaných protokolů. Různé aptamery, které byly generovány ve stejné laboratoři proti stejnému cíli mohou mít odlišnou primární strukturu, afinitu, specifitu i další chemické parametry. Protokol vyvinutý pro jeden konkrétní aptamer je nepoužitelný pro další aptamer. Tato skutečnost způsobuje problém při použití aptamerů v diagnostice lidských onemocnění. To může být vyřešeno vytvořením standardizovaných kitů a protokolů založených na aptamerech s optimálními vlastnostmi. Klesající ceny nákladů na syntézu a vytváření širokých databází by mohlo vést k vyřešení těchto problémů s aplikací aptamerů. [66]

Další možností, která by mohla urychlit nástup aptamerů do klinické praxe je vysoká poptávka po diagnostických testech. V posledních letech se objevují stále nová onemocnění, která vyžadují rychlou a přesnou diagnostiku. Protilátkové diagnostické testy by mohly být doplněny aptamerovými testy a tím pádem by se zvýšil záchyt onemocnění v brzkých stádiích. [67]

6.7 Aptamery na trhu

Trh s aptamery se neustále rozrůstá, proto lze očekávat, že významně přispěje k diagnostickému průmyslu. Komerční diagnostické produkty na bázi aptamerů jsou produkovány společnostmi po celém světě. Pro diagnostické aptamerové soupravy jsou vyžadovány přísné klinické zkoušky. V současnosti existuje pouze několik komerčních diagnostických souprav pro aptamerové biomarkery, které mohou odhalit různá onemocnění. [68]

Tabulka 3 - Příklady komerčně dostupných diagnostických produktů založených na aptamerech [29]

Produkt	Společnost	Způsob detekce	Použití
OTA-Sense	Neoventures Biotechnology Inc.	Testy na fázi fluorescence	Detekce mykotoxinů
AptoCyto	AptiSci Inc.	Průtoková cytometrie	Detekce buněk pozitivních na biomarkery*
AptoPrep	AptiSci Inc	Test na bázi fluorescence, PAGE	Detekce buněk pozitivních na biomarkery*
SOMAscan	SomaLogic	SOMAmer-based detection and quantification of biomarkers	Detekce nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC)
CibusDx	CibusDx	Elektrochemická detekce	Průkaz alimentárních patogenů
OLIGOBIND	Sekisui diagnostics	Fluorogenic aktivity assay	Průkaz aktivity trombinu
Hot Start <i>Taq</i> DNA polymeráza	New England Biolabs	Reversibilní inhibice <i>Taq</i> DNA polymerázy	Hot start PCR

*Pozitivní biomarkery: CD-31 (adhezní molekula endoteliálních buněk krevních destiček), receptor epiteliálního růstového faktoru (EGFR), receptor hepaticárního růstového faktoru (HGFR), molekula intracelulárního adhesinu (ICAM-2), receptor lidského epidermálního růstového faktoru (HER-2) a receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR-2) [29]

Další společnosti, které se zabývají screeningem aptamerů jsou: AMBiotech, Apta Biosciences, Aptagen, AptaMatrix, Aptamer Group, Aptamer Sciences, Apterna, Aptitude Medical, BasePair Biotechnologies, Neoventures Biotechnology, Novaptech a SomaLogic. [48]

Jakmile dojde k vytvoření sekvence požadovaného aptameru, automatické přístroje syntetizují chemicky vyrobené aptamery na vyžádání. Aptagen je společnost, která nabízí vlastní aptamery pro výzkumné, diagnostické i terapeutické použití. Cena aptamerů závisí na několika faktorech a nelze určit přesnou částku částku. Obecně lze říci, že cena výroby se pohybuje kolem 300\$/gram. [61]

6.8 Budoucnost aptamerů v klinické praxi

Biosenzory na bázi aptamerů nebo podobné testovací metody pro diagnostiku a POCT (point of care testing) se v posledních letech postupně rozvíjí. Jejich výjimečné vlastnosti jako je např. stabilita, zanedbatelná variabilita mezi jednotlivými šaržemi, hospodárnost a vysoká citlivost detekce jsou vhodné i pro použití ve špatně vybaveném prostředí. Aktuálně vědci pracují na tom, aby detekce alergenů v potravinách byla co nejméně časově náročná a zahrnovala snadné postupy. Komplikované odběry vzorků na alergeny mohou způsobit u pacientů anafylaktický šok. K omezení těchto rizik byla použita aptamerová technologie, která dokázala identifikovat arašídové alergeny v potravinách. Tato technologie je spolehlivá v širokém spektru potravinářských matric a reaguje na arašídový protein i ve velice nízkých koncentracích. Zároveň lze tuto technologii převést do uživatelsky přívětivého zařízení. V současné době také probíhá výzkum aptamerových biosenzorů, které by uměly monitorovat onemocnění jako je diabetes mellitus 2. typu. Biosenzor na bázi aptameru byl vytvořen pro rychlou detekci hladin vazebného proteinu reinolu 4 (RBP4) v séru. Právě tento protein bývá zvýšený u lidí s inzulínovou rezistencí. [69]

