

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Gabriela Tret'áková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Aptamery-příprava a využití

Gabriela Treťáková

Bakalářská práce

2023

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Gabriela Treťáková**
Osobní číslo: **C18294**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Aptamery – příprava a využití**
Téma práce anglicky: **Aptamers – Preparation and Use**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Z dostupných literárních zdrojů vypracovat literární rešerši o Aptamerech. V první části se studentka zaměří na popis, co to aptamery jsou, jaké jsou jejich vlastnosti, a na možnosti jejich přípravy. Tyto způsoby by měly být porovnány z pohledu účinnosti a ceny. V další části se studentka zaměří na jejich využití, a to jak pro terapeutické, tak i diagnostické účely, zejména pro jaké laboratorní metody jsou aptamery využívány a zda jsou využívány i v rutinní analýze a jsou zavedeny do praxe, nebo jen pro vědecké účely.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Recentní literatura dostupná v databázi WoS, MEDLINE, Sciencedirect; odborné knihy. Další dle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlášení

Práci s názvem Aptamery-příprava a využití jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2023

.....
Gabriela Treťáková

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat mé vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za trpělivost, vstřícnost, odborné vedení a rady při zpracování této bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat své mamince Martě Treťáková za podporu a klidné prostředí, které vytvořila pro psaní mé práce.

Anotace

Aptamery jsou malé ligandy, které vykazují vysokou specifitu a afinitu k cílovým molekulám. Vytvářejí pevné a stabilní vazby, a v mnohých ohledech jsou dokonce schopny předčít vlastnosti zatím nejpoužívanějších afinitních ligandů – protilátek. Aptamery svými unikátními vlastnostmi a spektrem možných použití nachází uplatnění jak v základním, tak aplikovaném výzkumu a následně také u odborníků v praxi. Tato práce se zaměřuje na základní rozdělení aptamerů, jejich strukturní formy a způsoby syntézy. V aplikačních možnostech se text zabývá především diagnostickým a terapeutickým využitím aptamerů v biomedicíně.

Klíčová slova: peptidové aptamery, aptamery nukleových kyselin, protilátky, biomedicína, diagnostika, terapie, SELEX

Annotation

Aptamers are small affinity ligands that exhibit high specificity and affinity towards their target molecules. They form strong and stable bonds and, in many aspects, surpass the properties of the most commonly used affinity ligands, such as antibodies. Aptamers, with their unique characteristics and wide range of potential applications, have garnered interest in both basic and applied research, as well as among professionals in various fields. This work focuses on the fundamental classification of aptamers, their structural forms, and the methods of their synthesis. In terms of applications, the text primarily explores the diagnostic and therapeutic potential of aptamers in the field of biomedicine.

Keywords: peptide aptamers, nucleic acid aptamers, antibodies, biomedicine, diagnostics, therapy, SELEX

Seznam tabulek

Tabulka 1: Srovnání aptamerů a protilátek.	22
Tabulka 2: Srovnání metod ELISA a ELASA.	39
Tabulka 3: Některé cíle pro terapeutické využití aptamerů.	41
Tabulka 4: Některé komerčně dostupné aptamery pro diagnostiku.	47
Tabulka 5: Příklady aptamerů schválených k terapii či v různém stádiu klinického testování.	48

Seznam obrázků

Obrázek 1	Struktura a konfigurace peptidového aptameru.	19
Obrázek 2	Struktura aptamerů charakteristických tvarů.	19
Obrázek 3	Tvorba PRM komplexu a jeho vazba na cílovou molekulu.	25
Obrázek 4	Schéma znázorňující přípravu aptamerů metodou SELEX.	27
Obrázek 5	Schématické znázornění výběru aptameru pomocí Cell – SELEX.	29
Obrázek 6	Grafické znázornění procesu Tissue-SELEX.	30
Obrázek 7	Možná využití aptamerů založených na nukleových kyselinách.	32
Obrázek 8	Uspořádání aptamerového mikročipu a záchyt analytu.	34
Obrázek 9	Schematický přehled různých formátů aptamerových mikročipů:	34
Obrázek 10	Schéma testovacího proužku ALFA.	36
Obrázek 11	Konjugát aptameru a léčiva.	42

Seznam zkratek

ACS	akutní koronární syndrom (acute coronary syndrome)
ADCs	konjugáty protilátek a léčiv (antibody-drug conjugates)
ALFA	aptamerový laterální chromatografický test (aptamer lateral flow assay)
ALISA	aptamer-linked immobilised sorbent assay
AMPs	antimikrobiální peptidy (antimicrobial peptides)
ApDCs	konjugáty aptamerů a léčiv (aptamer-drug conjugates)
BACE1	beta-secretase enzyme
CA	sacharidový antigen (carbohydrate antigen)
CDKs	cyklin-dependentní kinázy (cyclin dependent kinases)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina (complementary deoxyribonucleic acid)
CEA	karcinoembryonální antigen (carcinoembryonic antigen)
CLL	chronická lymfocytární leukémie (chronic lymphocytic leukemia)
CP	obalový protein (coat protein)
CT	počítačová tomografie (computed tomography)
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DARPs	designed ankyrin repeat proteins
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
Dox	doxorubicin
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (ethylenediaminetetraacetic acid)
EGFR	receptor epitelálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor)
ELAA	enzyme-linked aptamer assay
ELASA	enzyme-linked aptasorbent assay
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ELONA	enzyme-linked oleonucleic assay
ESAT-6	Mycobacterium tuberculosis-specific antigen
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FRET	fluorescence resonance energy transfer
HER2	humánní epidermální recepto (human epidermal receptor)
H-FABP	heart-type fatty acid-binding protein

HGFR	receptor hepatocytárního růstového faktoru (hepatocyte growth factor receptor)
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (human immunodeficiency virus)
HPV	lidský papilomavirus (human papillomavirus)
ICAM-2	molekula intracelulárního adhesinu 2 (intercellular adhesion molecule 2)
IVC	<i>in vitro</i> kompartmentalizace (<i>in vitro</i> compartmentalization)
KD	disociační konstanta (dissociation constant)
LFA	laterální chromatografický test (lateral flow assay)
MA	myasthenia gravis
mAbs	monoklonální protilátky (monoclonal antibody)
MCH-I	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MMPS	multiplexed massively parallel SELEX
MRI	magnetická resonance (magnetic resonance imaging)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
MRSA	methicilin-resistent Staphylococcus aureus
MS	roztrošená skleróza (multiple sclerosis)
NaOH	hydroxid sodný (sodium hydroxide)
NPs	nanočástice (nanoparticle)
OSM	oncostatin M
PA	peptidový aptamer (peptide aptamer)
pAbs	polyklonální protilátky (polyclonal antibody)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PD-1	protein programované smrti 1 (programmed death protein 1)
PDT	fotodynamická terapie (photodynamic therapy)
PET	pozitronová emisní tomografie (positron emission tomography)
pH	potenciál vodíku (potential of hydrogen)
POCT	point-of-care testing
PTK7	protein tyrosin kinase 7
PTT	fototermální terapie (photothermal therapy)
QDs	nanoscale semiconductor nanocrystals
rAbs	rekombinantní protilátky (recombinant antibody)
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
ROS	reaktivní forma kyslíku (reactive oxygen species)

RT-PCR	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (reverse transcription polymerase chain reaction)
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2
SELEX	systematic evolution of ligand by exponential enrichment
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SLE	systémový lupus erythematoses
ssDNA	jednovláknová deoxyribonukleová kyselina (single-stranded deoxyribonucleic acid)
TBA	thrombin-binding aptamer
TCR	receptor T buněk (t-cell receptor)
TrxA	thioredoxin A
TSE	transmisivní spongiformní encefalopatie
VEGFR-2	receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru 2 (vascular endothelial growth factor-2)
vWf	von Willebrandův faktor
Y2H	kvasinkový dvouhybridní systém (yeast two-hybrid strategie)

Cíl práce

Cílem práce je provedení základní rešerše v oblasti aptamerů, jejich struktury, syntézy a vlastností. Aptamery jsou v práci také srovnány s protilátkami. Dále se práce zabývá některými aplikačními možnostmi aptamerů, primárně v oblasti biomedicíny. Zde se zaměřuje zejména na diagnostické a terapeutické využití, a to včetně některých komerčně dostupných preparátů či preparátů v klinickém testování.

Obsah

1	ÚVOD	16
2	STRUKTURA APTAMERŮ	17
2.1	PEPTIDOVÉ APTAMERY	17
2.2	APTAMERY TVOŘENÉ NUKLEOVÝMI KYSELINAMI	19
3	POROVNÁNÍ APTAMERŮ A PROTILÁTEK	21
4	VÝROBA APTAMERŮ	23
4.1	VÝBĚR PEPTIDOVÝCH APTAMERŮ Z KNIHOVEN	23
4.1.1	<i>In vivo</i> systémy.....	23
4.1.2	Systémy extracelulární prezentace.....	24
4.2	METODA SYSTEMATIC EVOLUTION OF LIGANDS BY EXPONENTIAL ENRICHMENT (SELEX)	26
4.2.1	Cell-SELEX	28
4.2.2	Tissue-SELEX	29
4.2.3	Metoda SELEX založená na afinitní chromatografii s využitím magnetických částic.....	30
5	POUŽITÍ APTAMERŮ	32
5.1	APTAMERY V DIAGNOSTICE.....	32
5.1.1	Aptasenzory.....	33
5.1.2	Aptamerové mikročipy (aptamer microarrays).....	33
	ALFA-aptamerový laterální chromatografický test.....	35
5.1.3	35	
5.1.4	ELASA (Enzyme-linked Aptasorbent Assay).....	37
	Aptamerový multiplexní test.....	39
5.1.5	39	
5.1.6	Aptamery v zobrazovací technice.....	39
5.1.7	Aptahistochemie	39
5.2	APTAMERY V TERAPII	40
5.2.1	Konjugáty aptamerů v cílené léčbě	42
5.2.2	Využití aptamerů v onkoterapii.....	43
5.2.3	Využití aptamerů v terapii kardiovaskulárních onemocnění.....	44
5.2.4	Využití aptamerů v terapii infekčních chorob	45
5.2.5	Využití aptamerů v terapii autoimunitních onemocnění	45
5.2.6	Využití aptamerů v terapii neurodegenerativních onemocnění	46
6	NĚKTERÉ KOMERČNĚ DOSTUPNÉ APTAMERY	47
7	ZÁVĚR	49

8	POUŽITÁ LITERATURA.....	50
---	-------------------------	----

1 Úvod

Aptamery jsou synteticky vytvořené oligonukleotidy nebo peptidové molekuly, které se mohou vázat na cílové molekuly s vysokou afinitou a specifitou. Byly poprvé vytvořeny před více než 30 lety, kdy dvojice vědců Tuerk a Gold vyvinuli metodu SELEX. S její pomocí je možné vybírat z knihoven oligonukleotidových sekvencí ty, které mají vysokou specifitu a afinitu k danému cíli. SELEX tedy umožnil produkovat afinitní ligandy rychle bez použití buněk, za současného zajištění konzistentní kvality [1]. Krom aptamerů založených na nukleových kyselinách existují i aptamery peptidové. Ty se z knihoven selektují poněkud odlišnými metodami, ale také nacházejí poměrně široké uplatnění [2]. S vytvořením aptamerů tak nastal nový přelom, a to nejen v medicínských oborech, kde bylo do této doby nutné spoléhat se pouze na použití protilátek [1]. Protilátky jsou glykoproteiny, které díky své schopnosti vázat antigeny hrají klíčovou roli ve fungování imunitního systému [3]. V době svého objevu i ony přinesly revoluci na poli medicíny, protože otevřely cestu k možnosti pasivní imunizace organismu, a dokonce i k terapii organismu již vystaveného toxickému infekčnímu agens (např. vzteklna). Na přelomu 19. a 20. století začaly vznikat první vědecké práce zaměřené na jejich získávání a využití a už v roce 1901 by za práci v této oblasti udělena první Nobelova cena [4, 5]. V současné době rozlišujeme tři generace protilátek polyklonální (pAbs), které se získávají z krevní plazmy donora, monoklonální (mAbs), získávané klonováním imobilizovaných B-lymfocytů, a rekombinantní (rAbs), které jako jediné nevyžadují při výrobě hostitele [6]. Vlastnosti protilátek ani proces jejich výroby však nejsou dokonalé a přináší řadu nevýhod jejich použití [3] a právě pro své nesčetné výhody oproti protilátkám nabývá výzkum aptamerů na významu [1].

2 Struktura aptamerů

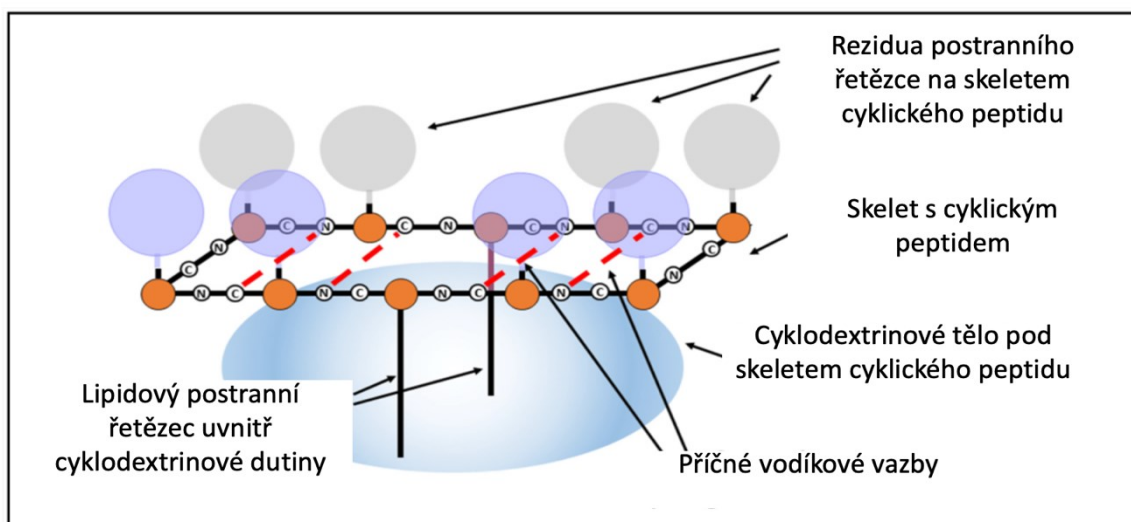
Existují dva základní strukturní typy aptamerů – peptidové aptamery a aptamery tvořené krátkými molekulami buď kyseliny ribonukleová (RNA), nebo jednovláknové kyseliny deoxyribonukleové (ssDNA). Struktura a prostorové uspořádání aptamerů určují jejich vazebné vlastnosti [7].

2.1 Peptidové aptamery

Peptidové aptamery (PA) jsou malé modulární [8], kombinatoriální proteiny, které jsou syntetizovány tak, aby se vážaly na specifická místa na cílových molekulách. Jedná se v podstatě o zmenšená analoga imunoglobulinových T-buněčných receptorů [9]. Právě jejich struktura je klíčovým faktorem pro jejich schopnost vázat se specificky na cílovou molekulu a vykazovat požadované biologické vlastnosti [7]. Strukturu, stejně jako jejich stabilitu a další vlastnosti, zásadně ovlivňuje způsob jejich získávání [10]. Obecně lze však říci, že PA se skládají ze dvou funkčních domén [89]. První doménu tvoří krátká sekvence 5 až 20 aminokyselin, které jsou typicky uspořádané do variabilní peptidové smyčky. Ta je vložena do druhé funkční domény, stabilního proteinového či neproteinového skeletu, který zajišťuje neměnnost konformace [9]. Takto vzniklá trojrozměrná struktura PA je tedy dána nejen peptidovou sekvencí, její délkou a pozicí ve skeletu, ale částečně také závisí na druhu aminokyselin v místě vložení a dostupném konformačním prostoru skeletu. Prostorové uspořádání aminokyselin v rámci peptidového řetězce je ovlivněno jejich chemickými vlastnostmi a vzájemnými interakcemi. Vysoká specifita a afinita PA, zajištěná navázáním uzavřené peptidové sekvence na skelet, umožňuje kompetici PA s endogenními interakcemi mezi proteiny, a PA tak mohou být použity jako vysoce efektivní inhibitory interakcí mezi specifickými proteiny. Ve struktuře PA se mohou vyskytovat i lineární peptidové řetězce, které nejsou přímo spojeny s proteinovým skeletem a také C-nebo N-koncem částečně uzavřené. Problém takových struktur spočívá v tom, že se mohou vyskytovat ve více konformacích, a tak nejsou příliš vhodné pro kompetitivní peptidové interakce [8]. Jejich afinita k cílovým strukturám bývá obvykle nižší [11]. Použití uzavřených peptidových aptamerů s disulfidickými vazbami a prezentací na povrchu známého proteinového skeletu namísto lineárních zvyšuje stabilitu a sílu jejich vazby na cílovou molekulu [11, 12].

Při výběru PA je zásadní také správný výběr příslušného typu skeletu. Obecně platí, že ideální skelet vykazuje následující vlastnosti: rigidnost, monomerní struktura, kompaktnost, vysoká stabilita, rozpustnost, netoxická povaha, neschopnost interagovat s buněčnými molekulami či organelami, nepřítomnost jakékoli enzymatické aktivity [8, 9, 13]. Podobně jako imunoglobulinové oblasti komplementarity (CDR) ve struktuře protilátek, které jsou odpovědné za vázání antigenu, slouží tzv. proměnlivé povrchy skeletů PA k rozpoznání a navázání specifických cílových molekul [8]. Existují dva základní přístupy k výběru proteinového skeletu – použití malých, na protilátkách založených skeletů nebo využití přirozeně pevných proteinových struktur, které nevycházejí z imunoglobulinů a které mohou být dále geneticky upraveny za vytvoření oblastí s vysokou afinitou, aniž by se ohrozila jejich celková stabilita. Existuje více typů skeletů vytvořených různými postupy, které však většinou vycházejí buď z konceptu „Loop on a Frame“ (např. bakteriální thioredoxin A (TrxA), avimery apod.), nebo využívající pevné kombinatorické vzorce (např. Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPs), Armadillo Repeat apod.) [9].

Obrázek 1 znázorňuje základní strukturu PA, kde je použit jednoduchý cyklický deka-peptid. Z aminokyselin vybíhají na každé straně prstence prodloužené postranní lipidové řetězce, které díky nekovalentní hydrofobní interakci způsobují uzavření celé struktury. Stabilita je zajištěna vybořením komplexní struktury s cyklodextrinem, čímž jsou oba postranní lipidové řetězce udržovány uvnitř polysacharidové kostry a působí jako pevná opora peptidového cyklu uspořádaného v jedné rovině. Dále zvyšují stabilitu struktury vodíkové vazby, které příčně spojují příslušná místa peptidového cyklu. Nad skeletem cyklického peptidu se nachází vedlejší řetězce aminokyselin, které poskytují specifická místa pro vázání cílových molekul prostřednictvím vodíkových, elektrostatických či hydrofobních vazeb s cílovými molekulami. Nevhodným výběrem či umístěním těchto řetězců však může dojít ke ztrátě specifity nebo afinity aptameru k cílovým molekulám. Takto se může ovlivnit i schopnost aptameru dosáhnout správné konformace [12].