Výzkumníci se snažili nalézt vhodné protilátky, které vážou oocysty parazita jménem *Cyclospora cayetanensis*. Tento alimentární parazit je hrozbou pro zemědělský obchod mezi Střední Amerikou a USA. Detekce tohoto parazita je velmi obtížná. K zachycení jsou vyžadovány molekuly s vysokou afinitou. Ukázalo se, že protilátky nejsou vhodnými kandidáty na vyřešení tohoto problému. Pomocí cell SELEX byly vybrány aptamery proti *C. cayetanensis*, konkrétně proti rekombinantním proteinům oocyst. Sekvence těchto DNA aptamerů zatím nebyla zveřejněna a v současnosti nemůže být prozrazena vzhledem k jejich potenciální komerční hodnotě. [70]

Motolice jaterní je dalším parazitem, pro kterého je obtížné najít příslušné protilátky vhodné k detekci. Motolice mohou vyvolat cholangiokarcinom

prostřednictvím zánětu žlučových cest. Rychlá detekce vajíček motolice ve stolici je náročná, proto se k případné diagnostice využívají fluorescenčně značené aptamery, které zrychlují detekci vajíček. Vajíčka motolice jaterní jsou detekována pod fluorescenčním mikroskopem. Motolice žlučová by v budoucnu mohla být detekována pomocí laterálního chromatografického testu, který by mohl být komerčně dostupný veřejnosti. I zde platí to, že sekvence tohoto DNA aptameru zůstává prozatím v tajnosti. [70]

Jak již bylo zmíněno několikrát, aptamery lze využít i jako léčiva. Ačkoliv aptamery už jsou nějakou dobu objeveny, k terapeutickým aplikacím nejsou zatím běžně využívány. Existuje pouze jeden aptamer, který byl schválen pro terapeutické použití. Jedná se o Macugen (nebo jiným slovem Pegaptanib). Tento aptamer je schopný se navázat na vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), kde blokuje abnormální angiogenezi v oku, čímž zabraňuje krvácení uvnitř oka a ztrátě zraku. Může se zdát zvláštní, že i když aptamery disponují řadou výhod, jejich podíl mezi léky je velice nízký. Je to dáno tím, že klinické studie mohou trvat více než 10 let a jsou poměrně drahé. Macugen byl uveden na trh v roce 2005 a ukazuje se, že plní svou funkci. To by mohl být podnět pro vytvoření dalších léků na bázi aptamerů. Většina z nich je ale zatím ve stádiu výzkumu. [66]

7. PROTILÁTKY VS APTAMERY

Aptamery mají v několika oblastech významné výhody oproti protilátkám. Obecně lze říct, že aptamery jsou stabilnější, trvanlivější, levnější a méně invazivní než protilátky. [71]

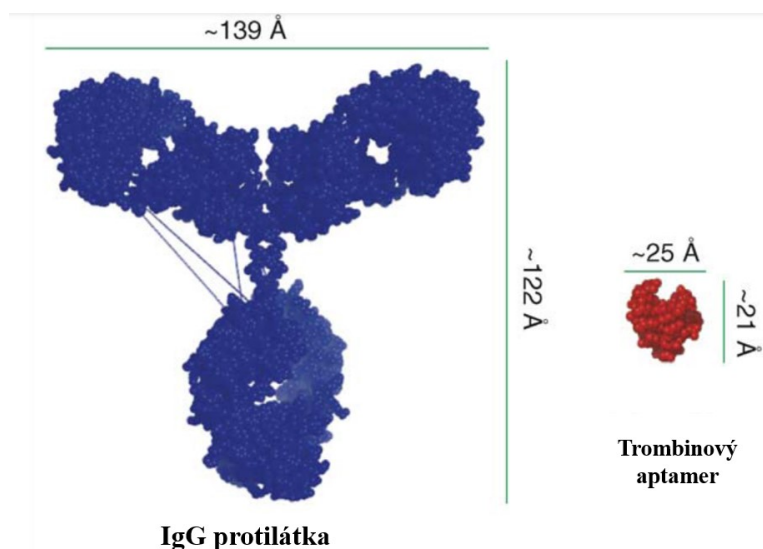
Aptamery jsou schopny odolávat vyšší teplotě a po denaturaci mohou být jednoduše renaturovány a opakovaně použity. Skladování je rovněž nenáročné. Mohou se skladovat v pokojové teplotě po neurčitě dlouhou dobu. [61] [71]

Jejich produkce je jednoduchá, nenákladná a rychlá. In vitro selekce může být automatizována. To znamená, že může probíhat paralelní produkce vícenásobných aptamerů proti komplexním molekulám. Výroba aptamerů trvá v řádech dnů, protilátek v řádech měsíců. K produkci nejsou potřeba žádná zvířata a ani imunitní odpověď není vyžadována. Toho se využívá při generování aptamerů, které jsou cíleny proti toxickým

sloučeninám. Protilátky produkované proti toxinům by mohly způsobit smrt zvířete, protože k produkci dochází uvnitř těla. [61] [67] [71]

Aptamery jsou syntetizovány chemickou cestou, což snižuje variabilitu v jednotlivých šaržích. Chemická syntéza také minimalizuje riziko problémů, které mohou vzniknout při purifikaci. Zároveň se snižuje náchylnost k bakteriální nebo virové kontaminaci. Chemická syntéza rovněž umožňuje, že aptamery mohou být modifikovány podle potřeby uživatele. Aptamery usnadňují objev i neznámých molekul. Různé techniky SELEX jsou schopny identifikovat neznámé markery. [61] [71]

V porovnání s Abs jsou aptamery mnohem menší. Menší rozměry umožňují lepší transport a pronikání do tkání. Přestože se na jedno vazebné místo antigenu může vázat více afinitních molekul, ukázalo se, že aptamery mají mnohem vyšší vazebnou afinitu k cíli než mAbs. Platí, že čím vyšší afinita, tím menší je potřeba aptameru a to snižuje náklady a zvyšuje zisk. Aptamery jsou navíc mnohem specifitější. Dokážou od sebe rozeznat i strukturně podobné molekuly jako je např. theofylin a kofein. Tyto dvě molekuly se od sebe liší pouze jednou metylovou skupinou. Byly vynalezeny aptamery, které vykazují 10 000x vyšší vazebnou afinitu pro theofylin než pro kofein. Afinita ke kofeinu byla mnohem nižší. Protilátky by na toto mohly reagovat zkříženou reaktivitou nebo by vznikaly falešně pozitivní problémy. [61] [71]



Obrázek 7 – Srovnání velikosti protilátky a aptameru (převzato a upraveno z Lee a kol., 2006) [72]

Malá velikost aptamerů není vždy výhodou. Rychlá clearance aptamerů kvůli jejich malé velikosti způsobuje omezení jejich použití. Tento problém má ale řešení. Při výrobě musí být použita chemická modifikace, která umožní zvýšení doby cirkulace. Lze například konjugovat aptamer s cholesterolem, což umožní delší cirkulování aptameru v těle. [73]

Chemická diverzita protilátek je větší než diverzita aptamerů. Je to dáno tím, že protilátky jsou proteiny a ty se skládají z 20 základních aminokyselin. Lze proto vytvořit mnoho různých kombinací molekul. Oligonukleotidy se skládají pouze ze 4 stavebních jednotek, proto je počet kombinací nižší. Terciální struktura je více závislá na podmínkách roztoku a snadněji se rozkládají v krvi. Je ale možné aptamery různě modifikovat, proto se svou diverzitou i stabilitou v organismu vyrovnávají protilátkám. [74]

Praktické aplikace aptamerů jsou limitovány také předčasnou degradací aptamerů. Toto se týká zejména RNA aptameru, který podléhá nukleázové degradaci. Průměrná doba rozpadu oligonukleotidu v krvi se pohybuje v řádech několik desítek minut v závislosti na koncentraci a konformační struktuře. Tato doba je velice krátká na to, aby se aptamery mohly začít využívat k terapeutickým aplikacím. [66]

Výzkumy potvrdily, že aptamery dokážou citlivěji a přesněji rozpoznat cíl v metodách jako je ELISA nebo western blotting. Zároveň jsou vhodnějšími rozpoznávacími prvky v biosenzorech než protilátky. Aptamery jsou 10 – 100x menší než protilátky, proto mohou být uspořádány na povrchu biosenzoru s větší hustotou. Větší hustota aptamerů na biosenzoru umožňuje použití menšího objemu testovaného vzorku, aniž by docházelo ke ztrátě citlivosti. [66]

Tabulka 4 – Porovnání rozdílných parametrů aptamerů a protilátek [67]

	Aptamery	Protilátky
Molekulová hmotnost	12-30 kDa	150-180 kDa
Sekundární struktura	různé struktury	β -list
Čas produkce	hodiny až měsíce	několik měsíců
Variace šarží	nízké	vysoké
Imunogenicita	nízká	vysoká
Minimální velikost cíle	60 Da	600 Da
Cílové molekuly	široká škála cílů	imunogenní molekuly
Skladovatelnost	dlouhodobá	krátkodobá
Chemické modifikace	různé modifikace	omezené modifikace
Nukleázová degradace	citlivé	rezistentní
Poločas v organismu	20 minut	měsíc
Stabilita	stabilní	citlivé
Cena	nízká	vyšší

Z výše zmíněných skutečností lze odvodit, aptamery se svými vlastnostmi téměř vyrovnávají konkurenčním protilátkám. Dokonce v některých oblastech mají i značné výhody. I přes to všechno, aptamery disponují řadou problémů, které je dělí od jejich využití v komercializaci a klinické praxi. Technologie aptamerů jsou stále na počátku svého zrodu a vyžadují další vývoj. Proto jsou protilátky stále nejčastějším běžně používaným diagnostickým nástrojem. Výzkum diagnostických aptamerů postupuje rychleji než těch terapeutických. Lze tedy očekávat, že se trh s diagnostickými aptamery se začne rozrůstat rychleji než trh aptamerů s terapeutickým účinkem. [67] [75]

8. ZÁVĚR

Afinitní molekuly jsou v dnešní době nezastupitelnou položkou v diagnostice, terapii i výzkumu. Mají schopnost vazby ke specifickému cíli. Detekce biomarkerů onemocnění je pomocí afinitních molekul rychlá a spolehlivá. Mezi nejvyužívanější afinitní molekuly patří v dnešní době stále protilátky, nejčastěji monoklonální. To se v blízké budoucnosti může změnit, protože do popředí se dostávají jiné, alternativní afinitní molekuly.

pAbs se v dnešní době používají méně než dříve. Jejich funkci dnes plní účinnější mAbs, protože disponují řadou výhod. mAbs lze generovat jako stálý a obnovitelný zdroj, proto je produkce pomocí hybridomových linií prakticky možná v neomezeném množství. K získání pAbs se u některých zvířat provádí vykrvení, aby bylo možné získat dostatečné množství požadovaných protilátek. Z etického důvodu se od tohoto způsobu produkce upouští, proto se pAbs používají převážně ve výzkumu, popřípadě v imunohistochemii. Produkce mAbs je humánnější. I když zvíře musí být na počátku usmrceno, následná produkce probíhá v in vitro systému, kde může probíhat nekonečně dlouho. To byl jeden z mnoha důvodů, proč se mAbs staly mnohem využívanějšími. Dalším vhodnějším aspektem je jejich specifita. Monospecifická povaha jim umožňuje vázat se na určitý specifický epitop, proto je detekce spolehlivá a přesná, což je pro diagnostiku různých onemocnění žádoucí.