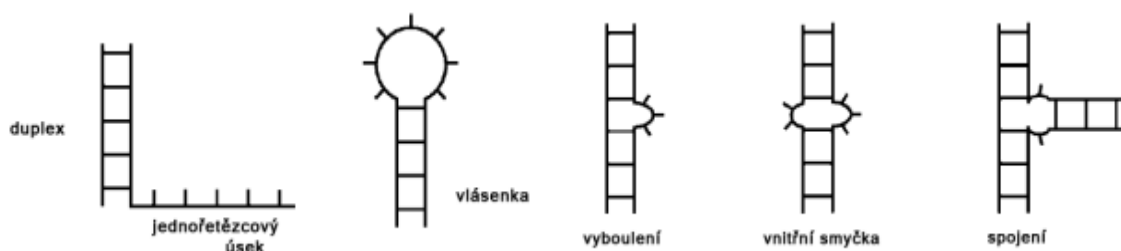


Obrázek 1 Struktura a konfigurace peptidového aptameru. Převzato a upraveno dle [12].

2.2 Aptamery tvořené nukleovými kyselinami

Nukleové kyseliny (deoxyribonukleová (DNA) a ribonukleová (RNA)) se skládají ze spojených sérií nukleotidů. Každý nukleotid tvoří sacharid (pentóza 2-deoxyribóza u DNA a ribóza u RNA), fosfátová skupina a jedna z bází obsahujících dusík (pyrimidiny a puriny). Nukleové kyseliny hrají zásadní roli při kódování, přenosu a expresi genetické informace, ale mohou také působit jako funkční molekuly, které vykazují vlastnosti vázání ligandu, nebo dokonce enzymatickou aktivitu [14].

Aptamery tvořené nukleovými kyselinami jsou krátké molekuly RNA nebo jednovláčkové ssDNA, uspořádané do různých tvarů, a to díky tendenci vytvářet spirály nebo jednovláčkové smyčky [15, 16]. Primární strukturu DNA a RNA aptamerů tvoří specifická lineární sekvence nukleotidů o několika desítkách až stovkách jednotek. Složitější sekundární struktury vznikají intramolekulárními interakcemi párování bází. Patří sem například tvar vlásenky (hairpin, stem/loop), vnitřní smyčky (internal loop), vyboulení (bulge) nebo větvené struktury (obrázek 2), které se mohou vyskytovat jako součást sekundární i terciární struktury [17].



Obrázek 2 Struktura aptamerů charakteristických tvarů. Převzato a upraveno dle [16].

Po složení sekundární struktury do složitějšího trojrozměrného tvaru vzniká terciární struktura. K její stabilizaci dochází interakcemi mezi vzdálenými oblastmi sekvencí (např. pseudouzly) [17]. Vazby aptameru na cílovou molekulu je dosaženo její vlastní specifickou trojrozměrnou strukturou [15]. Vzory vazebných míst nukleových aptamerů přímo ovlivňují jejich specifitu a afinitu k cílovým molekulám. Tyto vzory mohou zahrnovat strukturované sekvence poskytující vazebnou kapsu nebo sekvence, které s cílovou molekulou reagují přímo [17]. Při vazbě aptameru na cílovou molekulu dochází k interakcím způsobeným kompatibilitou struktur, uspořádáním aromatických kruhů, elektrostatickými a Van der Waalsovými interakcemi a také vodíkovými vazbami. Tyto efekty mohou působit samostatně nebo se vzájemně kombinovat [18]. Základní rozdíl mezi DNA a RNA je v chemické povaze jejich nukleotidů. RNA aptamery s ribózou a uracilovými bázemi mohou tvořit více rozmanité struktury díky přítomnosti 2'-hydroxylové skupiny. Tak může vznikat více intramolekulárních interakcí. I když DNA aptamery neposkytují takovou rozmanitost, vykazují větší stabilitu a rezistenci vůči nukleázám [17].

Síla interakce mezi aptamerem a jeho cílem je charakterizována disociační konstantou (K_d). Platí, že čím je hodnota disociační konstanty nižší, tím se zvyšuje vazebná afinita. Hodnota K_d aptamerů se typicky pohybuje mezi mikromolárními (nízká afinita) až pikomolárními hladinami (vysoká afinita) [14]. Aptamery jsou schopné obtočit se kolem cíle v případě malé molekuly nebo zapadnout do štěrbin a mezer na povrchu velkých cílových molekul. Flexibilní trojrozměrná struktura tohoto druhu aptamerů může podléhat konformačním změnám, čímž je umožněna jejich vazba na širokou škálu cílových molekul, což představuje značnou výhodu oproti jiným afinitním molekulám (např. protilátkám), jejichž vazebné vlastnosti jsou limitované [15]. Aptamery jsou schopny rozpoznávat peptidy [19], proteiny [20], metabolity [21], malé organické sloučeniny [22], sacharidy [23], biologické kofaktory [24], ionty kovů [25], toxiny [26] a celé organismy, jako jsou viry [27], patogenní bakterie [28] a kvasinky [29] a savčí buňky [30].

3 Porovnání aptamerů a protilátek

Protilátky jsou stále hojně využívané sloučeniny s širokým uplatněním ve výzkumu i klinické praxi (diagnostika, terapie) [31]. I když mají aptamery obdobné funkce jako protilátky, svými výhodami jsou schopné je předčít [32]. Jednotlivé aptamerové „šarže“ se neliší kvalitou tak, jako je tomu u protilátek. Aptamery jsou totiž produkovány chemickou syntézou [33, 34], proto je struktura aptamerů v porovnání s protilátkami stabilní. Nedochozí u nich k ireverzibilním změnám struktury např. vlivem teploty. Zatímco protilátky podlehnou už při laboratorní teplotě denaturaci, aptamery se po eliminaci nepříznivých teplotních podmínek vracejí do původní konformace a dochází k jejich renaturaci (pro aptamery anglicky „reversible conformation switching“). To se týká i změn pH, působení ligandů a jiných podmínek prostředí [35, 36]. Na druhou stranu stabilita aptamerů není absolutní. Velkým problémem RNA a DNA aptamerů je například jejich náchylnost k nukleázovému rozkladu v kyselém prostředí, kdy řešení přináší například další chemická modifikace, tvorba tzv. spiegelmerů (aptamery se zrcadlově obrácenými nukleotidy) apod. [37, 38]. Krom rizika jejich degradace u aptamerů hrozí i křížová reaktivita s komplexnějšími cílovými analyty. Diverzita složek, které tvoří aptamery je značně omezená, pokud porovnáme čtyři nukleotidy u DNA / RNA zapojených do struktury oproti 20 aminokyselinám u protilátek [38].

Na rozdíl od protilátek, kde hrozí tvorba nespecifických vazeb, jsou aptamery schopné vázat se k cílovým molekulám s vysokou přesností, a tak například umožnit provedení diagnostických i terapeutických zákroků mnohem efektivněji. I vazebná afinita je u aptamerů vyšší než u protilátek, takže v porovnání s protilátkami je k těmto reakcím potřeba menší množství aptamerů, což přináší finanční úsporu. Aptamery mají také vysokou specifitu k cíli a na rozdíl od protilátek se u aptamerů předpokládá nízká imunogenicita a nízká toxicita, jelikož nukleové kyseliny nejsou typicky rozpoznávány lidským imunitním systémem jako cizorodé látky a nezpůsobí tak imunitní odpověď [39]. Protilátky jsou známé jako větší molekuly, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 150-180 kDa a jejich velikost až 15 nm. Zatímco aptamery jsou malé molekuly o molekulové hmotnosti 6-30 kDa a velikosti o 2 nm. Díky jejich menší velikosti mají flexibilnější strukturu, což jim umožňuje vázat se na menší cíle nebo skryté vazebné domény, které jsou pro větší protilátky nepřístupné [40]. Přehledné srovnání aptamerů poskytuje tabulka 1.

Tabulka 1: Srovnání aptamerů a protilátek. Převzato a upraveno dle [32].

Charakteristika	Aptamery	Protilátky
<i>Afinitní cíle</i>	jakékoli (např. ionty, celé buňky)	běžné proteiny a hapteny (s obtížemi neimunogenní a toxické cíle)
<i>Produkce</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i> (živočišná imunizace)
<i>Produkce</i>	chemická syntéza (nízké náklady)	většinou biologická, zdlouhavá, nákladná
<i>Variabilita kvality šarží</i>	šarže uniformní	šarže rozdílné
<i>Stabilita</i>	redoxně stabilní; obtížně agregují z důvodu absence velkých hydrofobních jader; tolerantní ke změnám pH a teploty	redoxně senzitivní; snadná agregace; citlivé ke změnám pH a teploty
<i>Životnost</i>	dlouhá; snadný transport bez nutnosti chlazení	krátká; vyžadují stálé chlazení
<i>Afinita</i>	nanomolární až pikomolární rozsah	nanomolární až pikomolární rozsah
<i>Možnosti modifikací</i>	snadné; s nízkými náklady	obtížné; s vysokými náklady
<i>Opakovaná použitelnost</i>	ano (reversible conformational switch)	velmi omezená (nevratné konformační změny)
<i>Použití in vivo</i>	nízká imunogenicita a biologická dostupnost	vysoká imunogenicita a biologická dostupnost

4 Výroba aptamerů

Zvolený přístup a technika, jímž se aptamery získávají, se liší podle typu aptameru [8]. Výroba aptamerů však vždy vychází z velkých knihoven, které obsahují rozmanité sekvence schopné vazby na specifické cílové molekuly [11]. Ať už je zvolen kterýkoli postup, platí, že musí vždy zahrnovat amplifikaci požadované struktury pro umožnění opakované selekce a identifikaci sekvenováním DNA. U peptidových aptamerů se toho dosahuje jejich napojením na genetickou informaci, která je kóduje. Buď se jedná o napojení přímé, nebo se uskuteční skrze navázání na buněčné prostředí. U aptamerů založených na nukleových kyselinách se využívá metoda SELEX [9].

4.1 Výběr peptidových aptamerů z knihoven

PA mohou být vybírány různými biomolekulárními metodami – pomocí kvasinkového dvouhybridového systému (yeast two-hybrid strategy, Y2H), prezentací peptidů pomocí fágů (phage display), mRNA (mRNA display), ribozomů (ribosome display) a DNA (DNA display). Tyto metody umožňují efektivní výběr peptidové sekvence s požadovanou afinitou a specificitou k cílové molekule [9,10].

4.1.1 *In vivo* systémy

Tyto systémy jsou založeny na nitrobuněčné komplementaci proteinových fragmentů, přičemž nejčastější technikou je kvasinkový dvouhybridový systém [9], který využívá *Saccharomyces cerevisiae* jako hostitelské buňky pro syntetickou genovou strukturu, a tím umožňuje zkoumání interakcí mezi peptidovými aptamery a cílovými molekulami. Proces selekce zahrnuje dva zpočátku oddělené plazmidy, které obsahují kvasinkový transkripční faktor Gal4, a kvasinkovou buňku, do níž se vkládají. Jeden z plazmidů obsahuje aktivující doménu AD (Gal4 AD), na kterou je navázán cílový protein (tzv. „prey“ / kořist), a druhý plazmid obsahuje DNA-vazebnou doménu BD (Gal 4 BD) s navázaným aptamerem (tzv. „bait“ / návnada). Oba plazmidy jsou vloženy do kvasinky, u níž byla předem provedena delece genů Gal4 AD a Gal4 BD. Pokud dojde k interakci mezi kořistí a návnadou, Gal4 AD a Gal4 BD vytvoří funkční transkripční faktor, příslušné reportérové geny se aktivují a následně se vytvoří barevný nebo fluorescenční produkt [8, 41]. Tato selekce je tedy založena na změně fenotypu, která je spuštěna interakcí cílového proteinu s peptidovým řetězcem [9].

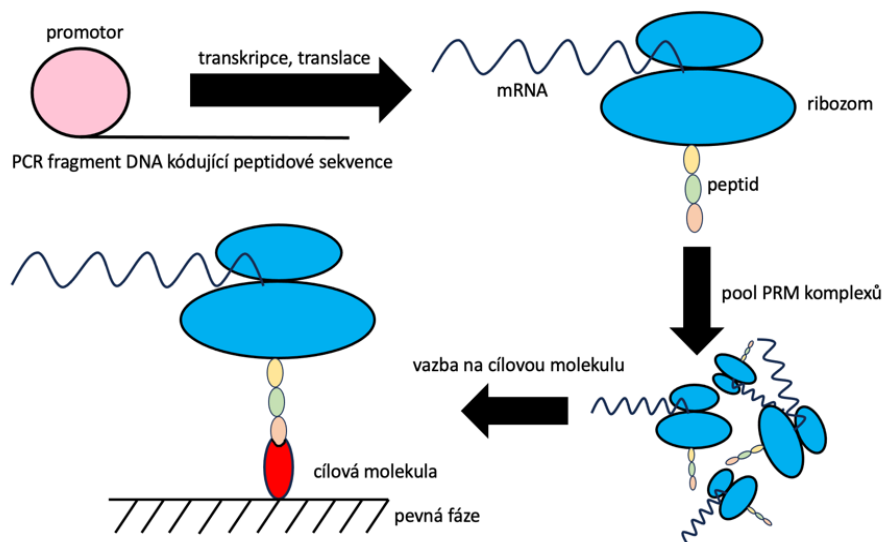
4.1.2 Systémy extracelulární prezentace

Zde existují tři základní podskupiny metod: prezentace na povrchu buněk nebo filamentózních fágů a *in vitro* metody, do nichž spadá prezentace pomocí mRNA, ribozomů, DNA a *in vitro* kompartmentalizace (IVC) [9]. Prezentace peptidů pomocí fágů zahrnuje několik kroků a vychází z knihovny velkého množství různých peptidových sekvencí, které se přepisují do genetické informace jako fragmenty DNA. Každý typ peptidové sekvence s charakteristickými vazebnými vlastnostmi je tedy zastoupen svým DNA fragmentem. Tyto fragmenty jsou pak spojeny s genem, který kóduje specifický obalový protein (coat protein, CP) fága, čímž se umožní jeho prezentace na povrchu fága. Tradičně používaným fágem je filamentózní fág M13 a jemu příbuzné kmeny fd a f1. Tyto bakteriofágy mají genom tvořený jednovláknovou DNA (ssDNA) pokrytou obalovými proteiny [42, 43]. Po fúzi a prezentaci dochází k inkubaci s cílovou molekulou, kdy se vyberou struktury s požadovanou afinitou k této molekule. Po přečištění nastává fáze amplifikace, kdy se zvoleným fágem infikuje bakteriální hostitel, obvykle *Escherichia coli*, a tak se vytvoří velké množství aptamerových klonů pro opakované selekční cykly. Tato metoda je sice poměrně snadná a fágové částice jsou vysoce stabilní, ale polypeptidy mohou dosahovat jen omezených velikostí, sekvencí a prostorového uspořádání, jelikož příliš velké molekuly by mohly narušit strukturu a funkci proteinového obalu fága [43]. Jako řešení těchto nedostatků byl vyvinut fagemidový prezentační systém (fagemid display system). Fagemidy jsou bakteriální plazmidy, které navíc obsahují část genomu vybraného fága. Když se fagemidy vloží do bakteriálního hostitele, jsou prezentovány jak cílené fúze, tak také samovolně vznikající obalové proteiny. Tyto systémy tedy kombinují výhody využití fágů a plazmidových vektorů, a tak poskytuje větší flexibilitu a možnosti manipulace s vektorem [44]. Fágová prezentace nemusí být omezena jen na výše uvedené tradiční bakteriofágy. Využit lze například také bakterie [45], baciloviry [46], lytické fágy T4 a T7 [47].

Prezentace peptidů pomocí mRNA využívá *in vitro* translaci za účelem přímého spojení genetické informace s odpovídajícím peptidovým řetězcem. Tak lze vytvořit mnohem komplexnější polypeptidové knihovny než při použití fágové prezentace [48]. K různorodým sekvencím mRNA jsou přidány DNA linkery, které mají na 3' konci navázáno aminonukleosidové antibiotikum puromycin. Ve chvíli, kdy puromycin vstoupí do aminokyselinového místa (A místa) ribozomu, dojde k ukončení translace a vytvoření stabilní kovalentní vazby v komplexu mRNA-peptid [49]. Přesněji řečeno molekula mRNA projde po translaci reverzní transkripcí, čímž se vytvoří komplex složený z DNA, RNA

a polypeptidu [50]. Velikost vznikající knihovny je omezena množstvím ribozomů ve vzorku. Tyto komplexy se následně purifikují a selektují [11, 49]. Ve fázi selekce se přidá molekula, k níž se mají aptamery vázat, a ty s vysokou afinitou se izolují [49] a přímo amplifikují pomocí polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR) [50].

Prezentace peptidů pomocí ribozomů je obdobný proces, který začíná transkripcí DNA šablony kódující příslušný peptid do sekvence mRNA za pomoci RNA polymerázy. Tato mRNA je pak následně použita jako šablona pro translaci do požadované sekvence peptidu. Vzniká ribozomový komplex složený z ribozomu, mRNA a faktorů nezbytných pro translaci. Při translaci se řetězec postupně prodlužuje o navazované aminokyseliny. Hovoříme o tzv. PRM komplexu (protein-ribozom-mRNA), který zůstává stabilní díky vytvoření pevné kovalentní vazby. Ta je zajištěna přidáním speciálních adaptérů – oligonukleotidů, které mají na jednom konci specifickou sekvenci vázající se na ribozomální podjednotku a na druhém konci se nachází sekvence pro připojení mRNA. Zcela zde chybí stop kodon, který by inicioval rozpad komplexu [51, 52]. Následně je opět provedena inkubace PRM komplexu s cílovou fluorescenčně značenou molekulou na pevné fázi (např. agaróza), nevázané a slabě vázané látky se vyperou, při eluci se PRM komplex uvolní z pevné fáze (použití elučního činidla nebo změnou podmínek) a PRM komplex podroben reverzní transkripci a amplifikován (např. pomocí PCR) [52]. Proces tvorby PRM komplexu a jeho vazby na cílovou molekulu schématicky znázorňuje obrázek 3.



Obrázek 3 Tvorba PRM komplexu a jeho vazba na cílovou molekulu.

Další metodou z této kategorie se prezentace peptidů pomocí DNA. Postup je obdobný jako u prezentace pomocí mRNA, avšak s tím rozdílem, že zde se využívá pevná fáze ke spojení DNA sekvence s odpovídajícím peptidovým řetězcem. Na povrchu pevné fáze jsou připojeny

oligonukleotidy, které nesou genetickou informaci kódující požadovaný peptidový řetězec [53]. Komplex DNA, RNA a peptidu před selekcí, na rozdíl od mRNA prezentace, musí projít ještě štěpením RNazou H [50]. Tento postup řeší problém nukleázového rozpadu RNA, ke kterému dochází u mRNA prezentace [54].