Metody, kdy k produkci protilátek není potřeba žádné zvíře jsou na vzestupu. rAbs a nanobodies jsou látky, které se připravují genovým inženýrstvím. Jedná se celkem o inovativní metodu, kde jsou k produkci využívány bakterie nebo kvasinky. Stejně tomu tak je i u affimerů, které se mezi protilátky přímo neřadí, ale jedná se o proteinové molekuly s obdobnou afinitní funkcí.

Před více než třiceti lety se začaly objevovat první zmínky o aptamerech jako nových afinitních molekulách, které jsou získávány pomocí metody jménem SELEX. Od té doby prošly aptamery dlouhým vývojovým procesem, který je stále na svém počátku. Postupně bylo zjištěno, že tyto afinitní molekuly jsou schopny rozpoznat cíl, navázat se na něj a vzniklý komplex aptamer-cíl může být detekován pomocí různých detekčních technologií. Aktuálně vznikají různé modifikace metody SELEX i

samotných aptamerů, aby bylo dosaženo rychlé a účinné produkce s co nejvhodnějšími vlastnostmi pro danou aplikaci.

Aptamery mají podobné vlastnosti jako protilátky a po jejich vzoru vznikají různé detekční technologie založené na aptamerech. Tyto detekční technologie umožňují spolehlivě detekovat požadované cíle. Toho by se v budoucnu mohlo využít k časné diagnostice různých onemocnění, v analýze léčiv či životního prostředí. Největší potenciál mají aptamery v diagnostice onemocnění. Jejich výhody oproti protilátkám zajišťují lepší, přesnější a specifitější výsledky.

Rivalita mezi protilátkami a aptamery je oprávněná. Aptamery disponují řadou výhod, díky kterým překonávají své glykoproteinové protějšky. V blízké budoucnosti nelze očekávat, že by aptamery nahradily protilátky v celém jejich rozsahu. Aktuálně protilátky dominují na diagnostickém trhu i v klinické praxi. Jsou to stále nejpoužívanější afinitní molekuly. Může se stát, že se postupně vedle protilátek začnou na trhu objevovat aptamery, které začnou doplňovat stávající protilátkové metody. Aptamery mají před sebou ještě dlouhou cestu, než se dostanou do rutinní klinické praxe. Už teď lze ale konstatovat, že jejich potenciál bude v budoucnu určitě využit.

9. POUŽITÉ ZKRATKY

Zkratka	Význam zkratky	Český význam
Ag	Argentum	Stříbro
ALFA	Aptamer-based lateral flow assay	Laterální chromatografický test
Au	Aurum	Zlato
AuNP	Gold nanoparticles	Nanočástice zlata
cDNA	Complementary DNA	Komplementární DNA
CT	Computer tomography	Počítačová tomografie
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	Double-stranded DNA	Dvouřetězcová DNA
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Receptor epidermálního růstového faktoru
ELASA	Enzyme-linked aptasorbent assay	Enzymově značený aptamerový test na pevné fázi
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Enzymově značený imuno test na pevné fázi
ELONA	Enzyme-linked oligonukleotide assay	Enzymově značený oligonukleotidový test na pevné fázi
Fab	Fragment antigen-binding region	Fragment oblasti vázající antigen
HAT	Hypoxantin-Aminopetrin-Thymidin medium	Hypoxantin-Aminopetrin-Thymidin médium
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
Ig	Imunoglobulin	Imunoglobulin
IHC	Imunohistochemistry	Imunohistochemie
mAbs	Monoclonal antibodies	Monoklonální protilátky
MPL	Monophosphoryl lipid A	Monofosforyl lipid A
mRNA	Message RNA	Messengerová RNA
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer	Nemalobuněčný karcinom plic

OCC	Ovarian cancer cells	Buňky rakoviny vaječníků
OTA	Ochratoxin A	Ochratoxin A
pAbs	Polyclonal antibodies	Polyklonální protilátky
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	Polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
PET	positron emission tomography	Pozitronová emisní tomografie
POCT	Point of care testing	Vyšetření v blízkosti pacienta
QCM	Quartz crystal microbalance	Mikrováhy z křemenného krystalu
rAbs	Recombinant antibodies	Rekombinantní protilátky
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	Reverzní transkripce polymerázové řetězové reakce
scFv	Single-chain variable fragment	Jednořetězový variabilní fragment
sdAb	Single-domain antibodies	Jednodoménové protilátky
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	Dodecylsírán sodný
SELEX	Sequential Evolution of Ligands by EXponential enrichment	Sekvenční Evoluce Ligandů EXponenciálním obohacováním
SPECT	Single-photon emission computed tomography	Jednofotonová emisní počítačová tomografie
SPR	Surface Plasmon Resonance	Rezonanční excitace povrchových plasmonů
ssDNA	Single-stranded DNA	Jednořetězová DNA
Taq	Thermus aquaticus	Thermus aquaticus
TAR	Trans-activation response	Transaktivační odpověď
TDM	Trehalose-6-6'-dimycolate	Trehalóza-6-6'-dimykolát
UTR	Untranslated Region	Nepřekládaná oblast
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Vaskulární endoteliální růstový faktor

10. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Příklady tří komerčně dostupných adjuvans.....	12
Tabulka 2 – Základní rozdíly mezi hybridomovou technologií a fágovým displejem...	16
Tabulka 3 - Příklady komerčně dostupných diagnostických produktů založených na aptamerech.....	34
Tabulka 4 – Porovnání rozdílných parametrů aptamerů a protilátek.....	39

11. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Schématické znázornění produkce monoklonálních protilátek.....	14
Obrázek 2 – Rozdíly ve struktuře protilátky a nanoproti látky.....	17
Obrázek 3 – Znázornění struktury affimeru	18
Obrázek 4 – Schématické znázornění struktury a funkce aptameru	21
Obrázek 5 – Grafické znázornění průběhu procesu SELEX	24
Obrázek 6 – Schématické zobrazení funkce ALFA.....	28
Obrázek 7 – Srovnání velikosti protilátky a aptameru.....	37

12. POUŽITÁ LITERATURA

1. TANS, Roel, Danique M.H. VAN RIJSWIJCK, Alex DAVIDSON, et al. Affimers as an alternative to antibodies for protein biomarker enrichment. *Protein Expression and Purification* [online]. 2020, **174** [cit. 2023-04-19]. ISSN 10465928. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105677>
2. KHATI, M. The future of aptamers in medicine. *Journal of Clinical Pathology* [online]. 2010, **63**(6), 480-487 [cit. 2023-04-19]. ISSN 0021-9746. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2008.062786>
3. ŠAFARČÍK, Kristián Šafarčík, Vladimír BARTOŠ a Marie KARLÍKOVÁ. Principy imunoanalytických metod. *Po>studium* [online]. Plzeň: Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni, 2019 [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: <https://postudium.cz/mod/book/view.php?id=5374&chapterid=2217>
4. LIPMAN, N. S., L. R. JACKSON, L. J. TRUDEL a F. WEIS-GARCIA. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal* [online]. 2005, **46**(3), 258-268 [cit. 2023-04-19]. ISSN 1084-2020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>
5. HAURUM, John S. Recombinant polyclonal antibodies: the next generation of antibody therapeutics?. *Drug Discovery Today* [online]. 2006, **11**(13-14), 655-660 [cit. 2023-04-19]. ISSN 13596446. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.05.009>
6. LEE, H.A. a M.R.A. MORGAN. *Food immunoassays: Applications of polyclonal, monoclonal and recombinant antibodies* [online]. 1993, **4**(5), 129-134 [cit. 2023-04-19]. ISSN 09242244. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(93\)90031-5](https://doi.org/10.1016/0924-2244(93)90031-5)
7. ASCOLI, Carl A a Birte AGGELER. Overlooked benefits of using polyclonal antibodies. *BioTechniques* [online]. 2018, **65**(3), 127-136 [cit. 2023-04-19]. ISSN 0736-6205. Dostupné z: <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0065>
8. STILLS, Harold F. Polyclonal Antibody Production. In: *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* [online]. Elsevier, 2012, 2012, s. 259-274 [cit. 2023-04-20]. ISBN 9780123809209. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00011-0>

9. HANLY, W. C., J. E. ARTWOHL a B. T. BENNETT. Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. *ILAR Journal* [online]. 1995, **37**(3), 93-118 [cit. 2023-04-20]. ISSN 1084-2020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ilar.37.3.93>
10. JENNINGS, V. M. Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production. *ILAR Journal* [online]. 1995, **37**(3), 119-125 [cit. 2023-04-20]. ISSN 1084-2020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ilar.37.3.93>
11. LEENAARS, M. a C. F. M. HENDRIKSEN. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. *ILAR Journal* [online]. 2005, **46**(3), 269-279 [cit. 2023-04-20]. ISSN 1084-2020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.269>
12. JÍLEK, Petr. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně. 2.*, doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2019. ISBN 978-802-7105-953.
13. POHANKA, Miroslav. Monoclonal and polyclonal antibodies production - preparation of potent biorecognition element. *Journal of Applied Biomedicine* [online]. 2009, **7**(3), 115-121 [cit. 2023-04-21]. ISSN 1214021X. Dostupné z: www.doi.org/10.32725/jab.2009.012
14. LLEWELYN, M. B., R. E. HAWKINS a S. J. RUSSELL. Discovery of antibodies. *BMJ* [online]. 1992, **305**(6864), 1269-1272 [cit. 2023-04-21]. ISSN 0959-8138. Dostupné z: <https://doi.org/10.1136/bmj.305.6864.1269>
15. NELSON, P. N., et al. Monoclonal antibodies. *Molecular pathology: MP* [online]. 2000, **53**(3), 111-117. [cit. 2023-04-21]. ISSN 1366-8714. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/GaryReynolds/publication/264309886_Monoclonal_antibodies/links/54d0a7d70cf20323c2186998/Monoclonal-antibodies.pdf
16. SIDDIQUI, MZ. Monoclonal antibodies as diagnostics; an appraisal. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2010, **72**(1) [cit. 2023-04-21]. ISSN 0250-474X. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883214/>
17. DORNELL, Jonathan. Monoclonal vs Polyclonal Antibodies. In: *Technology Networks* [online]. 6. 10. 2021 [cit. 2023-04-23]. Dostupné z: <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/monoclonal-vs-polyclonal-antibodies-354439>