Posledním zástupcem této kategorie systému je *in vitro* kompartmentalizace (IVC). Tato metoda opět vychází z knihovny různých sekvencí peptidů kódovaných prostřednictvím DNA. Prvním krokem je tzv. kompartmentalizace, kdy je tato knihovna vložena do malých kompartmentů, např. kapiček emulze voda-olej nebo lipozomů. Tyto kompartmenty simulují prostředí buňky [55]. Každý obsahuje jednu DNA molekulu s nezbytným ústrojím pro transkripci a translaci. Po translaci na danou peptidovou strukturu jsou tyto kompartmenty vystaveny kontaktu s cílovou molekulou a v procesu selekce se vyberou ty s největší vazebnou afinitou. Kompartmenty, které obsahují žádanou strukturu se otevřou, aby bylo možné je izolovat. K tomuto účelu lze využít průtokovou cytometrii (fluorescence-activated cell sorting (FACS)). Následně opět dochází k amplifikaci např. pomocí PCR [56, 57].

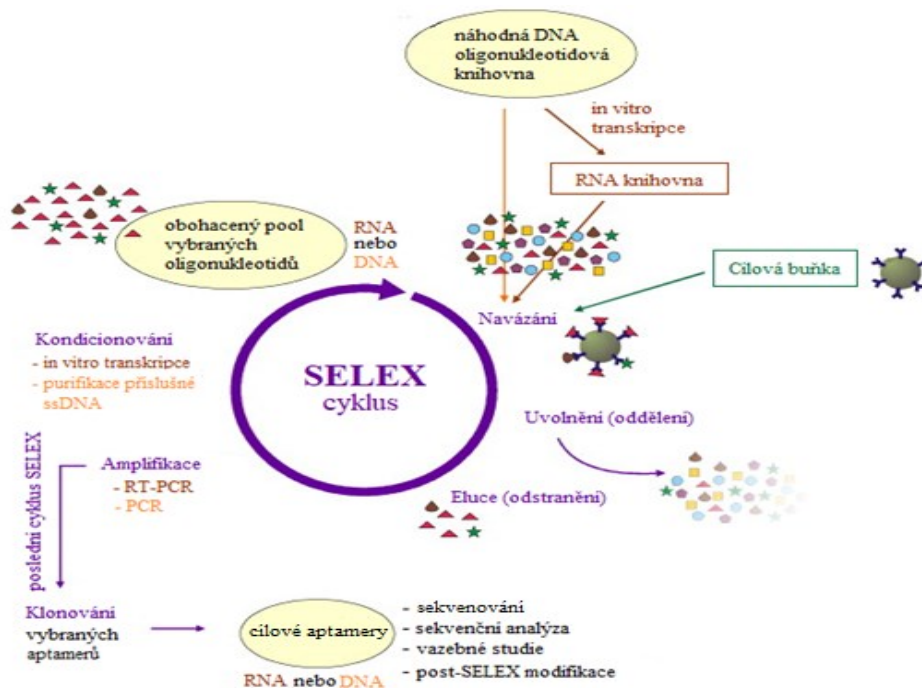
Volba metody závisí na několika faktorech jako je požadovaná struktura aptamerů, typ interakce, komplexnost knihovny, technická dostupnost apod. DNA prezentace peptidů je vhodná např. k výrobě peptidových aptamerů bohatých na disulfidy [107]. Pokud je například cílem výzkumu typ interakce s proteinem, jako vhodnější se jeví metody prezentace pomocí mRNA nebo ribozomů, protože tyto peptidy jsou schopné přímé interakce s cílovými proteiny [50, 52]. Na druhou stranu vytvoření rozmanitější knihovny umožňuje prezentace pomocí DNA, jelikož umožňuje snazší amplifikaci a manipulaci s DNA sekvencemi [58].

4.2 Metoda Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX)

Aptamery tvořené nukleovými kyselinami jsou vybírány pomocí metody SELEX. Jedná se o vývojový proces, ve kterém se používají postupná opakování selekce a amplifikace s následným sekvenováním a charakterizací. Aptamery patří mezi nejjednodušší genetické entity, které mají jak genotypové, tak fenotypové vlastnosti a jsou schopné dědičnosti v *in vitro* selekčním experimentu [59].

Výchozím bodem je knihovna synteticky vytvořených náhodných sekvencí oligonukleotidů představovaných fragmenty ssDNA (celkem 10^{13} až 10^{15} sekvenčních vzorců) [60]. Sekvence obsahují vždy centrální variabilní část (30 až 120 nukleotidů) s neměnnými sekvencemi na obou koncích [61]. Tato knihovna se používá přímo pro výběr DNA aptamerů. Pro výběr

RNA aptamerů musí DNA knihovna projít transkripcí do knihovny RNA. Postup SELEX je charakterizován opakováním po sobě jdoucích kroků, které zahrnují vazbu, separaci a eluci s následnou amplifikací [62]. V prvním cyklu je náhodný pool nukleotidových sekvencí vystaven cílové molekule. Za předem stanovených podmínek dochází k přímé inkubaci poolu a cílové molekuly, aby mohlo dojít k navázání sekvencí s vysokou afinitou k cílové molekule. Nenačnané oligonukleotidy jsou od vytvořených komplexů odděleny např. odstředěním, filtrací nebo afinitní chromatografií. Následně proběhne eluce vázaných oligonukleotidů a jejich amplifikace pomocí PCR nebo PCR reverzní transkripcí (RT-PCR), čímž se zvýší počet sekvencí s vysokou afinitou k cílové molekule (viz obrázek 4). Pool požadovaných sekvencí se zvyšuje, když se kroky vazba, separace a amplifikace opakují. Po několika cyklech selekce mohou být jednotlivé sekvence naklonovány a sekvenovány za účelem přesné identifikace a charakterizace získaných aptamerů [63, 64].



Obrázek 4 Schéma znázorňující přípravu aptamerů metodou SELEX. Převzato a upraveno dle [64].

Obecně je pro výběr vysoce afinních, cílově specifických aptamerů potřeba 6 až 20 cyklů. Počet nutných cyklů závisí na řadě parametrů, jako jsou cílové vlastnosti a koncentrace, návrh výchozí knihovny náhodných DNA oligonukleotidů, podmínky selekce, poměr cílových molekul k oligonukleotidům nebo účinnost rozdělovací metody. Poslední cyklus je dokončen po amplifikaci [64].

Metoda SELEX se dělí dle průběhu a vznikajících produktů na: Genomic SELEX, Neutral SELEX a Multiplexed massively parallel SELEX (MMPS). Genomic SELEX je pozměněná

metoda SELEXu, která generuje z genomu RNA nebo DNA sekvence, které se vážou na cílové molekuly a nazýváme je genomové aptamery. Neutral SELEX se liší od SELEXu tím, že vynechává selekční krok, tudíž se amplifikují všechny sekvence vznikající po „evolučním“ kroku. MMPS je metoda, která je zaměřená na analýzu velkého množství transkripčních faktorů [65].

4.2.1 Cell-SELEX

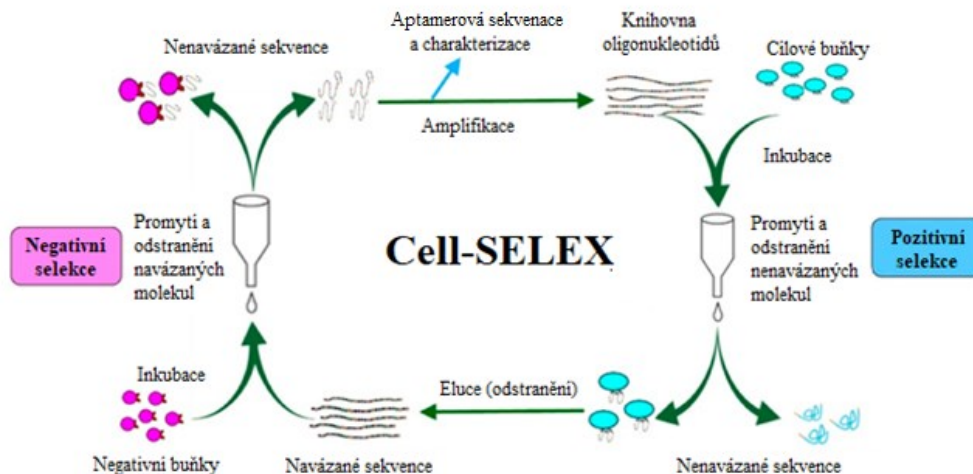
Modifikace tradiční metody SELEX, při které se jako cíle používají celé živé buňky, byla vytvořena jako cell-SELEX. V roce 1998 Morris a Jensen poprvé použili membrány lidských červených krvinek jako cíl komplexní směsi aptamerů k jejich selekci právě pomocí metody cell-SELEX. Tato metoda tedy umožňuje *in vitro* izolaci vysoce afinitních aptamerů specificky zaměřených na různé cílové molekuly [66].

V současnosti se metoda cell-SELEX používá zejména k identifikaci a výběru aptamerů, které mohou pomoci při diagnostice a také při léčbě různých onemocnění, zejména rakoviny [31].

Nejběžnější strategií je zvýšená exprese požadovaného proteinového receptoru na buňkách, které původně neexprimují cílový protein. Transformované buňky se poté použijí pro tzv. pozitivní selekci. Buňky pěstované na kultivační misce se inkubují s knihovnou ve vhodném prostředí a povrchově vázané ligandy se odstraňují pomocí EDTA při vysoké teplotě nebo pomocí Trizolu (v případě RNA SELEX). Zbytek postupu je stejný jako postup SELEXu s čistým proteinovým cílem [67].

Postup sestává ze tří hlavních kroků, které lze prokládat dalšími dílčími kroky [31] (viz obrázek 5):

1. příprava knihovny ssDNA nebo RNA
2. inkubace cílových molekul s knihovnou jako krok pozitivní selekce
3. amplifikace vybraných řetězců.



Obrázek 5 Schématické znázornění výběru aptameru pomocí Cell – SELEX. Převzato a upraveno dle [16].

Před nebo po pozitivní selekci lze provést některé dílčí kroky, kterými mohou být inkubace s protibuňkami (tzv. counter cells), pomocí kterých se odstraní nespecifická vazba alepší se tak selekční proces [31].

Pro generování aptamerů, které mohou specificky cílit na rakovinné buňky, protokol cell-SELEX zahrnuje pozitivní výběr a negativní výběr. Krok negativní selekce je nezbytný k odstranění sekvencí, které se váží na normální buňky, a ke zlepšení specifity kandidátských aptamerů [68].

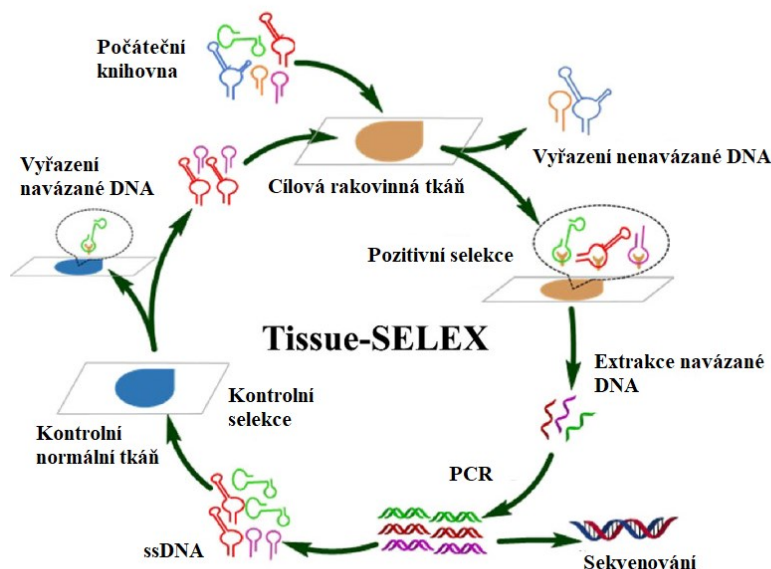
4.2.2 Tissue-SELEX

Rozšířením metody Cell-SELEX je Tissue-SELEX, ve které se selekce provádí na fixovaných tkáňových řezech. Kromě přímého cílení na reprezentativní nádorovou tkáň je další předností Tissue-SELEX to, že umožňuje přípravu aptamerů pro více cílových molekul, včetně membránových složek a intracelulárních molekul [67]. Schematicky je postup Tissue-SELEX uvedený na obrázku 6.

Tato technologie byla rozšířena o aplikaci in vivo, která je testována na myších s rakovinou. To umožňuje identifikovat RNA aptamery, které rozpoznávají buněčné cíle. Především markery pro různá onemocnění jako jsou rakovina tlustého střeva nebo jater [69].

Podle výzkumu Li a kol. (2021) identifikovali nový DNA aptamer SW1 pomocí Tissue-SELEX, ve kterém byly řezy rakovinné jaterní tkáně použity jako pozitivní kontrola a řezy normální jaterní tkáně byly použity jako negativní kontrola. Během selekce byly řezy rakovinné i normální jaterní tkáně obarveny knihovnou ssDNA značenou Cy5 a postup byl monitorován konfokálním zobrazením. Po 11 kolech selekce byla intenzita fluorescence významně zvýšena

v řezech rakovinné tkáně v důsledku obohacení o specifické vazebné aptamery. Naproti tomu u řezů normální jaterní tkáně nebyla pozorována téměř žádná změna fluorescence. Shromážděná ssDNA z 11. kola byla amplifikována, klonována a sekvencována pro identifikaci aptameru [70].



Obrázek 6 Grafické znázornění procesu Tissue-SELEX. Převzato a upraveno dle [70].

Aptamery mohou být použity jako nové molekulární sondy pro diagnostiku a zobrazení nádorů a také k odhalení molekulárních rozdílů, které jsou zodpovědné za onemocnění [71]. Detailnější informace k diagnostickému a terapeutickému uplatnění aptamerů jsou uvedeny v následující kapitole.

4.2.3 Metoda SELEX založená na afinitní chromatografii s využitím magnetických částic

Technika afinitní chromatografie se používá k izolaci složek z biologické směsi. Většinou se používá k purifikaci rekombinantních proteinů a je založena na vysoce specifické afinitní interakci mezi receptorem a ligandem nebo antigenem a protilátkou. Imobilizovaná fáze se obvykle skládá z kuliček na bázi různých materiálů zejména agarózy, které jsou fixovány v koloně, promývány a eluovány mobilní fází [72].

Oddělení oligonukleotidů vázaných na cíl od nevázaných oligonukleotidů je zásadním krokem pro úspěšnou selekci aptamerů. Pokud jde o malé molekuly, často to znamená jejich chemickou modifikaci a následnou imobilizaci na matrici, jako jsou magnetické kuličky nebo agarózový gel [73].

Metoda SELEX tedy využívá afinitní chromatografii ve vazebném a separačním procesu při výběru knihoven oligonukleotidů s afinitou k cílové molekule a imobilizaci cílových

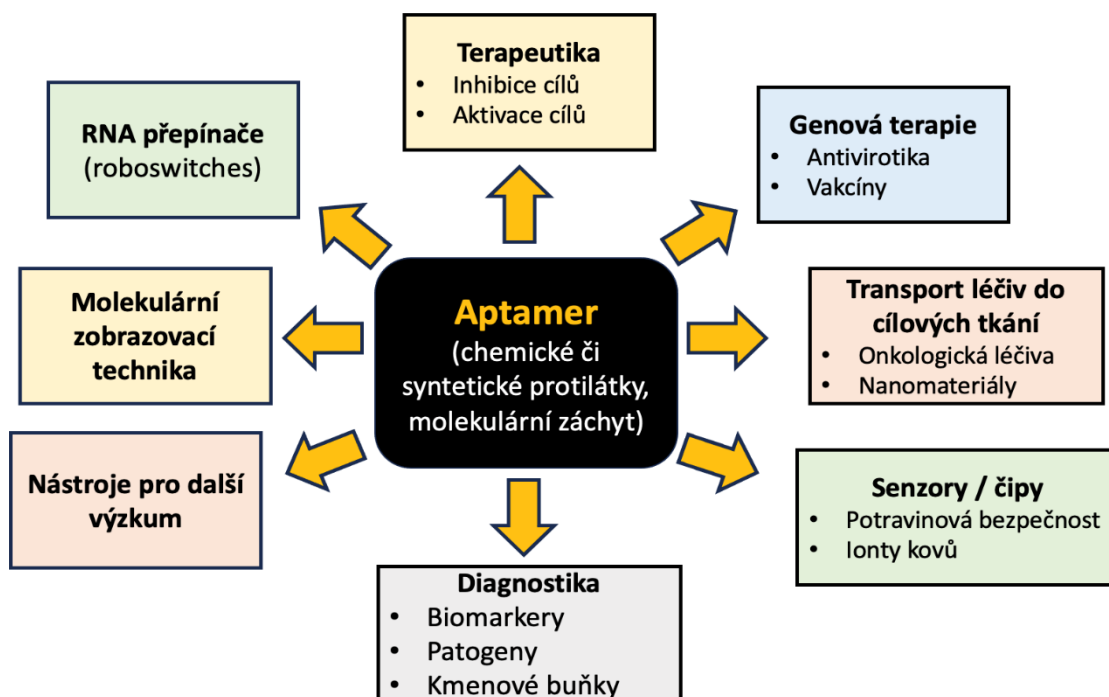
molekul na magnetických kuličkách. Alternativně mohou být cílové molekuly v roztoku inkubovány s knihovnou oligonukleotidů a později zachyceny afinitní pryskyřicí [74].

Metoda SELEX s použitím mikrokolon na bázi afinitní chromatografie minimalizuje množství pryskyřice a aptameru, mrtvý objem i povrch pro nespecifickou vazbu, a navíc usnadňuje multiplexování [74].

5 Použití aptamerů

Zavedení aptamerů do různých vědeckých a technologických oblastí přineslo mnohé pokroky, a to zejména díky výhodám, které aptamery mají oproti běžným afinitním ligandům. Aptamery je možné aplikovat např. v oblastech biomedicíny, diagnostiky, monitorování životního prostředí, zemědělské výroby, potravinářství, farmaceutického průmyslu aj. [15].

Obrázek 7 znázorňuje možná použití aptamerů založených na nukleových kyselinách, avšak i peptidové aptamery mají široké využití [75]. Vzhledem k obsáhlosti této oblasti jsou následující podkapitoly zaměřeny zejména na diagnostické a terapeutické využití primárně RNA a DNA aptamerů.



Obrázek 7 Možná využití aptamerů založených na nukleových kyselinách. Převzato a upraveno dle [15].

Jak bylo uvedeno v kapitole 3, aptamery mají některé nevýhody, a proto by neměly být považovány za konkurenty protilátek, ale spíše za alternativu, která může být v určitých případech výhodnější. O tom, zda v diagnostice či terapii budou aptamery zvoleny, rozhoduje řada faktorů [38].