18. PADUANO, Francesco. Recombinant Antibodies. In: *Antibodies.com* [online]. [cit. 2023-04-23]. Dostupné z: <https://www.antibodies.com/recombinant-antibodies>
19. GROFF, Katherine, Jeffrey BROWN a Amy J. CLIPPINGER. Modern affinity reagents: Recombinant antibodies and aptamers. *Biotechnology Advances* [online]. 2015, **33**(8), 1787-1798 [cit. 2023-04-23]. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.004>
20. RAMI, Abbas, Mahdi BEHDANI, Najmeh YARDEHNAVI, Mahdi HABIBI-ANBOUHI a Fatemeh KAZEMI-LOMEDASHT. An overview on application of phage display technique in immunological studies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [online]. 2017, **7**(7), 599-602 [cit. 2023-04-23]. ISSN 22211691. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.06.001>
21. HAIRUL BAHARA, Nur Hidayah, Gee Jun TYE, Yee Siew CHOONG, Eugene Boon Beng ONG, Asma ISMAIL a Theam Soon LIM. Phage display antibodies for diagnostic applications. *Biologicals* [online]. 2013, **41**(4), 209-216 [cit. 2023-04-23]. ISSN 10451056. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.04.001>
22. HASSANZADEH-GHASSABEH, Gholamreza, Nick DEVOOGDT, Pieter DE PAUW, Cécile VINCKE a Serge MUYLDERMANS. Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine* [online]. 2013, **8**(6), 1013-1026 [cit. 2023-04-23]. ISSN 1743-5889. Dostupné z: <https://doi.org/10.2217/nmm.13.86>
23. JOVČEVSKA, Ivana a Serge MUYLDERMANS. The Therapeutic Potential of Nanobodies. *BioDrugs* [online]. 2020, **34**(1), 11-26 [cit. 2023-04-23]. ISSN 1173-8804. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40259-019-00392-z>
24. GIBBS, W. WAYT. Nanobodies. *Scientific American*, [online]. 2005, **293**(2), 78–83 [cit. 2023-04-23]. ISSN 0036-8733. Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/26061110>
25. MUYLDERMANS, Serge. Applications of Nanobodies. *Annual Review of Animal Biosciences* [online]. 2021, **9**(1), 401-421 [cit. 2023-04-23]. ISSN 2165-8102. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021419-083831>

26. MUYLDERMANS, Serge. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2013, **82**(1), 775-797 [cit. 2023-04-23]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>
27. TANS, Roel, Danique M.H. VAN RIJSWIJCK, Alex DAVIDSON, et al. Affimers as an alternative to antibodies for protein biomarker enrichment. *Protein Expression and Purification* [online]. 2020, **174** [cit. 2023-04-24]. ISSN 10465928. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105677>
28. TIEDE, Christian, Robert BEDFORD, Sophie J HESELTINE, et al. Affimer proteins are versatile and renewable affinity reagents. *ELife* [online]. 2017, **6** [cit. 2023-04-24]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: <https://doi.org/10.7554/eLife.24903>
29. KAUR, Harleen, John G. BRUNO, Amit KUMAR a Tarun Kumar SHARMA. Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines. *Theranostics* [online]. 2018, **8**(15), 4016-4032 [cit. 2023-04-24]. ISSN 1838-7640. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6096388/>
30. KADIOGLU, Onat, Anna Helena MALCZYK, Henry Johannes GRETEN a Thomas EFFERTH. Aptamers as a novel tool for diagnostics and therapy. *Investigational New Drugs* [online]. 2015, **33**(2), 513-520 [cit. 2023-04-24]. ISSN 0167-6997. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10637-015-0213-y>
31. STOLTENBURG, Regina, Christine REINEMANN a Beate STREHLITZ. SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering* [online]. 2007, **24**(4), 381-403 [cit. 2023-04-24]. ISSN 13890344. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.06.001>
32. DARMOSTUK, Mariia, Silvie RIMPELOVA, Helena GBELCOVA a Tomas RUMML. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnology Advances* [online]. 2015, **33**(6), 1141-1161 [cit. 2023-04-24]. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.008>
33. NIMJEE, Shahid M., Rebekah R. WHITE, Richard C. BECKER a Bruce A. SULLENGER. Aptamers as Therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* [online]. 2017, **57**(1), 61-79 [cit. 2023-04-24]. ISSN 0362-1642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558>

34. DOLLINS, Claudia M., Smita NAIR a Bruce A. SULLENGER. Aptamers in Immunotherapy. *Human Gene Therapy* [online]. 2008, **19**(5), 443-450 [cit. 2023-04-24]. ISSN 1043-0342. Dostupné z: <http://doi.org/10.1089/hum.2008.045>
35. MAIRAL, Teresa, Veli CENGIZ ÖZALP, Pablo LOZANO SÁNCHEZ, Mònica MIR, Ioanis KATAKIS a Ciara K. O'SULLIVAN. Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2008, **390**(4), 989-1007 [cit. 2023-04-24]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1346-4>
36. GARST, A. D., A. L. EDWARDS a R. T. BATEY. Riboswitches: Structures and Mechanisms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2011, **3**(6), a003533-a003533 [cit. 2023-04-24]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a003533>
37. AWWAD, Amal Moh a Maureen MCKEAGUE. Riboswitches and synthetic aptamers: a head-to-head comparison. *Aptamers* [online]. 2018, **2**, 1-10 [cit. 2023-04-24]. ISSN ISSN: 2514-3247. Dostupné z: <http://japtamers.co.uk/wpcontent/uploads/2018/02/Awwad.pdf>
38. SCHÜTZE, Tatjana, Barbara WILHELM, Nicole GREINER, et al. Probing the SELEX Process with Next-Generation Sequencing. *PLoS ONE* [online]. 2011, **6**(12) [cit. 2023-04-25]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029604>
39. HAMULA, C, J GUTHRIE, H ZHANG, X LI a X LE. Selection and analytical applications of aptamers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2006, **25**(7), 681-691 [cit. 2023-04-25]. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.05.007>
40. WU, Jingjing, Yingyue ZHU, Feng XUE, et al. Recent trends in SELEX technique and its application to food safety monitoring. *Microchimica Acta* [online]. 2014, **181**(5-6), 479-491 [cit. 2023-04-25]. ISSN 0026-3672. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00604-013-1156-7>

41. ZHUO, Zhenjian, Yuanyuan YU, Maolin WANG, et al. Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(10) [cit. 2023-04-25]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms18102142>
42. YAN, Amy C. a Matthew LEVY. Aptamers and aptamer targeted delivery. *RNA Biology* [online]. 2014, **6**(3), 316-320 [cit. 2023-04-25]. ISSN 1547-6286. Dostupné z: <https://doi.org/10.4161/rna.6.3.8808>
43. WAN, Quanyuan, Xiaohui LIU a Youli ZU. Oligonucleotide aptamers for pathogen detection and infectious disease control. *Theranostics* [online]. 2021, **11**(18), 9133-9161 [cit. 2023-04-26]. ISSN 1838-7640. Dostupné z: <https://doi.org/10.7150/thno.61804>
44. TOH, Saw Yi, Marimuthu CITARTAN, Subash C.B. GOPINATH a Thean-Hock TANG. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2015, **64**, 392-403 [cit. 2023-04-26]. ISSN 09565663. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.026>
45. JAUSET-RUBIO, Miriam, Mohammad S. EL-SHAHAWI, Abdulaziz S. BASHAMMAKH, Abdulrahman O. ALYOUBI a Ciara K. O'SULLIVAN. Advances in aptamers-based lateral flow assays. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2017, **97**, 385-398 [cit. 2023-04-26]. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.010>
46. MAJDINASAB, Marjan, Mihaela BADEA a Jean Louis MARTY. Aptamer-Based Lateral Flow Assays: Current Trends in Clinical Diagnostic Rapid Tests. *Pharmaceuticals* [online]. 2022, **15**(1) [cit. 2023-04-26]. ISSN 1424-8247. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ph15010090>
47. CHEN, Ailiang a Shuming YANG. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2015, **71**, 230-242 [cit. 2023-04-26]. ISSN 09565663. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.041>
48. JAISANKAR, Abinaya, Sasirekha KRISHNAN a Loganathan RANGASAMY. Recent developments of aptamer-based lateral flow assays for point-of-care (POC) diagnostics. *Analytical Biochemistry* [online]. 2022, **655** [cit. 2023-04-26]. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114874>

49. WEN, Lin, Liping QIU, Yongxiang WU, Xiaoxiao HU a Xiaobing ZHANG. Aptamer-Modified Semiconductor Quantum Dots for Biosensing Applications. *Sensors* [online]. 2017, **17**(8) [cit. 2023-04-26]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/s17081736>
50. KIM, Dongmin a Seungmin YOO. Aptamer-Conjugated Quantum Dot Optical Biosensors: Strategies and Applications. *Chemosensors* [online]. 2021, **9**(11) [cit. 2023-04-26]. ISSN 2227-9040. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/chemosensors9110318>
51. SASSOLAS, Audrey, Loïc J. BLUM a Béatrice D. LECA-BOUVIER. Optical detection systems using immobilized aptamers. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2011, **26**(9), 3725-3736 [cit. 2023-04-26]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.02.031>
52. SASSOLAS, Audrey, Loïc J. BLUM a Béatrice D. LECA-BOUVIER. Electrochemical Aptasensors. *Electroanalysis* [online]. 2009, **21**(11), 1237-1250 [cit. 2023-04-26]. ISSN 10400397. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/elan.200804554>
53. HIANIK, Tibor a Joseph WANG. Electrochemical Aptasensors - Recent Achievements and Perspectives. *Electroanalysis* [online]. 2009, **21**(11), 1223-1235 [cit. 2023-04-26]. ISSN 10400397. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/elan.200904566>
54. XU, Ying, Guifang CHENG, Pingang HE a Yuzhi FANG. A Review: Electrochemical Aptasensors with Various Detection Strategies. *Electroanalysis* [online]. 2009, **21**(11), 1251-1259 [cit. 2023-04-26]. ISSN 10400397. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/elan.200804561>
55. AKGÖNÜLLÜ, Semra, Erdoğan ÖZGÜR a Adil DENIZLI. Quartz Crystal Microbalance-Based Aptasensors for Medical Diagnosis. *Micromachines* [online]. 2022, **13**(9) [cit. 2023-04-26]. ISSN 2072-666X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/mi13091441>
56. CHEN, Xiao-Fei, Xin ZHAO a Zifeng YANG. Aptasensors for the detection of infectious pathogens: design strategies and point-of-care testing. *Microchimica Acta* [online]. 2022, **189**(12) [cit. 2023-04-26]. ISSN 0026-3672. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05533-w>