5.1 Aptamery v diagnostice

V diagnostice je výhodné aptamery použít tehdy, když pro konkrétní antigen nemůže být použita žádná z komerčně dostupných protilátek. Může se také stát, že při analýze dvou

blízkých variant téhož cíle není senzitivita protilátek dostatečně vysoká nebo se aptamery také mohou lépe uplatnit v diagnostických metodách, kde záleží na velikosti molekul. Malé molekuly jsou totiž schopné penetrovat buňky hluboko v tkáních a také v některých diagnostických metodách poskytují silnější detekční signály [38].

5.1.1 Aptasenzory

Biosenzory nabízejí určité provozní výhody oproti standardním fotometrickým metodám, zejména s ohledem na rychlost, snadnost použití, cenu, jednoduchost, přenositelnost a snadnost hromadné výroby. Biosenzory, které jsou založené na aptameru jako rozpoznávacím prvku se nazývají aptasenzory. Tyto aptasenzory mají některé výhody ve srovnání s biosenzory využívající receptory, jako jsou protilátky a enzymy [76]. Aptamerové biosenzory, stejně jako ostatní biosenzory, vždy obsahují dvě základní části – detektor cílové molekuly (aptamer) a signální složku, která po navázání aptameru na cíl poskytuje detekovatelný signál [77].

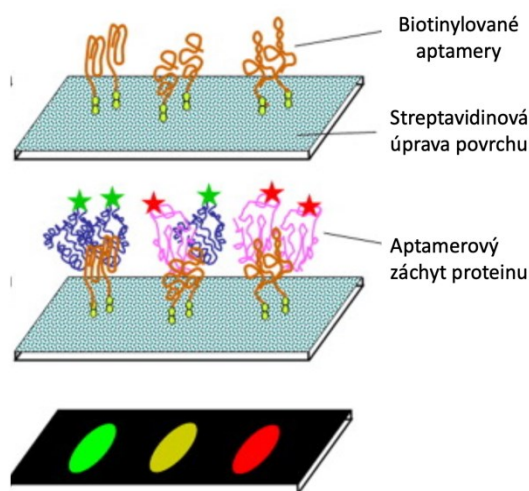
Aptasenzory mohou být založeny na vícero principech a podle toho rozlišujeme například aptamery elektrochemické nebo optické.

Základním principem elektrochemických aptasenzorů je monitorování změny elektrochemických vlastností regulujících složek, takže tuto změnu lze měřit například jako elektrický proud, napětí nebo odpor. Jednotlivé typy se od sebe liší způsobem, jakým je cílová molekula detegována. U sendvičového uspořádání se cílová molekula nachází mezi dvěma aptamery [78]. Ve vytěšňovacím typu s aptamerem soupeří o cíl značená molekula [79] a u skládaného typu aptamer prodělá konformační změnu po navázání na cíl, což opět vyvolá změnu signálu [80].

Optické aptasenzory využívají změny v optických vlastnostech (např. absorpance, fluorescence), ke které dochází po navázání aptameru na cíl [81, 82].

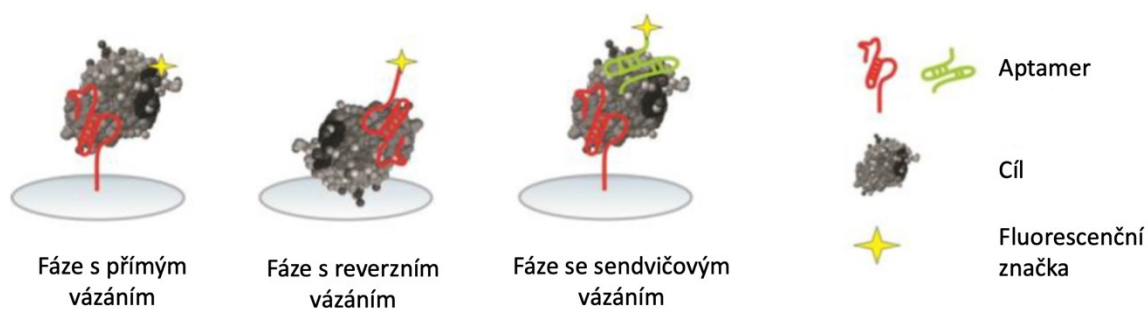
5.1.2 Aptamerové mikročipy (aptamer microarrays)

Aptamerové mikročipy jsou podobné aptasenzorům. Avšak zatímco aptasenzory jsou určeny ke specifické detekci a kvantifikaci cílových molekul za použití aptamerů jakožto detekční molekuly, aptamerové mikročipy slouží jako nástroj pro širokospektrý screening aptamerů, které bude možné použít pro vývoj aptasenzorů. Umožňují také identifikaci nových biomarkerů s následným využitím v diagnostice a prognostice onemocnění. Na základě specifických vazeb, které vznikají mezi aptamery a cílovými molekulami, mohou aptamery sloužit i ke klasifikaci chorob [83, 84].



Obrázek 8 Uspořádání aptamerového mikročipu a záchyt analytu. Převzato a upraveno dle [85].

Klasické DNA čipy umožňují kvantifikovat mRNA ve vzorku jejím přepisem na klonovanou cDNA, fluorescenčním označením cDNA a následným změřením fluorescenční aktivity. Jsou přizpůsobeny interakcím DNA-DNA. Dalším tradičním typem čipu jsou proteinové čipy fungující na principu vazby protilátka – antigen s následným použitím metody ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Avšak, jak je popsáno v kapitole 3 této práce, protilátky vykazují poměrně nízkou stabilitu, a také omezenou trvanlivost. Navíc malé molekuly a některé látky, které neevokují imunitní odezvu organismu, zde nemohou být použity vůbec. Aptamerové čipy se nabízejí jako řešení těchto nedostatků za současného využití výhod poskytovaných DNA čipy. Jejich umístěním a imobilizací na povrchu čipu fungují jako sondy pro detekci cílových látek (viz obrázek 8). Efektivní imobilizace a funkčnosti čipu může být dosaženo vazbou mezi biotinem (v biotinylovaných aptamerech na povrchu) a streptavidinem na povrchu čipu, ale mohou se použít i kovalentní linkery [83]. Existují tři základní formáty aptamerových čipů – s přímým, reverzním a sendvičovým vázáním aptameru a cílové molekuly (viz obrázek 9) [86].



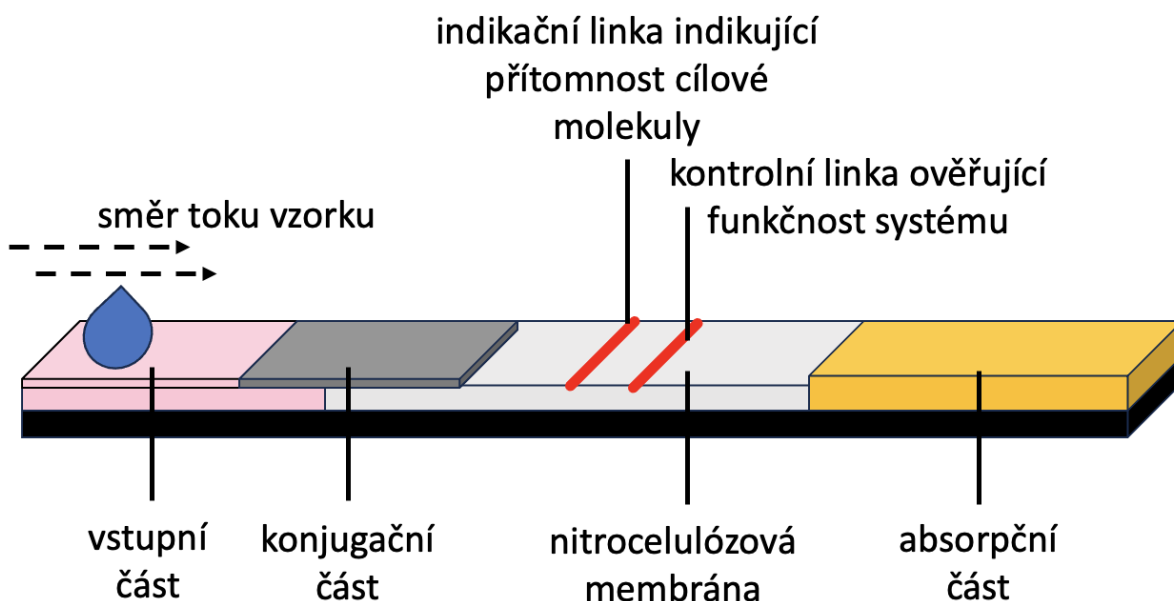
Obrázek 9 Schematický přehled různých formátů aptamerových mikročipů. Převzato a upraveno dle [86].

Kromě oblasti vývoje léčiv a dalšího výzkumu mají aptamerové čipy široké uplatnění v diagnostice. Jejich uplatnění vychází z jejich schopnosti kvantifikovat proteiny, a tudíž je možné jejich využití pro detekci biomarkerů či zvýšené koncentrace biomarkerů [84]. S jejich pomocí byly stanoveny například markery onkologických [87, 88], infekčních (Lidský papilomavirus (HPV) [2], SARS-CoV-2 [89]), kardiovaskulárních [90] a autoimunitních [91] onemocnění a parazitóz [92].

5.1.3 ALFA-aptamerový laterální chromatografický test

V případě ALFA testu (z angl. aptamer lateral flow assay, nebo aptamer strip assay) se jedná o jednoduchou a levnou diagnostickou metodu, která využívá aptamery k rychlé detekci cílových molekul (proteinového i neproteinového charakteru). Na rozdíl od aptamerových čipů nebo aptasenzorů není určen k přesné kvantifikaci cílové molekuly, ale k potvrzení její přítomnosti ve vzorku [93]. Díky těmto vlastnostem může být využit k terénním diagnostickým účelům (point-of-care testing (POCT)) [94]. V porovnání s protilátkovým testem (LFA) disponuje AFLA výhodami aptamerů – například vyšší flexibilitou jejich specifických vazeb [95, 96].

Podobně jako u LFA jsou základem ALFA afinitní interakce mezi imobilizovanými aptamery a cílovými molekulami, které probíhají na papírovém testovacím proužku. Ten se skládá z vrstvy, která je ve styku s analytem (vzorková část), konjugační části (obsahuje aptamer konjugovaný se značkou, např. koloidní nanočástice zlata, který se bude vázat na cílovou molekulu, pokud bude ve vzorku přítomná), nitrocelulózkové membrány a absorpční vrstvy [93, 95, 96]. Schéma uspořádání takového testu je uvedeno na obrázku 10.



Obrázek 10 Schéma testovacího proužku ALFA. Převzato a upraveno dle [97].

Poté, co je vzorek (sliny, moč, krev apod.) aplikován na vstupní vrstvu, dochází k jeho kapilárnímu prostupu proužkem [97]. ALFA využívá dvou základních formátů – sendvičového (např. onkologických markerů) [98] a kompetitivního (např. detekce cholera-toxinu) [98]. Předpokladem sendvičového uspořádání je použití dvou druhů aptamerů (primárního značeného a sekundárního imobilizovaného). Cílové molekuly jsou vázány značeným aptamerem (konjugační část) a unášeny proužkem k části s imobilizovanými aptamery (nitrocelulózová membrána s testovacími liniemi). Indikační linka se tedy vybarví pouze v případě, že analyt obsahuje cílovou molekulu. Za touto linkou se nachází ještě kontrolní linka, která se zbarví tehdy, pokud se proces správně provede, tedy pokud látka projde i tímto místem. Pokud není cíl přítomen, zbarví se tedy jen kontrolní linka [95, 96]. U kompetitivní varianty záleží na použité záchytné molekule na testovací linii. V každé z linií se nachází jeden druh sondy. V indikační linii je sonda, k níž se může vázat volný značený aptamer. Pokud tedy dojde k jeho vazbě na cílovou molekulu, intenzita zbarvení indikačního proužku bude nižší. Testovací linie obsahuje druhý typ sondy, který váže aptamery bez ohledu na jejich vazbu s cílem [93, 99, 100].

ALFA byla zatím testována v diagnostice:

1. Infekčních agens: virových (např. SARS-CoV-2, virus chřipky), bakteriálních (např. *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*) i parazitárních (např. plasmodioví původci malárie) [93, 94, 102]
2. Onkologických onemocnění: detekce onkomarkerů rakoviny prsu, žaludku, plic, vaječníků (marker HER2), tlustého střeva a močového měchýře (markery CEA a CA 19-9) [93, 98, 101]
3. Kardiovaskulárních onemocnění: detekce biomarkerů jako např. kardiální troponiny při infarktu myokardu nebo srdeční formy vazebného proteinu pro mastné kyseliny (H-FABP) ke stanovení akutního koronárního syndromu [103]
4. Autoimunitní onemocnění: detekce autoprotilátek nebo specifických biomarkerů např. revmatoidní artritidy [104], diabetes mellitus prvního typu [97]
5. Těhotenství [105]
6. Identifikace jedů, drog, toxinů [102]

5.1.4 ELASA (Enzyme-linked Aptasorbent Assay)

Pro tuto metodu se používají tyto varianty téhož termínu: Enzyme-linked Aptamer Assay (ELAA), Enzyme-linked Oleonuclide Assay (ELONA), Aptamer-linked Immobilised Sorbent Assay (ALISA) [106].

Úpravou původní imunoanalytické metody ELISA (Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay) sloužící ke kvantifikaci antigenů jejich vazbou na protilátky vznikla ELASA, kdy byla provedena náhrada protilátek aptamery. Tabulka 2 poskytuje přehledné srovnání obou metod. Toto srovnání vychází z prací několika kolektivů autorů. Sensitivita obou metod je obdobná, jak můžeme například zjistit z prací autorů Rotherham et al. (2012) [107] a Fenga et al. (2011) [108], kteří se zabývali sensitivitou monoklonálních a polyklonálních protilátek a také aptamerů vůči *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen (ESAT-6). Obě metody, ELISA i ELASA, je možné automatizovat [109, 110]. Jak je již uvedeno v kapitole 3, protilátky vyžadují stálou nižší teplotu než aptamery, od čehož se odvíjí i rozdíl v teplotách a trvanlivosti při použití metod ELISA a ELASA [35, 36]. Snadná regenerace aptamerů umožňuje opakované použití Metody ELASA oproti metodě ELISA. Wu et al. (2007) byli pomocí změny teploty schopni opakovaně regenerovat aptamery vázající adenosin. I po 40 opakováních si 90 % všech aptamerů stále zachovávalo svou původní konfiguraci [111]. Podobně i Minunni et al. (2004) prokázali účinnou regeneraci aptameru pomocí roztoků kyselin, zásad a solí a chelatačními

činnidly (např. EDTA) [112, 134]. Schlenso et al. (2004) taktéž ověřili, že regenerace je možné provést v jednom kroku, jednoduše změnou pH pomocí NaOH [113]. Snadná výroba a možnost opakovaného použití také ovlivňuje cenu metod, v nichž jsou aptamery použity [1].

Existují tři formáty provedení – sendvičový, přímý a nepřímý. V sendvičovém provedení, které má vyšší přesnost než zbylá dvě provedení, je jeden druh aptameru se specifickou afinitou přímo imobilizován na mikrodestičce (tj. capture aptamer). Druhý, detekční, aptamer, je značený enzymem. Po přidání analytu k destičce dojde k vytvoření vazby mezi cílem a oběma aptamery. Vzniká tedy sendvičová struktura, která může nabývat různých charakterů podle konkrétně použitých prvků soustavy. Následně se směs promyje, čímž se odstraní volné molekuly. Posledním krokem je přidání substrátu pro enzymatickou reakci za účelem vytvoření měřitelného signálu (např. změna barvy, fluorescence). Ten proporčně odpovídá koncentraci molekuly ve vzorku. Obdobně probíhá i přímá a nepřímá varianta. V nepřímém provedení, kdy se přidává enzymaticky značený reagent, dojde pouze k imobilizaci primárního aptameru s afinitou k cíli. V přímém se enzymaticky značený imobilizovaný aptamer přímo váže na cíl. Rozdíl je tedy ve způsobu vyvolání barevné změny. Nepřímá ELASA je z důvodu vzniku nečistot v jejím průběhu nejméně používaná [106]. Existuje i kompetitivní forma, jejíž výhodou je, že vzorek nemusí před analýzou projít purifikací. Je založena na přidání nepurifikovaného vzorku k předem očištěnému, imobilizovanému cíli. Se zvyšující se koncentrací cíle se tudíž signál zeslabuje [114]. Původně byla tato metoda pro stanovení tetracyklinů v medu [115], ale z pohledu medicíny s ní lze detegovat například dopamin, který je užíván jako marker Alzheimerovy choroby. V tomto případě však musí mít ELASA inverzní konfiguraci. Do aptameru, který specificky váže dopamin, je předem konjugován biotin. Komplexy těchto aptamerů a dopaminu jsou pak díky vazbě mezi biotinem a streptavidinem zachytávány na destičce, čímž dojde k jejich inhibici. Po promytí dojde k enzymatické detekci [116]. Kolorimetrická ELASA dokonce umožňuje okometrické vyhodnocení přítomnosti či nepřítomnosti vzniklých vazeb [117]. Další variantou může být například propojení obou metod do systému ELISA-ELASA [118]. ELASA však může sloužit k mnohem širší diagnostice, než je uvedeno výše v této podkapitole. Pomocí metody ELASA je možné identifikovat, např. toxiny [119; 120], drogy třeba v rámci dopingových testů [121, 122], 17 β -estradiol (E2) třeba v rámci gravidity [123], Alzheimerovu chorobu pomocí biomarkeru amyloid-beta [124].

Tabulka 2: Srovnání metod ELISA a ELASA. Převzato a upraveno dle [114].

	ELISA	ELASA
<i>Senzitivita</i>	srovnatelná s ELASA	srovnatelná s ELISA
<i>Automatizace</i>	ano	ano
<i>Požadovaná teplota</i>	4°C při použití protilátek	bez omezení (do 60°C)
<i>Trvanlivost</i>	krátká	delší
<i>Cena</i>	vyšší	nižší
<i>Opakovaná použitelnost</i>	ne	ano

5.1.5 Aptamerový multiplexní test

Tato diagnostická a analytická metoda umožňuje současnou detekci a kvantifikaci několika cílových molekul za použití kombinace aptamerů se specifickou afinitou k jednomu z cílů. S její pomocí je tedy možné analyzovat několik analytů v jednom kroku [125]. Každý aptamer je značen jinak (např. fluorofory, enzymy) [126], což umožňuje jejich izolovanou detekci a kvantifikaci například průtokovou cytometrií [127]. K detekci může být tedy použit i tzv. FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) fenomén. Je založen na vzniku fluorescence při přenosu energie mezi donorem fluoroforu a akceptorem fluoroforu, pokud jsou v dostatečné blízkosti. Některé aptamery (tzv. Light-Up) jsou schopné produkovat signál prostým omezením torzní rotace komplexu (otočení okolo osy) [128].

5.1.6 Aptamery v zobrazovací technice

Aptamery lze využít k vizualizaci cílů v rámci biologických systémů. Jak je již popsáno výše, může se jednat o přidání fluorescenční značky, aby bylo možné zachytit komplexy aptamerů a jejich cílů např. za použití fluorescenční mikroskopie [129]. V konjugaci s kontrastními látkami (např. nanočásticemi) je možné je využít v magnetické rezonanci (MRI), počítačové tomografii (CT) [130] nebo pozitronové emisní tomografii (PET) [131]. Umožňují tedy neinvazivní vizualizaci cílů v biologickém systému, tedy *in vivo* [130, 131].

5.1.7 Aptahistochemie

Imunohistochemie, metoda užívaná v onkologické diagnostice, která spoléhá na použití monoklonálních i polyklonálních protilátek [132]. Vzhledem k výše uvedeným výhodám aptamerů oproti protilátkám a také z důvodů nekonzistentní čistoty komerčních protilátek [133], mohou být tyto nahrazeny aptamery [135].

5.2 Aptamery v terapii

Zda budou v terapii upřednostněny aptamery před protilátkami, závisí na několika faktorech. Protilátky jsou na rozdíl od aptamerů získávány *in vivo*, a tudíž tento systém nelze použít tam, kde je toxicita cíle příliš vysoká, nebo dokonce letální. Aptamery mohou být využity k vytvoření pasivní imunity stejným způsobem jako imunoterapie s využitím sér nebo humanizované monoklonální protilátky, avšak jejich výroba je daleko levnější. Na rozdíl od diagnostických metod, malé rozměry aptamerů mohou v terapii působit problémy, jelikož molekuly menší než 50 kD bývají obvykle rychle vyloučeny ledvinami [38].

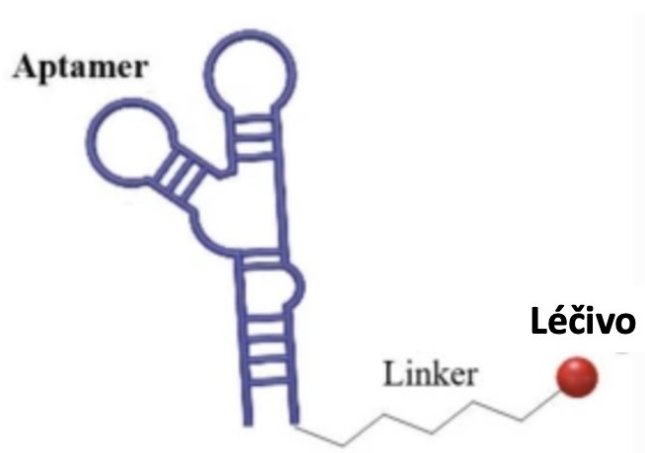
Pro terapeutické účely je možné využívat peptidové aptamery i ty na bázi nukleových kyselin [2, 136]. Dříve převládal názor, že RNA aptamery v terapii fungují účinněji, jelikož je jejich malá, specificky uspořádaná molekula schopná snáze proniknout buňkou, a tak dopravit léčivo na místo určení [137]. DNA aptamery však vykazují stejnou účinnost, a navíc i řadu výhod, jako například vynechání kroku transkripce, jednodušší způsob jejich přípravy [138] a vyšší stabilita díky přítomnosti deoxyribózy na pozici 2' místo ribózy [139], což z nich dělá časově i ekonomicky výhodnější variantu [136]. Použití aptamerů v terapii není bez rizik. Například syntetické nukleotidové sekvence mohou působit toxicky nebo vyvolávat nespecifické imunitní reakce [140].

Z důvodu omezeného rozsahu této práce byly do kapitoly vybrány jen základní poznatky z některých aplikačních oblastí. Některé cíle, pro něž je možné aptamery terapeuticky využít jsou shrnuty v tabulce 3 [137].

Tabulka 3: Některé cíle pro terapeutické využití aptamerů. Převzato a upraveno dle [137].

Význam	cíl
Inhibice onkogeneze	Platelet-derived growth factor
	$\alpha\beta$ integrin
	Tenascin C
	Gonadotropin-releasing hormone 1
	E2F transkripční faktor
	HER3 (ERBB3)
	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
	Cytohesin 2
	Ghrelin
	Receptor tyrosin kinázy RETC634Y
Léčba rakoviny slinivky Inhibice onkogeneze, virové regulace Prevence vzniku metastáz Inhibice onkogeneze, modulace zánětu Modulace zánětu	Substance P
	Mucin 1
	Epidermal growth factor receptor variant III
	Amylin
	Protein tyrosin fosfatáza
	Plasminogen activator inhibitor 1
	Lymphocyte function-associated antigen 1
	I-Selectin
	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (IP-10)
	Neutrophil elastase
Modulace zánětlivého procesu a imunitní odpověď Modulace imunitní odpovědi Léčba psoriázy Prevence alergií Léčba ARDS, septického šoku Prevence vzniku trombů	Interferon-γ
	CD4
	Chemokine (C-C motif) ligand 2 (MCP1)
	Immunoglobulin E
	Fosfolipáza A2
	α-thrombin
	Aktivovaný protein C
	Factor IXa
	Fibroblastický růstový faktor 2, základní
	Angiopoietin 1
Prevence angiogeneze	Angiopoietin 2
	Vascular endothelial growth factor
	Acetylcholine receptor
	Acetylcholin-specifické autoprotilátky
	Calcitonin gene-related peptide
	Nociceptin
	Respirační syncytiální virus
	Neurotensin 1
	HIV gp120
	HIV-1 reverse transcriptase
Inhibice infekčnosti viru Inhibice virové replikace	HIV-1 Rev
	HIV-1 integrase
	P-selectin
	NS3 protease
	<i>Staphylococcus enterotoxin B</i>
	Bovine prion protein
	U1A
	Inhibice virové adheze
	Léčba virové žloutenky typu C
	Léčba staphylokokových infekcí
Léčba prionových infekcí, Alzheimerovy choroby	
Modulace genové exprese	

5.2.1 Konjugáty aptamerů v cílené léčbě



Obrázek 11 Konjugát aptameru a léčiva.

Konjugáty aptamerů a léčiv (aptamer-drug conjugates (ApDCs)) jsou rozmanitou skupinou terapeutik s širokým spektrem použití, např. v oblasti genové terapie, fototerapie, chemoterapie, vývoje vakcín aj. [136]. Představují jakousi obdobu konjugátů protilátek a léčiv (antibody-drug conjugates (ADCs)), přičemž protilátka je nahrazena aptamerem. Ten zde funguje jako ligand spojený s léčivem prostřednictvím linkeru (viz obrázek 11) [141]. Při konjugaci se využívá různých strategií, např. fyzikální konjugace, kovalentní párování apod. [142]. V rámci konjugátů aptamerů a chemoterapeutik se díky aptameru může konjugát vázat na specifické struktury nádorové tkáně. Například u lidské lymfoblastické leukemie, či rakoviny tlustého střeva se na povrchu nádorové tkáně hojně objevuje protein tyrosin kináza 7 (PTK7), a tudíž je vybrán aptamer s touto specifitou. Takto lze působit na nádorové tkáně prostřednictvím chemoterapeutik (např. konjugovaný doxorubicin (Dox), Epirubicin, Daunorubicin aj.) [141]. Mezi aptamery s možností využití v konjugátech s léčivy při léčbě rakoviny patří například P19 (rakovina slinivky [143]), Sgc8c (lidská lymfoblastická leukemie [144], akutní myeloidní leukemie [145]), AS1411 (rakovina ledvin, akutní myeloidní leukémie [146]), A10 (karcinom prostaty) [147], HER2 RNA (rakovina prsu) [148]. Jako konjugované léčivo při infekcích multirezistentními bakteriemi mohou být použity např. nejrozličnější antimikrobiální peptidy (AMPs) společně s nanočásticemi [149, 150].

Konjugáty lze použít také v genové terapii různých onemocnění (např. HIV, onkologická onemocnění), a to kombinací aptameru a nukleové kyseliny [141]. Konjugáty se siRNA (small interfering RNA) umožňují blokovat expresi určitých genů (např. virového genomu při virových infekcích) [151], inhibovat angiogenezi při nádorových onemocněních, aktivovat imunitní buňky apod. [142]. Velký potenciál pro terapii a vývoj vakcín má spojení aptamerů

s proteiny nebo peptidy, které (s výjimkou protilátek) jinak nemají schopnost specifické vazby na cíl. Konjugáty aptamerů a fotosenzitivujících látek se uplatňují také ve fotodynamické terapii (PDT). Fotosenzitivující látky jsou schopné za určitých okolností iniciovat vznik cytotoxického reaktivního kyslíku (ROS) z kyslíku tkáňového. Konjugáty aptamerů a fototermálních činidel mohou být použity ve fototermální terapii (PTT). Určité materiály jsou po elektromagnetickém ozáření schopné emitovat teplo, a tak působit cytotoxicky. V tomto případě se aptamery spojují s nanočásticemi zlata, polyamidu, uhlíku aj. s navázanou účinnou látkou [141]. Aptamerová PTT účinně působí i na methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) [152]. Systémů, v nichž jsou konjugovány aptamery a nanočástice (NPs) je více a taktéž nacházejí široké uplatnění. Při použití nanočástic QDs (nanoscale semiconductor nanocrystals) je možné efektivně vázat nejen léčiva (např. Dox) nebo je použít ve zobrazovacích technikách. Nanočástice zlata (Au NPs / GNPs) lze krom fototermálních systémů využít i k přenosu léčiv nebo ve fotodynamické terapii. Podobně i uhlíkové nanočástice mohou být použity ve fototermálních systémech a jako nosiče léčiv. Lipozomy jsou díky své lipidové dvouvrstvé membráně schopny účinně enkapsulovat hydrofilní léčiva a zvýšit cirkulaci léčiva v cílové tkáni a mohou být využity i ve fluorescenčních zobrazovacích technikách [142].

5.2.2 Využití aptamerů v onkoterapii

Aptamery se v onkoterapii používají se buď jako antagonisté, kteří blokují interakce specifických onkologických cílů, nebo jako agonisté s opačným účinkem. Aptamery je možné využít jako inhibitory checkpointů [136]. Tyto checkpointy jsou specifické molekuly, které imunitního systému, které iniciují a udržují jeho odpověď – v tomto případě tedy blokují nadměrnou odezvu organismu na nádorové bujení. Nádorové buňky mohou navíc samy způsobovat destrukci těchto molekul. Z tohoto důvodu je výhodné použití inhibitorů checkpointů, a tak zintenzivnit imunitní odpověď. Příkladem těchto checkpointů může být například protein programované smrti 1 (programmed death protein 1 (PD-1)) vznikající v T-lymfocytech a jeho ligand (DP-L1) na povrchu nádorové tkáně [153] nebo cytotoxický T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4), což byl také historicky první checkpoint, k němuž byl vytvořen RNA aptamerový inhibitor. Tehdy však použité aptamery vykazovaly nižší efektivitu *in vivo* než protilátky. Bylo sice možné ji zvýšit úpravou aptamerů, respektive jejich použití s oligonukleotidovým skeletem, ale přesto byla tato metoda stále značně neefektivní pro klinickou praxi [154]. Imunitní odpověď lze však stimulovat mnohými dalšími způsoby za použití aptamerů. Například T buňky, které hrají zásadní roli v rozpoznání

a likvidaci nádorových buněk, potřebují ke své aktivaci celou škálu signálů. Primárním signálem je vytvořen histokompatibilní komplex I (MHC-I), tedy navázání antigen prezentujících molekul na TCR receptor T buněk. Sekundární signály zahrnují reakce mezi stimulačními molekulami CD80 a CD86, které jsou na povrchu antigen prezentujících molekul a CD28 na povrchu T buněk. V prostředí nádorové tkáně však často zcela chybí ligandy CD80 a CD86, čímž jsou T buňky inhibovány. V tomto případě se tedy využijí aptamery specifické k vazebnému místu CD28 T buněk k jejich stimulaci [136] Některé peptidové aptamery jsou schopny vázat se na cyklin-dependentní kinázy (CDKs), která se uplatňuje při proliferaci nádorových buněk [2].

V rámci terapie je možné aptamery využít také jako blokátory cytokinů. Cytokiny (existuje několik kategorií včetně interleukinů) jsou malé signální molekuly, které také hrají klíčovou roli v regulaci imunitní odpovědi. Fungují jako messengery zprostředkovávající komunikaci mezi imunitním systémem a různými typy buněk. Cytokiny mohou podporovat proliferaci nádorových buněk, angiogenezi (tím přivodí živin k nádorové tkáni) a imunosupresi [155]. Aptamer R5A1 se specificky váže na interleukin IL-10R. Ten se za normálních okolností váže na odpovídající místo v nádorové tkáni a spouští její růst, avšak spojením s aptamerem se stává neaktivním a signál nemůže dále přenášet [136].

Při nádorovém bujení dochází k nadměrné expresi nukleolinu (jadérový protein), který se pak nachází u některých typů rakoviny na povrchu nádorových buněk. Aptamer AS1411 je schopen se na tento protein vázat, a tím regulovat procesy, do nichž se zapojuje. Nukleolin tak nemůže interagovat s proteiny a nukleovými kyselinami, díky čemuž se brzdí angiogeneze v místě tumoru, proliferace nádorových buněk a spouští se programovaná buněčná smrt [136].

5.2.3 Využití aptamerů v terapii kardiovaskulárních onemocnění

Aptamery mají potenciál i v léčbě některých kardiovaskulárních chorob, například akutní koronárního syndromu (ACS) [156]. Terapie spočívá zejména v ovlivňování procesu koagulace. Aptamer ARC1172 a jeho modifikace blokují vazbou na von Willebrandův faktor (vWF) jeho interakci s krevními destičkami, a tak snižuje i riziko vzniku trombů v srdečních a mozkových tepnách, což je jedna z nejčastějších kardiovaskulárních komplikací [157]. Vznik trombů lze ovlivnit i jinou cestou pomocí aptamerů přímo se vážících na trombin (např. thrombin-binding aptamer (TBA)) [158]. PCSK9 aptamery přináší možnost účinné

terapie hypercholesterolemie [159]. V konjugátech mohou také sloužit k dopravování účinných látek [160].

5.2.4 Využití aptamerů v terapii infekčních chorob

Důvodem k hledání alternativní léčby v podobě aptamerů jsou nežádoucí účinky antivirotik [161] a rychlé zastarávání vakcín z důvodů mutací virů [162]. Aptamery mohou bránit k přichycení viru na hostitelskou buňku, například přes navázání aptameru AS1411 na nukleolin přítomný na jejím povrchu. Vazba viru s tímto proteinem totiž mnohým virům umožňuje jejich průnik buňkou (např. dengue) [163]. Aptamer HA12-16 blokuje vstupní glykoprotein HA proti navázání viru chřipky [164] apod. Aptamery mohou také inhibovat replikaci virů svou vazbou na specifické enzymy nebo substráty, které do replikace vstupují [165, 166].

V terapii mikrobiálních infekcí se taktéž uplatňuje vícero přístupů s použitím aptamerů. Jedním z velkých problémů jsou biofilmy, kterými se mikrobiální kolonie přichycují k povrchu, a které nelze účinně odstranit použitím antibiotik. Aptamery zacílené na konkrétní bakterie brání jejich shlukování tím, že zvyšují elektrostatický odpor mezi buňkami a povrchy. Navíc jsou tyto bakterie více citlivé na působení antibiotik [167]. Příkladem mohou být aptamery Lyd-1, Lyd-2 a Lyd-3 zaměřené na *Streptococcus pneumoniae* [168]. Další cestou je inhibice uvolňování bakteriálních toxinů, které slouží k narušování hostitelských buněk a umožňují perzistenci a šíření infekce. Například aptamery AT-27 nebo AT-33 účinně brání lýze buněk účinkem alfa-toxinu, který produkuje *Staphylococcus aureus* [169, 170]. V terapii se uplatňují také nejrůznější konjugáty aptamerů s léčivými (viz výše).

Parazitózy představují další oblast, v níž by se aptamery mohly uplatnit. Možné mechanismy zahrnují blokaci interakce mezi parazitem a hostitelskou buňkou blokací vazby mezi receptorem a ligandem (např. blokace adhezních receptorů *Trypanosoma cruzi*) [171] nebo inhibicí nejrůznějších klíčových funkčních proteinů [172, 173].

5.2.5 Využití aptamerů v terapii autoimunitních onemocnění

Aptamery je možné použít v terapii autoimunitních onemocnění. Diabetes mellitus prvního typu způsobuje inzulinovou deficienci následkem napadení beta-buněk pankreatických ostrůvků imunitním systémem. U těchto pacientů hrozí nejen hypoglykemie, ale při dysbalanci systému inzulin-glukagon také hyperglykemie. Aptamery se tedy mohou uplatnit jako inhibitory glukagonu snižující riziko vzniku hyperglykemie (např. aptamer NOX-G15) [174].

Aptamery mohou pomoci i pacientům trpícím diabetem druhého typu. U nich vzniká inzulinová rezistence následkem nadbytku protilátek proti lidskému inzulinovému receptoru. Aptamer MA20 je schopen přímé interakce s autoprotiátkami těchto pacientů za snížení jejich účinnosti [175]. Aptamery lze řešit i diabetickou nefropatií (např. duální zrcadlový CCL2-CXCL12) [176]. Dalším autoimunitním onemocněním, kde se aptamery mohou uplatnit je roztroušená skleróza (MS), a to například aptamerovou neutralizací růstového faktoru MK [176, 177]. V terapii revmatoidní artritidy může pomoci aptamer ADR58, který se váže na OSM (Oncostatin M), a tím narušuje jeho působení v patologickém procesu tohoto onemocnění [178]. Byla provedena i řada experimentů s aptamery, které cílily na další autoimunitní onemocnění, např. myasthenia gravis (MA) [179] nebo systémový lupus erythematosus (SLE) [180].

5.2.6 Využití aptamerů v terapii neurodegenerativních onemocnění

Různé druhy aptamerů lze použít např. v terapii Alzheimerovy choroby, a to například snížením produkce A β , jehož aglutinace onemocnění způsobuje. Aptamer A1 se specificky váže na enzym (BACE1), který do produkce A β vstupuje [181]. Terapie Parkinsonovy choroby může využít např. aptamer M5-15 nebo ASYN (1-5), které brání hromadění presynaptického proteinu α -Syn v mozku [182, 183]. Vědci se zabývali i využitím aptamerů v terapii transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE) (např. SAF-93) [184] a Huntingtonovy choroby (např. MS3) [185].

6 Některé komerčně dostupné aptamery

O aptamery roste zájem nejen ve sféře experimentální, ale i aplikační [186]. Na trhu zaměřeném na výzkum a vývoj existují firmy, které zákazníkovi na základě poptávky vyberou jím požadovaný aptamer z knihovny a popřípadě jej i podle potřeb upraví, např. společnosti CD Bioparticles Drug Delivery nebo Creative Biolabs, kde je možné procházet i databázi dostupných aptamerů.

K diagnostickým účelům jsou komerčně dostupné například preparáty uvedené v tabulce 4. Každý komerční nabízený diagnostický kit musí projít sérií klinických testování [186].

Tabulka 4: Některé komerčně dostupné aptamery pro diagnostiku. Převzato a upraveno dle [187].