57. LIU, Mei, Lei XI, Ting TAN, Lian JIN, Zhifei WANG a Nongyue HE. A novel aptamer-based histochemistry assay for specific diagnosis of clinical breast cancer tissues. *Chinese Chemical Letters* [online]. 2021, **32**(5), 1726-1730 [cit. 2023-04-26]. ISSN 10018417. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2020.11.072>
58. BAUER, Michelle, Mia STROM, David S HAMMOND a Sarah SHIGDAR. Anything You Can Do, I Can Do Better: Can Aptamers Replace Antibodies in Clinical Diagnostic Applications?. *Molecules* [online]. 2019, **24**(23) [cit. 2023-04-26]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24234377>
59. JAYASENA, Sumedha D. Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics. *Clinical Chemistry* [online]. 1999, **45**(9), 1628-1650 [cit. 2023-04-26]. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/clinchem/45.9.1628>
60. MEYER, Michael, Thomas SCHEPER a Johanna-Gabriela WALTER. Aptamers: versatile probes for flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2013, **97**(16), 7097-7109 [cit. 2023-04-26]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5070-z>
61. KEDZIERSKI, Suzy, Thomas CALTAGIRONE a Makan KHOSHNEJAD. Synthetic Antibodies: The Emerging Field of Aptamers. *BioProcessing Journal* [online]. 2013, **11**(4), 46-49 [cit. 2023-04-26]. ISSN 15388786. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.12665/J114.KedzierskiCaltagirone>
62. HORI, Shin-ichiro, Alberto HERRERA, John ROSSI a Jiehua ZHOU. Current Advances in Aptamers for Cancer Diagnosis and Therapy. *Cancers* [online]. 2018, **10**(1) [cit. 2023-04-26]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3390/cancers10010009>
63. TSAI, Sung-Chi, Lien-Yu HUNG a Gwo-Bin LEE. An integrated microfluidic system for the isolation and detection of ovarian circulating tumor cells using cell selection and enrichment methods. *Biomicrofluidics* [online]. 2017, **11**(3) [cit. 2023-04-26]. ISSN 1932-1058. Dostupné z: <https://doi.org/10.1063/1.4991476>
64. TRUNZO, Nevina E. a Ka Lok HONG. Recent Progress in the Identification of Aptamers Against Bacterial Origins and Their Diagnostic Applications. *International*

Journal of Molecular Sciences [online]. 2020, **21**(14) [cit. 2023-04-26]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21145074>

65. MAHMOUD, Mostafa a Hans-Peter DEIGNER. *Aptamers in Diagnostics: Replacing or Complementing Antibodies?* [online]. 2015, **05**(01) [cit. 2023-04-27]. ISSN 21530777. Dostupné z: <https://doi.org/10.4172/2153-0777.1000e129>

66. LAKHIN, A. V., V. Z. TARANTUL a L. V. GENING. Aptamers: Problems, Solutions and Prospects. *Acta Naturae* [online]. 2013, **5**(4), 34-43 [cit. 2023-04-26]. ISSN 2075-8251. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-4-34-43>

67. ALI, Mohamed H., Marwa E. ELSHERBINY a Marwan EMARA. Updates on Aptamer Research. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(10) [cit. 2023-04-27]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms20102511>

68. LIU, Shan, Yixin XU, Xin JIANG, Hong TAN a Binwu YING. Translation of aptamers toward clinical diagnosis and commercialization. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2022, **208** [cit. 2023-04-26]. ISSN 09565663. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114168>

69. FUTANE, Abhishek, Vigneswaran NARAYANAMURTHY, Pramod JADHAV a Arthi SRINIVASAN. Aptamer-based rapid diagnosis for point-of-care application. *Microfluidics and Nanofluidics* [online]. 2023, **27**(2) [cit. 2023-04-30]. ISSN 1613-4982. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10404-022-02622-3>

70. BRUNO, John G. Applications in Which Aptamers Are Needed or Wanted in Diagnostics and Therapeutics. *Pharmaceuticals* [online]. 2022, **15**(6) [cit. 2023-04-30]. ISSN 1424-8247. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ph15060693>

71. THIVIYANATHAN, Varatharasa a David G. GORENSTEIN. Aptamers and the next generation of diagnostic reagents. *PROTEOMICS - Clinical Applications* [online]. 2012, **6**(11-12), 563-573 [cit. 2023-04-30]. ISSN 18628346. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/prca.201200042>

72. LEE, J, G STOVALL a A ELLINGTON. Aptamer therapeutics advance. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2006, **10**(3), 282-289 [cit. 2023-04-30]. ISSN 13675931. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.015>

73. KEEFE, Anthony D., Supriya PAI a Andrew ELLINGTON. Aptamers as therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 2010, **9**(7), 537-550 [cit. 2023-04-30]. ISSN 1474-1776. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrd3141>
74. MCKEAGUE, Maureen a Maria C. DEROSA. Challenges and Opportunities for Small Molecule Aptamer Development. *Journal of Nucleic Acids* [online]. 2012, **2012**, 1-20 [cit. 2023-04-30]. ISSN 2090-0201. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2012/748913>
75. KUMAR KULABHUSAN, Prabir, Babar HUSSAIN a Meral YÜCE. Current Perspectives on Aptamers as Diagnostic Tools and Therapeutic Agents. *Pharmaceutics* [online]. 2020, **12**(7) [cit. 2023-04-30]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070646>