Aptamer	Aplikace	Metoda	Společnost
<i>OTA-Sense</i>	ochratoxin A	fluorescenční metody	NeoVentures Biotechnology
<i>AflaSense</i>	aflatoxiny	fluorescenční	NeoVentures Biotechnology
<i>AptoCyto</i>	škála biomarkerů*	průtoková cytometrie	Aptamer Science Inc.
<i>AptoPrep</i>	škála biomarkerů*	fluorescenční metody, polyakrylová gelová elektroforéza (PAGE)	Aptamer Science Inc.
<i>SOMAscan</i>	detekce bronchogenního karcinomu (SCLC)	SOMAmerová detekce a kvantifikace biomarkerů	SomaLogic
<i>CibusDx</i>	alimentární patogeny	elektrochemická	CibusDx
<i>OLIGOBIND</i>	aktivita trombinu	fluorogenic activity assay	Sekisui Diagnostics
<i>Hot Start Taq DNA polymeráza</i>	<i>Hot start PCR</i>	<i>reverzní inhibice Taq DNA polymerázy</i>	New England Biolabs

*Biomarkery: receptor hepaticárního růstového faktoru (HGFR), molekula intracelulárního adhesinu (ICAM-2), receptor epiteliálního růstového faktoru (EGFR), adhezivní molekula endoteliálních buněk krevních destiček (CD-31), receptor lidského epidermálního růstového faktoru (HER-2) a receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR-2)

Macugen byl prvním aptamerovým léčivem, který byl schválen FDA (Food and Drug Administration / Úřad pro kontrolu potravin a léčiv – vládní agentura Spojených Států Amerických) [188]. Jedním z onkologických aptamerů je NOX-A12. Jedná se o zrcadlový RNA aptamer, tedy o L-RNA oligonukleotid neboli zrcadlový obraz přirozeně se vyskytující molekuly D-RNA (Spiegelmer). Je vyvinutý biotechnologickou společností Noxxon Pharma v Berlíně. Aptamer NOX-A12 je antagonist CXCL12 (chemokinový ligand), který se váže na chemokin a narušuje navádění a akumulaci buněk CLL (chronická lymfocytární leukémie) v kostní dřeni, čímž tyto buňky senzibilizuje na cytotoxická léčiva [189, 190]. Účinek dalšího aptameru s komerčním využitím, A1411, je již popsán výše. Příklady aptamerů schválených k terapii či v různém stádiu klinického testování jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Příklady aptamerů schválených k terapii či v různém stádiu klinického testování. Převzato a upraveno dle [187].

Název	Cílové onemocnění
<i>Pegaptanib sodium (Macugen)</i>	Věkem podmíněná makulární degenerace (VPMD)
<i>E10030</i>	Věkem podmíněná makulární degenerace (VPMD)
<i>REG1 (RB006 and RB007)</i>	Onemocnění koronárních tepen
<i>ARC1905</i>	Věkem podmíněná makulární degenerace (VPMD)
<i>AS1411</i>	Henoch-Schönleinova purpura
<i>ARC1779</i>	von Willebrandova choroba / trombocytopenie /
<i>NOX-E36</i>	Chronická zánětlivá onemocnění / diabetu mellitus II. typu / lupus erythematus
<i>NOX-A12</i>	Mnohočetný myelom / non-Hodgkinův lymfom / transplantace kmenových buněk
<i>NUI72</i>	Srdeční choroby
<i>NOX-H94</i>	Anémie / konečné stádium onemocnění ledvin / zánět
<i>ARC19499</i>	Hemofilie

7 Závěr

I když si protilátky stále drží dominantní a nezastupitelnou pozici mezi afinitními molekulami, aptamery se ukazují jako slibný nástroj v oblasti biomedicíny a nejen zde. Z jejich srovnání s protilátkami vyplývá, že aptamery skýtají značné výhody, ať už svou snadnou, rychlou, a v mnoha ohledech etičtější, přípravou či vysokou specifitou a afinitou k cíli. Na rozdíl od protilátek, které, až na výjimky, vyžadují využití laboratorních zvířat, aptamery se selektují na základě své specifity a afinity k danému cíli z velkých sekvenčních knihoven. To přináší do oblastí získávání afinitních molekul další výhodu – nižší produkční náklady. Zatímco někteří autoři se přiklání k hypotéze, že aptamery jednou zcela nahradí protilátky, jiní nabádají k obezřetnosti a poukazují na to, že i aptamery mají své nevýhody a svá rizika.

Vývoj aptamerů postupuje dopředu už přibližně tři desítky let. Za tu dobu našly aptamery mnoho způsobů uplatnění – některých oblastech zatím jen experimentálně, jiné přešly do praxe. Na poli biomedicíny jsou aptamery klíčové v řadě diagnostických metod, včetně těch zobrazovacích, umožňují objevování nových biomarkerů a léčiv, detekci toxinů, a dokonce i gravidity. V rámci prevence se mohou využít například k ekonomicky efektivní výrobě účinných vakcín a v terapii samotné nabízejí již schválená aptamerová léčiva úlevu například pacientům s věkově vázanou makulární degenerací. Další léčiva budou jistě v brzké době pronikat na trh, stejně jako nově objevené možnosti využití aptamerů v klinické praxi.

8 Použitá literatura

1. KHATI, M. The future of aptamers in medicine. *Journal of Clinical Pathology*. 2010, **63**(6), 480-487. ISSN 0021-9746. Dostupné z: doi:10.1136/jcp.2008.062786
2. LI, J., S. TAN, X. CHEN, C.-Y. ZHANG a Y. ZHANG. Peptide Aptamers with Biological and Therapeutic Applications. *Current Medicinal Chemistry*. 2011, **2011**(18), 4215–4222.
3. TANS, R., VAN RIJSWIJCK, D. M. H. DAVIDSON, A. et al. Affimers as an alternative to antibodies for protein biomarker enrichment. *Protein Expression and Purification*. 2020, **174**. Dostupné z: doi:10.1016/j.pep.2020.105677
4. WINAU, Florian a Rolf WINAU. Emil von Behring and serum therapy. *Microbes and Infection*. 2002, **4**(2), 185-188 Dostupné z: doi:10.1016/S1286-4579(01)01526-X
5. LINDENMANN, JEAN. Origin of the terms 'antibody' and 'antigen'. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1984, **19**(4), 281-285. ISSN 0300-9475. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-3083.1984.tb00931.x
6. HAURUM, John S. Recombinant polyclonal antibodies: the next generation of antibody therapeutics?. *Drug Discovery Today*. 2006, **11**(13-14), 655-660. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2006.05.009
7. DOLLINS, Claudia M., Smita NAIR a Bruce A. SULLENGER. Aptamers in Immunotherapy. *Human Gene Therapy*. 2008, **19**(5), 443-450. Dostupné z: doi:10.1089/hum.2008.045
8. BORGHOUTS, Corina, Christian KUNZ a Bernd GRONER. Peptide Aptamer Libraries. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2008, **11**(2), 135-145.
9. REVERDATTO, Sergey, David BURZ a Alexander SHEKHTMAN. Peptide Aptamers: Development and Applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2015, **15**(12), 1082-1101. Dostupné z: doi:10.2174/1568026615666150413153143
10. MASCINI, Marco, Ilaria PALCHETTI a Sara TOMBELLI. Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Fundamentals and Bioanalytical Aspects. *Angewandte Chemie International Edition*. 2012, **51**(6), 1316-1332. Dostupné z: doi:10.1002/anie.20100663
11. WILSON, David S., Anthony D. KEEFE a Jack W. SZOSTAK. The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001, **98**(7), 3750-3755. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.061028198
12. NEW, Roger R. C., Tam T. T. BUI a Michal BOGUS. Binding Interactions of Peptide Aptamers. *Molecules*. 2020, **25**(24). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25246055
13. COLOMBO, Monica, Chiara MIZZOTTI, Simona MASIERO, Martin M. KATER a Paolo PESARESI. Peptide aptamers: The versatile role of specific protein function inhibitors in plant biotechnology. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2015, **57**(11), 892-901. Dostupné z: doi:10.1111/jipb.12368
14. ȘTEFAN, Geanina, Oana HOSU, Karolien DE WAEL, María Jesús LOBO-CASTAÑÓN a Cecilia CRISTEA. Aptamers in biomedicine: Selection strategies and

- recent advances. *Electrochimica Acta*. 2021, **376**. Dostupné z: doi:10.1016/j.electacta.2021.137994
15. BYUN, Jonghoe. Recent Progress and Opportunities for Nucleic Acid Aptamers. *Life*. 2021, **11**(3), 193. Dostupné z: doi:10.3390/life11030193
 16. BATEY, RT, RP RAMBO a JA DOUDNA. Tertiary Motifs in RNA Structure and Folding. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1999, **38**(16), 2326-2343. PMID: 10458781. Dostupné z: doi:10.1002/(sici)1521-3773(19990816)38:16<2326::aid-anie2326>3.0.co;2-3
 17. ERIKSSON, Emma S. E., Lokesh JOSHI, Martin BILLETER a Leif A. ERIKSSON. De novo tertiary structure prediction using RNA123—benchmarking and application to Macugen. *Journal of Molecular Modeling*. 2014, **20**(8). Dostupné z: doi:10.1007/s00894-014-2389-z
 18. HERMANN, Thomas a Dinshaw J. PATEL. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science*. 2000, **287**(5454), 820-825. Dostupné z: doi:10.1126/science.287.5454.820
 19. FISCHER, Michael J. M., Jakob SCHMIDT, Stanislav KOULCHITSKY, Sven KLUSSMANN, Axel VATER a Karl MESSLINGER. Effect of a calcitonin gene-related peptide-binding L-RNA aptamer on neuronal activity in the rat spinal trigeminal nucleus. *The Journal of Headache and Pain*. 2018, **19**(1). PMCID: PMC5768576, PMID: 29335794. Dostupné z: doi:10.1186/s10194-018-0832-8
 20. CHO, Seong-Je, Hye-Min WOO, Ki-Sun KIM, Jong-Won OH a Yong-Joo JEONG. Novel system for detecting SARS coronavirus nucleocapsid protein using an ssDNA aptamer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2011, **112**(6), 535-540. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiosc.2011.08.014
 21. BRUNO, John G., Maria P. CARRILLO, Taylor PHILLIPS, Neal K. VAIL a Douglas HANSON. Competitive FRET-Aptamer-Based Detection of Methylphosphonic Acid, a Common Nerve Agent Metabolite. *Journal of Fluorescence*. 2008, **18**(5), 867-876. Dostupné z: doi:10.1007/s10895-008-0316-3
 22. MANN, Doerthe, Christine REINEMANN, Regina STOLTENBURG a Beate STREHLITZ. In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005, **338**(4), 1928-1934. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2005.10.172
 23. SUN, Wei, Lupei DU a Minyong LI. Aptamer-Based Carbohydrate Recognition. *Current Pharmaceutical Design*. 2010, **16**(20), 2269-2278. Dostupné z: doi:10.2174/138161210791792877
 24. EMAHI, Ismaila, Paige R. GRUENKE a Dana A. BAUM. Effect of Aptamer Binding on the Electron-Transfer Properties of Redox Cofactors. *Journal of Molecular Evolution*. 2015, **81**(5-6), 186-193. Dostupné z: doi:10.1007/s00239-015-9707-7
 25. MA, Li-Hong, Hai-Bo WANG, Bi-Yun FANG, Fang TAN, Yuan-Cheng CAO a Yuan-Di ZHAO. Visual detection of trace lead ion based on aptamer and silver staining nano-metal composite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018, **162**, 415-419. PMID: 29247914. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2017.12.011
 26. FROHNMEYER, Esther, Nadine TUSCHEL, Tobias SITZ, Cornelia HERMANN, Gregor T. DAHL, Florian SCHULZ, Antje J. BAEUMNER a Markus FISCHER. Aptamer lateral flow assays for rapid and sensitive detection of cholera toxin. *The Analyst*. 2019, **144**(5), 1840-1849. Dostupné z: doi:10.1039/C8AN01616J

27. LONDON, Grace M., Bongani M. MAYOSI a Makobetsa KHATI. Isolation and characterization of 2'-F-RNA aptamers against whole HIV-1 subtype C envelope pseudovirus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015, **456**(1), 428-433. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2014.11.101
28. XU, Yueshuang, Huan WANG, Chengxin LUAN, Yuxiao LIU, Baoan CHEN a Yuanjin ZHAO. Aptamer-based hydrogel barcodes for the capture and detection of multiple types of pathogenic bacteria. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2018, **100**, 404-410. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2017.09.032
29. TANG, X.-L., Y. HUA, Q. GUAN a C.-H. YUAN. Improved detection of deeply invasive candidiasis with DNA aptamers specific binding to (1→3)-β-D-glucans from *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016, **35**(4), 587-595. Dostupné z: doi:10.1007/s10096-015-2574-8
30. ZAMAY, Anna S., Galina S. ZAMAY, Olga S. KOLOVSKAYA, Tatiana N. ZAMAY a Maxim V. BEREZOVSKI. Aptamer-Based Methods for Detection of Circulating Tumor Cells and Their Potential for Personalized Diagnostics. *Isolation and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells*. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2017-05-31, (994), 67-81. Advances in Experimental Medicine and Biology. ISBN 978-3-319-55946-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-55947-6_3
31. ALI, Mohamed H., Marwa E. ELSHERBINY a Marwan EMARA. Updates on Aptamer Research. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, **20**(10). Dostupné z: doi:10.3390/ijms20102511
32. CHEN, Ailiang a Shuming YANG. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015, **71**, 230-242. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2015.04.041
33. HALIM, Liem Andhyk, Vera BRINKS, Wim JISKOOT, Stefan ROMEIJN, Rob HASELBERG, Chris BURNS, Meenu WADHWA a Huub SCHELLEKENS. Quality and Batch-to-Batch Consistency of Original and Biosimilar Epoetin Products. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016, **105**(2), 542-550. Dostupné z: doi:10.1016/j.xphs.2015.10.019
34. NALLET, Sophie, Luca FORNELLI, Simone SCHMITT, Julien PARRA, Lucia BALDI, Yury O. TSYBIN a Florian M. WURM. Glycan variability on a recombinant IgG antibody transiently produced in HEK-293E cells. *New Biotechnology*. 2012, **29**(4), 471-476. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2012.02.003
35. DING, Fei, Yangguang GAO a Xianran HE. *Recent progresses in biomedical applications of aptamer-functionalized systems*. 2017, **27**(18), 4256-4269. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2017.03.032
36. ANGELL, Chava, Mingxuan KAI, Sibai XIE, Xiangyi DONG a Yi CHEN. Bioderived DNA Nanomachines for Potential Uses in Biosensing, Diagnostics, and Therapeutic Applications. *Advanced Healthcare Materials*. 2018, **7**(8). Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201701189
37. MAIRAL, Teresa, Veli CENGİZ ÖZALP, Pablo LOZANO SÁNCHEZ, Mònica MIR, Ioanis KATAKIS a Ciara K. O'SULLIVAN. Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008, **390**(4), 989-1007. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-007-1346-4

38. BRUNO, John G. Applications in Which Aptamers Are Needed or Wanted in Diagnostics and Therapeutics. *Pharmaceuticals*. 2022, **15**(6), 1-10. Dostupné z: doi:10.3390/ph15060693
39. IRESON, Christopher R. a Lloyd R. KELLAND. Discovery and development of anticancer aptamers. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006, **5**(12), 2957-2962. Dostupné z: doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0172
40. YANG, Luyan, Tian GAO, Wenjing LI, Yu LUO, Salim ULLAH, Xiaona FANG, Yanwei CAO a Renjun PEI. Ni-Nitrilotriacetic Acid Affinity SELEX Method for Selection of DNA Aptamers Specific to the N-Cadherin Protein. *ACS Combinatorial Science*. 2020, **22**(12), 867-872. Dostupné z: doi:10.1021/acscmbosci.0c00165
41. NOVÁK, Josef. *Kvasinky jako model pro studium savčích onkogenních transkripčních faktorů*. Praha, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Blanka Zámostná, Martin Pospíšek
42. MARVIN, DA. Filamentous phage structure, infection and assembly. *Current Opinion in Structural Biology*. 1998, **8**(2), 150-158. Dostupné z: doi:10.1016/S0959-440X(98)80032-8
43. SMITH, George P. Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science*. 1985, **228**(4705), 1315-1317. Dostupné z: doi:10.1126/science.4001944
44. SIDHU, Sachdev S. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 2000, **11**(6), 610-616. Dostupné z: doi:10.1016/S0958-1669(00)00152-X
45. GEORGIU, George, Christos STATHOPOULOS, Patrick S. DAUGHERTY, Amiya R. NAYAK, Brent L. IVERSON a Roy Curtiss III. Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: From the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nature Biotechnology*. 1997, **15**(1), 29-34. Dostupné z: doi:10.1038/nbt0197-29
46. MÄKELÄ, Anna R., Wolfgang ERNST, Reingard GRABHERR a Christian OKER-BLOM. Baculovirus-Based Display and Gene Delivery Systems: Figure 1. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2010, **2010**(3). Dostupné z: doi:10.1101/pdb.top72
47. REN, Z.J., L.W. BLACK, G.K. LEWIS, P.T. WINGFIELD, E.G. LOCKE a A.C. STEVEN. *Protein Science*. 1996, **5**(9). Dostupné z: doi:10.1002/pro.5560050909
48. HANES, Jozef a Andreas PLÜCKTHUN. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997, **94**(10), 4937-4942. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.94.10.4937
49. CHO, Glen, Anthony D KEEFE, Rihe LIU, David S WILSON a Jack W SZOSTAK. Constructing high complexity synthetic libraries of long ORFs using In Vitro selection. *Journal of Molecular Biology*. 2000, **297**(2), 309-319. Dostupné z: doi:10.1006/jmbi.2000.3571
50. MURRAY, Christopher J a Ramesh BALIGA. Cell-free translation of peptides and proteins: from high throughput screening to clinical production. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2013, **17**(3), 420-426. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2013.02.014
51. MATTHEAKIS, L C, R R BHATT a W J DOWER. An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994, **91**(19), 9022-9026. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.91.19.9022

52. KANAMORI, Takashi, Yasuhiro FUJINO a Takuya UEDA. PURE ribosome display and its application in antibody technology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2014, **1844**(11), 1925-1932. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbapap.2014.04.007
53. BERTSCHINGER, J. a D. NERI. Covalent DNA display as a novel tool for directed evolution of proteins in vitro. *Protein Engineering Design and Selection*. 2004, **17**(9), 699-707. Dostupné z: doi:10.1093/protein/gzh082
54. UENO, Shingo a Naoto NEMOTO. CDNA Display: Rapid Stabilization of mRNA Display. *Ribosome Display and Related Technologies*. New York, NY: Springer New York, 2012, 2012-10-20, 113-135. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-61779-378-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-379-0_8
55. TAWFIK, Dan S. a Andrew D. GRIFFITHS. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nature Biotechnology* [online]. 1998, **16**(7), 652-656 [cit. 2023-06-24]. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt0798-652
56. KALTENBACH, Miriam a Florian HOLLFELDER. SNAP Display: In Vitro Protein Evolution in Microdroplets. *Ribosome Display and Related Technologies* [online]. New York, NY: Springer New York, 2012, 2012-10-20, 101-111 [cit. 2023-06-24]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-61779-378-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-379-0_7
57. GAN, Rui, Yumiko YAMANAKA, Takaaki KOJIMA a Hideo NAKANO. Microbeads display of proteins using emulsion PCR and cell-free protein synthesis. *Biotechnology Progress* [online]. 2008, **24**(5), 1107-1114 [cit. 2023-06-24]. ISSN 87567938. Dostupné z: doi:10.1002/btpr.43
58. MOCHIZUKI, Yuki a Naoto NEMOTO. Evolution of Disulfide-Rich Peptide Aptamers Using cDNA Display. *Ribosome Display and Related Technologies*. New York, NY: Springer New York, 2012, 2012-10-20, 237-250. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-61779-378-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-379-0_13
59. KINGHORN, Andrew, Lewis FRASER, Shaolin LIANG, Simon SHIU a Julian TANNER. Aptamer Bioinformatics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, **18**(12). Dostupné z: doi:10.3390/ijms18122516
60. JAMES, William. Aptamers in the virologists' toolkit. *Journal of General Virology*. 2007, **88**(2), 351-364. Dostupné z: doi:10.1099/vir.0.82442-0
61. PIEKEN, Wolfgang A., David B. OLSEN, Fritz BENSELER, Helle AURUP a Fritz ECKSTEIN. Kinetic Characterization of Ribonuclease-Resistant 2'-Modified Hammerhead Ribozymes. *Science*. 1991, **253**(5017), 314-317. Dostupné z: doi:10.1126/science.1857967
62. MARSHALL, Kristin A a Andrew D ELLINGTON. [14] In vitro selection of RNA aptamers. *RNA-Ligand Interactions Part B*. Elsevier, 2000, 2000, 193-214. Methods in Enzymology. ISBN 9780121822194. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(00)18053-X
63. JACOBSON, Ann B. a Michael ZUKER. Structural Analysis by Energy Dot Plot of a Large mRNA. *Journal of Molecular Biology*. 1993, **233**(2), 261-269. Dostupné z: doi:10.1006/jmbi.1993.1504
64. 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. 2023-06-27]. ISSN 13890344. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioeng.2007.06.001

65. STREHLITZ, Beate, Christine REINEMANN, Soeren LINKORN a Regina STOLTENBURG. Aptamers for pharmaceuticals and their application in environmental analytics. *Bioanalytical Reviews*. 2012, **4**(1), 1-30. Dostupné z: doi:10.1007/s12566-011-0026-1
66. SEFAH, Kwame, Dihua SHANGGUAN, Xiangling XIONG, Meghan B O'DONOGHUE a Weihong TAN. Development of DNA aptamers using Cell-SELEX. *Nature Protocols*. 2010, **5**(6), 1169-1185. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2010.66
67. DUA, Pooja, Soyoun KIM a Dong-ki LEE. Nucleic acid aptamers targeting cell-surface proteins. *Methods*. 2011, **54**(2), 215-225. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2011.02.002
68. CHEN, Man, Yuanyuan YU, Feng JIANG, et al. Development of Cell-SELEX Technology and Its Application in Cancer Diagnosis and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, **17**(12). Dostupné z: doi:10.3390/ijms17122079
69. MI, Jing, Yingmiao LIU, Zahid N RABBANI, Zhongguang YANG, Johannes H URBAN, Bruce A SULLENGER a Bryan M CLARY. In vivo selection of tumor-targeting RNA motifs. *Nature Chemical Biology*. 2010, **6**(1), 22-24. Dostupné z: doi:10.1038/nchembio.277
70. LI, Lie, Jun WAN, Xiaohong WEN, Qiuping GUO, Huishan JIANG, Jie WANG, Yazhou REN a Kemin WANG. Identification of a New DNA Aptamer by Tissue-SELEX for Cancer Recognition and Imaging. *Analytical Chemistry*. 2021, **93**(19), 7369-7377. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.1c01445
71. SOLA, Mayte, Ashwathi Puravankara MENON, Beatriz MORENO, Daniel MERA VIGLIA-CRIVELLI, Mario Martínez SOLDEVILLA, Fernando CARTÓN-GARCÍA a Fernando PASTOR. Aptamers Against Live Targets: Is In Vivo SELEX Finally Coming to the Edge?. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2020, **21**, 192-204. Dostupné z: doi:10.1016/j.omtn.2020.05.025
72. WANG, Chenglong, Guang YANG, Zhaofeng LUO a Hongmei DING. *In vitro* selection of high-affinity DNA aptamers for streptavidin. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* [online]. 2009, **41**(4), 335-340 [cit. 2023-06-27]. ISSN 1672-9145. Dostupné z: doi:10.1093/abbs/gmp022
73. DUAN, Nuo, Wenhui GONG, Shijia WU a Zhouping WANG. An ssDNA library immobilized SELEX technique for selection of an aptamer against ractopamine. *Analytica Chimica Acta*. 2017, **961**, 100-105. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2017.01.008
74. OZER, Abdullah, John M PAGANO a John T LIS. New Technologies Provide Quantum Changes in the Scale, Speed, and Success of SELEX Methods and Aptamer Characterization. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2014, **3**. Dostupné z: doi:10.1038/mtna.2014.34
75. MASCINI, Marco. Aptamers and their applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2008, **390**(4), 987-988 [cit. 2023-06-27]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-007-1769-y
76. STREHLITZ, Beate, Nadia NIKOLAUS a Regina STOLTENBURG. Protein Detection with Aptamer Biosensors. *Sensors*. 2008, **8**(7), 4296-4307. Dostupné z: doi:10.3390/s8074296

77. ZHOU, Wenhui, Po-Jung JIMMY HUANG, Jinsong DING a Juewen LIU. Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics. *The Analyst*. 2014, **139**(11), 2627-2640. Dostupné z: doi:10.1039/c4an00132j
78. VELASCO-GARCIA M., Missailidis S. New trends in aptamer-based electrochemical biosensors. *Gene Therapy and Molecular Biology*. 2009, **13**(1): 1-10
79. BALDRICH, Eva, Josep Lluís ACERO, Gunter REEKMANS, Wim LAUREYN a Ciara K. O'SULLIVAN. Displacement Enzyme Linked Aptamer Assay. *Analytical Chemistry*. 2005, **77**(15), 4774-4784. Dostupné z: doi:10.1021/ac0502450
80. ZHAO, Shuang, Weiwei YANG a Rebecca Y. LAI. A folding-based electrochemical aptasensor for detection of vascular endothelial growth factor in human whole blood. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011, **26**(5), 2442-2447. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2010.10.029
81. YAMAMOTO, Rika a Penmetcha K. R. KUMAR. Molecular beacon aptamer fluoresces in the presence of Tat protein of HIV-1. *Genes to Cells*. 2000, **5**(5), 389-396. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2443.2000.00331.x
82. YOUSEFI, Shila a Mohammad SARAJI. Optical aptasensor based on silver nanoparticles for the colorimetric detection of adenosine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2019, **213**, 1-5. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2019.01.036
83. MCCAULEY, Thomas G, Nobuko HAMAGUCHI a Martin STANTON. Aptamer-based biosensor arrays for detection and quantification of biological macromolecules. *Analytical Biochemistry*. 2003, **319**(2), 244-250. Dostupné z: doi:10.1016/S0003-2697(03)00297-5
84. AHN, Ji-Young, Sang Wook LEE, Hye Suk KANG, Minjoung JO, Dong-ki LEE, Thomas LAURELL a Soyoun KIM. Aptamer Microarray Mediated Capture and Mass Spectrometry Identification of Biomarker in Serum Samples. *Journal of Proteome Research*. 2010, **9**(11), 5568-5573. Dostupné z: doi:10.1021/pr100300t
85. COLLETT, James R., Eun Jeong CHO a Andrew D. ELLINGTON. Production and processing of aptamer microarrays. *Methods*. 2005, **37**(1), 4-15. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2005.05.009
86. WITT, Martin, Johanna-Gabriela WALTER a Frank STAHL. Aptamer Microarrays—Current Status and Future Prospects. *Microarrays*. 2015, **4**(2), 115-132. Dostupné z: doi:10.3390/microarrays4020115
87. MURRAY, Euan, Ekaterina O. MCKENNA, Lindsay R. BURCH, John DILLON, Pat LANGRIDGE-SMITH, Walter KOLCH, Andrew PITT a Ted R. HUPP. Microarray-Formatted Clinical Biomarker Assay Development Using Peptide Aptamers to Anterior Gradient-2. *Biochemistry*. 2007, **46**(48), 13742-13751. Dostupné z: doi:10.1021/bi7008739
88. KHAN, HUMA, MISSAILIDIS a SOTIRIS. Aptamers in oncology: a diagnostic perspective. *Gene Therapy and Molecular Biology*. 2008, **12**(A), 111-128.
89. DZUVOR, Christian K. O., Ebenezer Larteh TETTEY a Michael K. DANQUAH. Aptamers as promising nanotheranostic tools in the COVID -19 pandemic era. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2022, **14**(3) [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: doi:10.1002/wnan.1785
90. SMITH, J. Gustav a Robert E. GERSZTEN. Emerging Affinity-Based Proteomic Technologies for Large-Scale Plasma Profiling in Cardiovascular

- Disease. *Circulation*. 2017, **135**(17), 1651-1664. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025446
91. ABEL, Laura, Simone KUTSCHKI, Michael TUREWICZ, Martin EISENACHER, Jale STOUTJESDIJK, Helmut E. MEYER, Dirk WOITALLA a Caroline MAY. Autoimmune profiling with protein microarrays in clinical applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2014, **1844**(5), 977-987. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbapap.2014.02.023
 92. OSPINA-VILLA, Juan David, Absalom ZAMORANO-CARRILLO, Carlos A. CASTAÑÓN-SÁNCHEZ, Esther RAMÍREZ-MORENO a Laurence A. MARCHAT. Aptamers as a promising approach for the control of parasitic diseases. *The Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES*. 2016, **20**(6), 610-618.
 93. MAJDINASAB, Marjan, Mihaela BADEA a Jean Louis MARTY. Aptamer-Based Lateral Flow Assays: Current Trends in Clinical Diagnostic Rapid Tests. *Pharmaceuticals*. 2022, **15**(1). Dostupné z: doi:10.3390/ph15010090
 94. SHANG, Yuting, Shuzhen CAI, Qinghua YE, et al. Quantum Dot Nanobeads-Labelled Lateral Flow Immunoassay Strip for Rapid and Sensitive Detection of Salmonella Typhimurium Based on Strand Displacement Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Engineering*. 2022, **19**, 62-70. Dostupné z: doi:10.1016/j.eng.2021.03.024
 95. 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*. 2017, **97**, 385-398. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2017.10.010
 96. WAN, Quanyuan, Xiaohui LIU a Youli ZU. Oligonucleotide aptamers for pathogen detection and infectious disease control. *Theranostics*. 2021, **11**(18), 9133-9161. Dostupné z: doi:10.7150/thno.61804
 97. MOABELO, Koena Leah. *Development of an Aptamer Based Lateral Flow Test Strip for a Diabetes Biomarker*. Západní Kapsko, 2019. Diplomová práce. University of the Western Cape. Vedoucí práce Abram Madiehe, Mervin Meyer.
 98. DREYMANN, Nico, Wiebke SABROWSKI, Jennifer DANSO a Marcus M. MENGER. Aptamer-Based Sandwich Assay Formats for Detection and Discrimination of Human High-and Low-Molecular-Weight uPA for Cancer Prognosis and Diagnosis. *Cancers*. 2022, **14**(21). Dostupné z: doi:10.3390/cancers14215222
 99. FROHNMEYER, Esther, Nadine TUSCHEL, Tobias SITZ, Cornelia HERMANN, Gregor T. DAHL, Florian SCHULZ, Antje J. BAEUMNER a Markus FISCHER. Aptamer lateral flow assays for rapid and sensitive detection of cholera toxin. *The Analyst*. 2019, **144**(5), 1840-1849. Dostupné z: doi:10.1039/C8AN01616J
 100. CHEN, Ailiang a Shuming YANG. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015, **71**, 230-242. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2015.04.041
 101. JAISANKAR, Abinaya, Sasirekha KRISHNAN a Loganathan RANGASAMY. Recent developments of aptamer-based lateral flow assays for point-of-care (POC) diagnostics. *Analytical Biochemistry*. 2022, **655**. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2022.114874
 102. REID, Ruth, Bandhan CHATTERJEE, Soon Jyoti DAS, Sourav GHOSH a Tarun Kumar SHARMA. Application of aptamers as molecular recognition elements

- in lateral flow assays. *Analytical Biochemistry*. 2020, **593**. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2020.113574
103. KOMAROVA, Natalia, Olga PANOVA, Alexey TITOV a Alexander KUZNETSOV. Aptamers Targeting Cardiac Biomarkers as an Analytical Tool for the Diagnostics of Cardiovascular Diseases: A Review. *Biomedicines*. 2022, **10**(5). Dostupné z: doi:10.3390/biomedicines10051085
 104. GUPTA, Yachana a Aditya Sharma GHRERA. Recent advances in gold nanoparticle-based lateral flow immunoassay for the detection of bacterial infection. *Archives of Microbiology*. 2021, **203**(7), 3767-3784. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-021-02357-9
 105. WANG, Tao, Lanmei CHEN, Arpitha CHIKKANNA, Suxiang CHEN, Isabell BRUSIUS, Nabayet SBUH a Rakesh N. VEEDU. Development of nucleic acid aptamer-based lateral flow assays: A robust platform for cost-effective point-of-care diagnosis. *Theranostics*. 2021, **11**(11), 5174-5196. Dostupné z: doi:10.7150/thno.56471
 106. 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*. 2015, **64**, 392-403. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2014.09.026
 107. ROTHERHAM, Lia S., Charlotte MASERUMULE, Keertan DHEDA, Jacques THERON, Makobetsa KHATI a Yoshihiko HOSHINO. Selection and Application of ssDNA Aptamers to Detect Active TB from Sputum Samples. *PLoS ONE*. 2012, **7**(10), 804-810(7). Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0046862
 108. FENG, T-T., C-M. SHOU, L. SHEN, et al. Novel monoclonal antibodies to ESAT-6 and CFP-10 antigens for ELISA-based diagnosis of pleural tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2011, **15**(6), 804-810. Dostupné z: doi:10.5588/ijtld.10.0393
 109. DE ALMEIDA BRITO, Fabiano, Silvana MARIA ELÓI SANTOS, Gilda APARECIDA FERREIRA, William PEDROSA, Janaina GRADISSE, Lara CRISTINA COSTA a Suzane PRETTI FIGUEIREDO NEVES. Diagnostic Evaluation of ELISA and Chemiluminescent Assays as Alternative Screening Tests to Indirect Immunofluorescence for the Detection of Antibodies to Cellular Antigens. *American Journal of Clinical Pathology*. 2016, **145**(3), 323-331. Dostupné z: doi:10.1093/ajcp/aqv083
 110. SCHMITZ, Anton, Anna WEBER, Mehtap BAYIN, Stefan BREUERS, Volkmar FIEBERG, Michael FAMULOK a Günter MAYER. A SARS-CoV-2 Spike Binding DNA Aptamer that Inhibits Pseudovirus Infection by an RBD-Independent Mechanism**. *Angewandte Chemie International Edition*. 2021, **60**(18), 10279-10285. Dostupné z: doi:10.1002/anie.202100316
 111. WU, Zai-Sheng, Meng-Meng GUO, Song-Bai ZHANG, CHEN, Jian-Hui JIANG, Guo-Li SHEN a Ru-Qin YU. Reusable Electrochemical Sensing Platform for Highly Sensitive Detection of Small Molecules Based on Structure-Switching Signaling Aptamers. *Analytical Chemistry*. 2007, **79**(7), 2933-2939. Dostupné z: doi:10.1021/ac0622936
 112. MINUNNI, M., S. TOMBELLI, A. GULLOTTO, E. LUZI a M. MASCINI. Development of biosensors with aptamers as bio-recognition element: the case of HIV-1 Tat protein. *Biosensors and Bioelectronics*. 2004, **20**(6), 1149-1156. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2004.03.037

113. SCHLENSOG, Marc D., Thomas M.A. GRONEWOLD, Michael TEWES, Michael FAMULOK a Eckhard QUANDT. A Love-wave biosensor using nucleic acids as ligands. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2004, 101(3), 308-315. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2004.03.015
114. WANG, Sai, Wei YONG, Jiahui LIU, Liya ZHANG, Qilong CHEN a Yiyang DONG. Development of an indirect competitive assay-based aptasensor for highly sensitive detection of tetracycline residue in honey. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014, 57, 192-198. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2014.02.032
115. KIM, Chong-Han, Lyun-Pyo LEE, Jeong-Ran MIN, Myung-Woon LIM a Sang-Hee JEONG. An indirect competitive assay-based aptasensor for detection of oxytetracycline in milk. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014, 51, 426-430. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2013.08.003
116. PARK, Hoyoung a Insook Rhee PAENG. Development of direct competitive enzyme-linked aptamer assay for determination of dopamine in serum. *Analytica Chimica Acta*. 2011, 685(1), 65-73]. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2010.11.010
117. PARK, Jun Hee, Yea Seul CHO, Sungmuk KANG, Eun Jeong LEE, Gwan-Ho LEE a Sang Soo HAH. A colorimetric sandwich-type assay for sensitive thrombin detection based on enzyme-linked aptamer assay. *Analytical Biochemistry*. 2014, 462, 10-12. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2014.05.015
118. BALDRICH, Eva, Alexandre RESTREPO a Ciara K. O'SULLIVAN. Aptasensor Development: Elucidation of Critical Parameters for Optimal Aptamer Performance. *Analytical Chemistry*. 2004, 76(23), 7053-7063. Dostupné z: doi:10.1021/ac049258o
119. FUKATA, Hideki, Hidenori MIYAGAWA, Noriko YAMAZAKI a Chisato MORI. Comparison of Elisa-and LC-MS-Based Methodologies for the Exposure Assessment of Bisphenol A. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2008, 16(8), 427-430. Dostupné z: doi:10.1080/15376520600697404
120. HAYAT, Akhtar a Jean L. MARTY. Aptamer based electrochemical sensors for emerging environmental pollutants. *Frontiers in Chemistry*. 2014, 2. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2014.00041
121. PARKIN, M.C. a N. FRASCIONE. DNA/RNA Aptamers for Illicit Drug Molecules. In: WOLFF, Kim. *Detection of Drug Misuse: Biomarkers, Analytical Advances and Interpretation*. London: Royal Society of Chemistry, 2017, s. 167-189. ISBN 978-1782621577.
122. GREEN, Louis S., Carol BELL a Nebojsa JANJIC. Aptamers as Reagents for High-Throughput Screening. *BioTechniques*. 2001, 30(5), 1094-1110. Dostupné z: doi:10.2144/01305dd02
123. HUANG, Yue, Li ZHANG, Zhenzuo LI, Subash C. B. GOPINATH, Yeng CHEN a Yan XIAO. Aptamer–17 β -estradiol–antibody sandwich ELISA for determination of gynecological endocrine function. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2021, 68(4), 881-888. Dostupné z: doi:10.1002/bab.2008
124. STENH, Charlotte, Hillevi ENGLUND, Anna LORD, et al. Amyloid- β oligomers are inefficiently measured by enzyme-linked immunosorbent assay. *Annals of Neurology*. 2005, 58(1), 147-150. Dostupné z: doi:10.1002/ana.20524
125. KIM, Yeon Seok a Jongsoo JURNG. Gold nanoparticle-based homogeneous fluorescent aptasensor for multiplex detection. *The Analyst*. 2011, 136(18). Dostupné z: doi:10.1039/c1an15261k

126. ZHOU, Huangmei a Sanjun ZHANG. Recent Development of Fluorescent Light-Up RNA Aptamers. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2022, **52**(7), 1644-1661. Dostupné z: doi:10.1080/10408347.2021.1907735
127. MEYER, Michael, Thomas SCHEPER a Johanna-Gabriela WALTER. Aptamers: versatile probes for flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, **97**(16), 7097-7109. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-013-5070-z
128. WANG, Jine, Yajie ZHANG, Hongyan WANG, Yang CHEN, Lijun XU, Tian GAO a Renjun PEI. Selection and analysis of DNA aptamers to berberine to develop a label-free light-up fluorescent probe. *New Journal of Chemistry*. 2016, **40**(11), 9768-9773. Dostupné z: doi:10.1039/C6NJ02290A
129. DE CASTRO, Maria Angela Gomes, Burkhard RAMMNER a Felipe OPAZO. Aptamer Stainings for Super-resolution Microscopy. *Nucleic Acid Aptamers*. New York, NY: Springer New York, 2016, 2016, 197-210. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-3196-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-3197-2_17
130. KOUDRINA, Anna a Maria C. DEROSA. Advances in Medical Imaging: Aptamer-and Peptide-Targeted MRI and CT Contrast Agents. *ACS Omega*. 2020, **5**(36), 22691-22701. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.0c02650
131. YOON, Sorah a John ROSSI. Targeted Molecular Imaging Using Aptamers in Cancer. *Pharmaceuticals*. 2018, **11**(3). Dostupné z: doi:10.3390/ph11030071
132. JAFFER, Shabnam a Ira J. BLEIWEISS. Beyond Hematoxylin and Eosin—The Role of Immunohistochemistry in Surgical Pathology. *Cancer Investigation*. 2004, **22**(3), 445-465. Dostupné z: doi:10.1081/CNV-200034896
133. BAKER, Monya. Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. *Nature*. 2015, **521**(7552), 274-276. Dostupné z: doi:10.1038/521274a
134. ANDERSSON, Karl, Markku HÄMÄLÄINEN a Magnus MALMQVIST. Identification and Optimization of Regeneration Conditions for Affinity-Based Biosensor Assays. A Multivariate Cocktail Approach. *Analytical Chemistry*. 1999, **71**(13), 2475-2481. Dostupné z: doi:10.1021/ac981271j
135. 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*. 2019, **24**(23). Dostupné z: doi:10.3390/molecules24234377
136. KIM, Do-Hun, Jin-Myung SEO, Kyung-Ju SHIN a Su-Geun YANG. Design and clinical developments of aptamer-drug conjugates for targeted cancer therapy. *Biomaterials Research*. 2021, **25**(1). Dostupné z: doi:10.1186/s40824-021-00244-4
137. GERMER, Katherine, Marissa LEONARD a Xiaoting ZHANG. RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications. *Int J Biochem Mol Biol*. 2013, **4**(1), 27-40 [cit. 2023-06-26]. PMID: 23638319.
138. HERNANDEZ, Luiza, Isabel MACHADO, Thomas SCHAFFER a Frank HERNANDEZ. Aptamers Overview: Selection, Features and Applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2015, **15**(12), 1066-1081. Dostupné z: doi:10.2174/1568026615666150413153717
139. In: BARCISZEWSKI, Jan a Brian F.C. CLARK. *RNA Biochemistry and Biotechnology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999, s. 7. ISBN 0-7923-5861-9.

140. NI, Shuaijian, Zhenjian ZHUO, Yufei PAN, et al. *Recent Progress in Aptamer Discoveries and Modifications for Therapeutic Applications*. 2021, **13**(8), 9500-9519. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.0c05750
141. ZHU, Guizhi, Gang NIU a Xiaoyuan CHEN. Aptamer–Drug Conjugates. *Bioconjugate Chemistry*. 2015, **26**(11), 2186-2197. Dostupné z: doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00291
142. NING, Yi, Jue HU a Fangguo LU. *Aptamers used for biosensors and targeted therapy*. 2020, **132**. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2020.110902
143. YOON, Sorah, Kai-Wen HUANG, Vikash REEBYE, et al. Targeted Delivery of C/EBP α -saRNA by Pancreatic Ductal Adenocarcinoma-specific RNA Aptamers Inhibits Tumor Growth In Vivo. *Molecular Therapy*. 2016, **24**(6), 1106-1116. Dostupné z: doi:10.1038/mt.2016.60
144. SHANGGUAN, Dihua, Ying LI, Zhiwen TANG, et al. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, **103**(32), 11838-11843. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0602615103
145. SHANGGUAN, Dihua, Zehui CAO, Ling MENG, Prabodhika MALLIKARATCHY, Kwame SEFAH, Hui WANG, Ying LI a Weihong TAN. Cell-Specific Aptamer Probes for Membrane Protein Elucidation in Cancer Cells. *Journal of Proteome Research*. 2008, **7**(5), 2133-2139. Dostupné z: doi:10.1021/pr700894d
146. MONGELARD, P a F BOUVET. AS-1411, a guanosine-rich oligonucleotide aptamer targeting nucleolin for the potential treatment of cancer, including acute myeloid leukemia. *Curr Opin Mol Ther*. 2010, **12**(1), 107–14.
147. BAGALKOT, Vaishali, Omid C. FAROKHZAD, Robert LANGER a Sangyong JON. An Aptamer–Doxorubicin Physical Conjugate as a Novel Targeted Drug-Delivery Platform. *Angewandte Chemie International Edition*. 2006, **45**(48), 8149-8152. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200602251
148. JEONG, Hwa Yeon, Hyeri KIM, Myunghwa LEE, et al. Development of HER2-Specific Aptamer-Drug Conjugate for Breast Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, **21**(24). Dostupné z: doi:10.3390/ijms21249764
149. YEOM, Ji-Hyun, Boeun LEE, Daeyoung KIM, Jong-kook LEE, Suk KIM, Jeehyeon BAE, Yoonkyung PARK a Kangseok LEE. Gold nanoparticle-DNA aptamer conjugate-assisted delivery of antimicrobial peptide effectively eliminates intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biomaterials*. 2016, **104**, 43-51. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2016.07.009
150. LEE, Boeun, Jonggwan PARK, Minkyung RYU, et al. Antimicrobial peptide-loaded gold nanoparticle-DNA aptamer conjugates as highly effective antibacterial therapeutics against *Vibrio vulnificus*. *Scientific Reports*. 2017, **7**(1). Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-14127-z
151. SAMPEY, Gavin C., Irene GUENDEL, Ravi DAS, Elizabeth JAWORSKI, Zachary KLASE, Aarthi NARAYANAN, Kylene KEHN-HALL a Fatah KASHANCHI. Transcriptional Gene Silencing (TGS) via the RNAi Machinery in HIV-1 Infections. *Biology*. 2012, **1**(2), 339-369. Dostupné z: doi:10.3390/biology1020339
152. OCSOY, Ismail, Sadi YUSUFBEYOGLU, Vedat YILMAZ, Eric S. MCLAMORE, Nilay ILDIZ a Ahmet ÜLGEN. DNA aptamer functionalized gold nanostructures for molecular recognition and photothermal inactivation of methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017, **159**, 16-22. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2017.07.056

153. OBERMANNOVÁ, Radka. Checkpoint Inhibitors in the Treatment of Upper Gastrointestinal Tract Tumors. *Klinická onkologie*. 2017, **30**(S3), 50 – 54. Dostupné z: doi:10.14735/amko20173S50.
154. SANTULLI-MAROTTO, Sandra, Smita K. NAIR, Chris RUSCONI, Bruce SULLENGER a Eli GILBOA. Multivalent RNA Aptamers That Inhibit CTLA-4 and Enhance Tumor Immunity. *Cancer Res*. 2003, **63**(21), 7483–7489.
155. ESQUIVEL-VELÁZQUEZ, Marcela, Pedro OSTOA-SALOMA, Margarita Isabel PALACIOS-ARREOLA, Karen E. NAVA-CASTRO, Julieta Ivonne CASTRO a Jorge MORALES-MONTOR. *The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression*. 2015, **35**(1), 1-16. Dostupné z: doi:10.1089/jir.2014.0026
156. VAVALLE, John Paul a Mauricio G COHEN. The REG1 anticoagulation system: a novel actively controlled factor IX inhibitor using RNA aptamer technology for treatment of acute coronary syndrome. *Future Cardiology*. 2012, **8**(3), 371-382. Dostupné z: doi:10.2217/fca.12.5
157. HUANG, Ren-Huai, Daved H. FREMONT, John L. DIENER, Robert G. SCHAUB a J. Evan SADLER. A Structural Explanation for the Antithrombotic Activity of ARC1172, a DNA Aptamer that Binds von Willebrand Factor Domain A1. *Structure*. 2009, **17**(11), 1476-1484. Dostupné z: doi:10.1016/j.str.2009.09.011
158. MUSUMECI, Domenica a Daniela MONTESARCHIO. *Polyvalent nucleic acid aptamers and modulation of their activity: a focus on the thrombin binding aptamer*. 2012, **136**(2), 202-215. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2012.07.011
159. ANDO, Takehiro, Mizuki YAMAMOTO, Takumi YOKOYAMA, Daisuke HORIUCHI a Takashi KAWAKAMI. In vitro selection generates RNA aptamer that antagonizes PCSK9–LDLR interaction and recovers cellular LDL uptake. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2021, **131**(3), 326-332. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiosc.2020.10.009
160. SAKAI, Hiroki, Yasuhiro IKEDA, Takeshi HONDA, Yoshie TANAKA, Kozo SHIRAIISHI a Makoto INUI. A cell-penetrating phospholamban-specific RNA aptamer enhances Ca²⁺ transients and contractile function in cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2014, **76**, 177-185. Dostupné z: doi:10.1016/j.yjmcc.2014.09.006
161. VCEV, A. Management of side effects during antiviral therapy. *Acta Medica Croatica: Casopis Hrvatske Akademije Medicinskih* [online]. 2009, **63**(5), 463-467 [cit. 2023-06-26]. PMID: 20198909.
162. VILLA, T. G., Ana G. ABRIL, S. SÁNCHEZ, T. DE MIGUEL a A. SÁNCHEZ-PÉREZ. Animal and human RNA viruses: genetic variability and ability to overcome vaccines. *Archives of Microbiology*. 2021, **203**(2), 443-464. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-020-02040-5
163. BALINSKY, Corey A., Hana SCHMEISSER, Sundar GANESAN, Kavita SINGH, Theodore C. PIERSON a Kathryn C. ZOON. Nucleolin Interacts with the Dengue Virus Capsid Protein and Plays a Role in Formation of Infectious Virus Particles. *Journal of Virology*. 2013, **87**(24), 13094-13106. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00704-13
164. KWON, Hyun-Mi, Kwang Hyun LEE, Byung Woo HAN, Mi Ra HAN, Dong Ho KIM, Dong-Eun KIM a Man-Seong PARK. An RNA Aptamer That Specifically Binds to the Glycosylated Hemagglutinin of Avian Influenza Virus and Suppresses

- Viral Infection in Cells. *PLoS ONE*. 2014, **9**(5). Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0097574
165. CHALOIN, L. Endogenous expression of a high-affinity pseudoknot RNA aptamer suppresses replication of HIV-1. *Nucleic Acids Research*. 2002, **30**(18), 4001-4008. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkf522
 166. WANDTKE, Tomasz, Joanna WOŹNIAK a Piotr KOPINŹSKI. Aptamers in Diagnostics and Treatment of Viral Infections. *Viruses*. 2015, **7**(2), 751-780. Dostupné z: doi:10.3390/v7020751
 167. NING, Yi, Lijuan CHENG, Min LING, Xinru FENG, Lingli CHEN, Minxi WU a Le DENG. Efficient suppression of biofilm formation by a nucleic acid aptamer. *Pathogens and Disease*. 2015, **73**(6). Dostupné z: doi:10.1093/femspd/ftv034
 168. BAYRAÇ, Abdullah Tahir a Sultan Ilayda DONMEZ. Selection of DNA aptamers to Streptococcus pneumonia and fabrication of graphene oxide based fluorescent assay. *Analytical Biochemistry*. 2018, **556**, 91-98. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2018.06.024 168
 169. THAY, Bernard, Sun Nyunt WAI, Jan OSCARSSON a Michael OTTO. Staphylococcus aureus α -Toxin-Dependent Induction of Host Cell Death by Membrane-Derived Vesicles. *PLoS ONE*. 2013, **8**(1). Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0054661
 170. VIVEKANANDA, Jeevalatha, Christi SALGADO a Nancy J. MILLENBAUGH. DNA aptamers as a novel approach to neutralize Staphylococcus aureus α -toxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014, **444**(3), 433-438. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2014.01.076
 171. ULRICH, Henning, Margaret H. MAGDESIAN, Maria Júlia M. ALVES a Walter COLLI. In Vitro Selection of RNA Aptamers That Bind to Cell Adhesion Receptors of Trypanosoma cruzi and Inhibit Cell Invasion. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, **277**(23), 20756-20762. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M111859200
 172. BARFOD, Anders, Tina PERSSON a Johan LINDH. In vitro selection of RNA aptamers against a conserved region of the Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1. *Parasitology Research*. 2009, **105**(6), 1557-1566. Dostupné z: doi:10.1007/s00436-009-1583-x
 173. MARTÍN, M. Elena, Marta GARCÍA-HERNÁNDEZ, Eva M. GARCÍA-RECIO, Gerónimo F. GÓMEZ-CHACÓN, Marta SÁNCHEZ-LÓPEZ, Víctor M. GONZÁLEZ a Ben L. KELLY. DNA Aptamers Selectively Target Leishmania infantum H2A Protein. *PLoS ONE*. 2013, **8**(10). Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0078886
 174. VATER, Axel, Simone SELL, Przemyslaw KACZMAREK, et al. A Mixed Mirror-image DNA/RNA Aptamer Inhibits Glucagon and Acutely Improves Glucose Tolerance in Models of Type 1 and Type 2 Diabetes. *Journal of Biological Chemistry*. 2013, **288**(29), 21136-21147. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M112.444414
 175. DOUDNA, J A, T R CECH a B A SULLENGER. Selection of an RNA molecule that mimics a major autoantigenic epitope of human insulin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995, **92**(6), 2355-2359. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.92.6.2355
 176. DEVARAPU, Satish Kumar, Santhosh KUMAR VR, Khader Valli RUPANAGUDI, Onkar P. KULKARNI, Dirk EULBERG, Sven KLUSSMANN a Hans-Joachim ANDERS. Dual blockade of the pro-inflammatory chemokine CCL2

- and the homeostatic chemokine CXCL12 is as effective as high dose cyclophosphamide in murine proliferative lupus nephritis. *Clinical Immunology*. 2016, **169**, 139-147. Dostupné z: doi:10.1016/j.clim.2016.07.003
177. MURAMATSU, Takashi. Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2010, **86**(4), 410-425. Dostupné z: doi:10.2183/pjab.86.410
178. RHODES, Andrew, Angela DEAKIN, John SPAULL, Barry COOMBER, Alan AITKEN, Paul LIFE a Stephen REES. The Generation and Characterization of Antagonist RNA Aptamers to Human Oncostatin M. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, **275**(37), 28555-28561. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M002981200
179. CHO, Jung-Sun a Seong-Wook LEE. Sequence and Structural Features of RNA Aptamer Against Myasthenic Autoantibodies. *Oligonucleotides*. 2009, **19**(3), 273-280. Dostupné z: doi:10.1089/oli.2009.0201
180. OLSON, Lyra B., Nicole I. HUNTER, Rachel E. REMPEL a SULLENGER. Targeting DAMPs with nucleic acid scavengers to treat lupus. *Translational Research*. 2022, **245**. Dostupné z: doi:10.1016/j.trsl.2022.02.007
181. LIANG, Huiyu, Yusheng SHI, Zhewen KOU, et al. Inhibition of BACE1 Activity by a DNA Aptamer in an Alzheimer's Disease Cell Model. *PLOS ONE*. 2015, **10**(10). Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0140733
182. HUNT, Vernon. *Characterization and Delivery of DNA Aptamers Selected for the Prevention of Alpha-Synuclein Aggregation in Parkinson's Disease*. Ottawa, 2018. Habilitační práce. Carleton University Ottawa.
183. BOISJOLI, Spencer. *Characterizing Aptamer-Based α -Synuclein Fibril Inhibitors as a Potential Therapeutic Agent of Parkinson's Disease*. Ottawa, 2020. Habilitační práce. Carleton University Ottawa.
184. RHIE, Alexandre, Louise KIRBY, Natalie SAYER, et al. Characterization of 2'-Fluoro-RNA Aptamers That Bind Preferentially to Disease-associated Conformations of Prion Protein and Inhibit Conversion. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, **278**(41), 39697-39705. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M305297200
185. RICCARDI, Claudia, Federica D'ARIA, Filomena Anna DIGILIO, et al. Fighting the Huntington's Disease with a G-Quadruplex-Forming Aptamer Specifically Binding to Mutant Huntingtin Protein: Biophysical Characterization, In Vitro and In Vivo Studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, **23**(9). Dostupné z: doi:10.3390/ijms23094804
186. LIU, Shan, Yixin XU, Xin JIANG, Hong TAN a Binwu YING. Translation of aptamers toward clinical diagnosis and commercialization. *Biosensors and Bioelectronics*. 2022, **208**. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2022.114168
187. KAUR, Harleen, John G. BRUNO, Amit KUMAR a Tarun Kumar SHARMA. Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines. *Theranostics*. 2018, **8**(15), 4016-4032. Dostupné z: doi:10.7150/thno.25958
188. SUNDARAM, Padma, Helena KURNIAWAN, Mark E. BYRNE a Jacek WOWER. Therapeutic RNA aptamers in clinical trials. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013, **48**(1-2), 259-271. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2012.10.014

189. LIU, Max, Khalequz ZAMAN a Yolanda M. FORTENBERRY. Overview of the Therapeutic Potential of Aptamers Targeting Coagulation Factors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, **22**(8). Dostupné z: doi:10.3390/ijms22083897
190. ZBORALSKI, Dirk, Kai HOEHLIG, Dirk EULBERG, Anna FRÖMMING a Axel VATER. Increasing Tumor-Infiltrating T Cells through Inhibition of CXCL12 with NOX-A12 Synergizes with PD-1 Blockade. *Cancer Immunology Research* [online]. 2017, **5**(11), 950-956 [cit. 2023-06-27]. ISSN 2326-6066. Dostupné z: doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0303