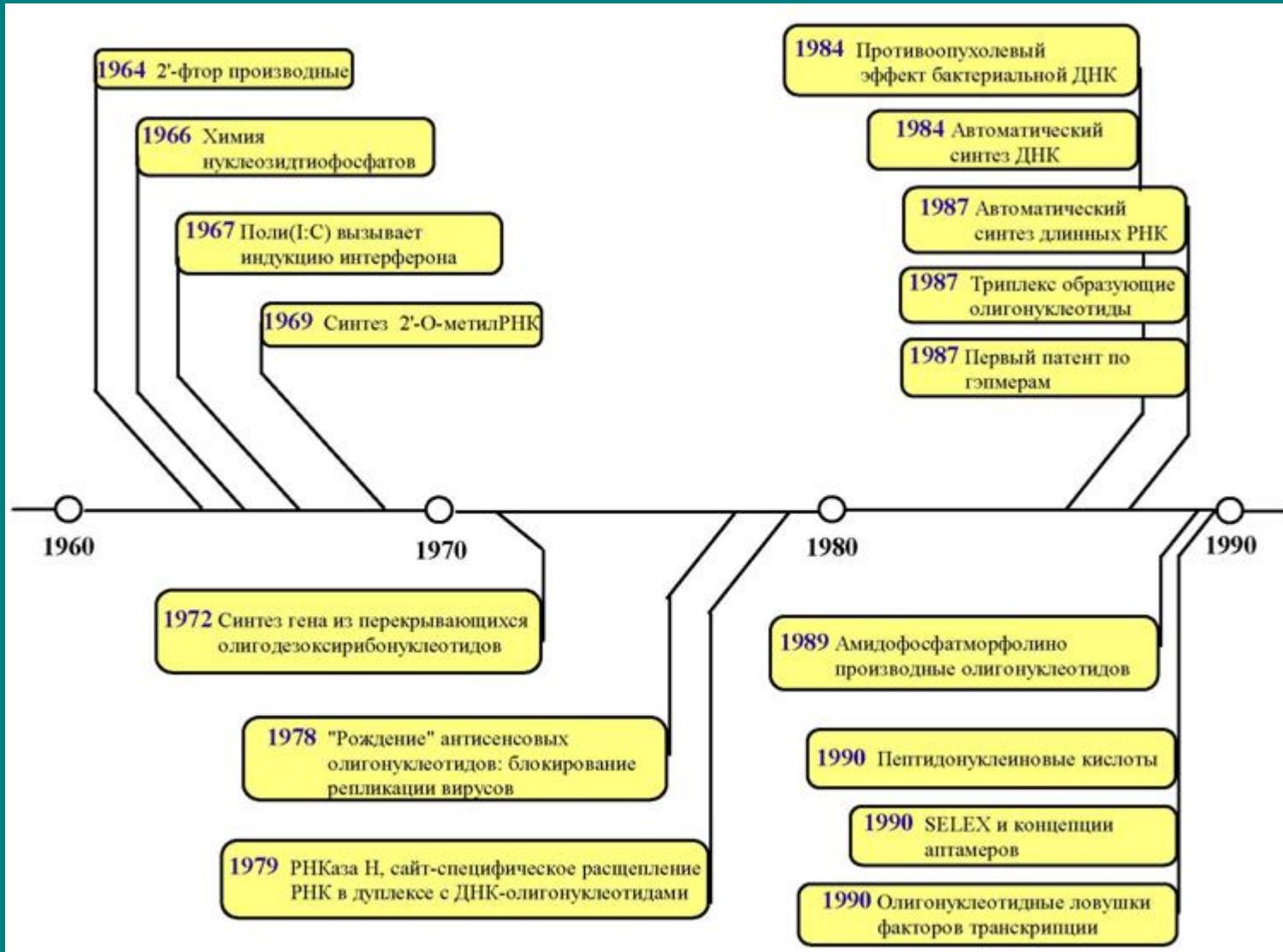
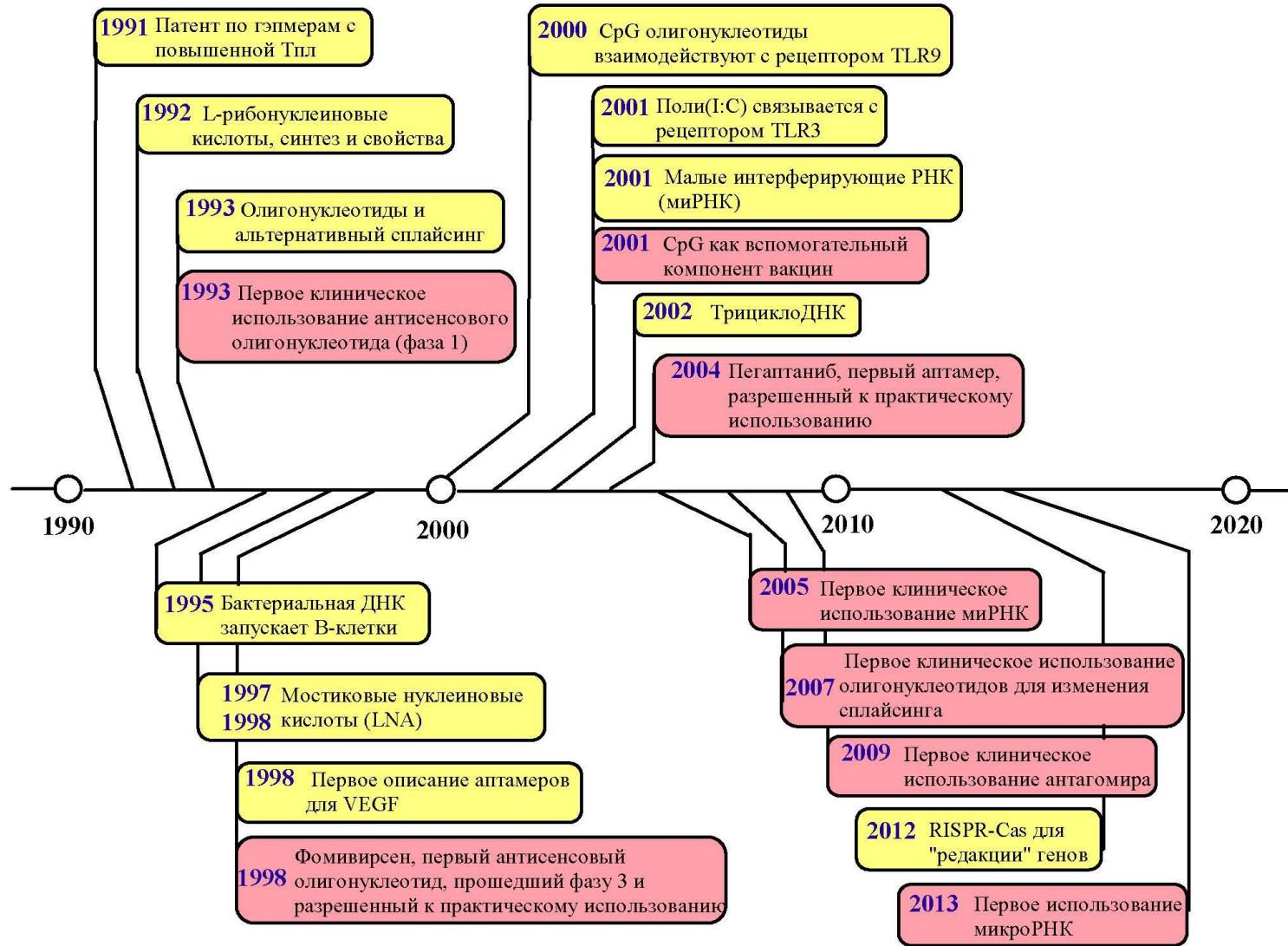


Межфакультетский курс лекций  
Химический факультет МГУ  
имени М.В. Ломоносова

**«Геном человека: страхи и надежды»**



Lundin KE, Gissberg O, Smith CIE “Oligonucleotide therapies: the past and present”. Human gene therapy (2015), v.28, 475 -485



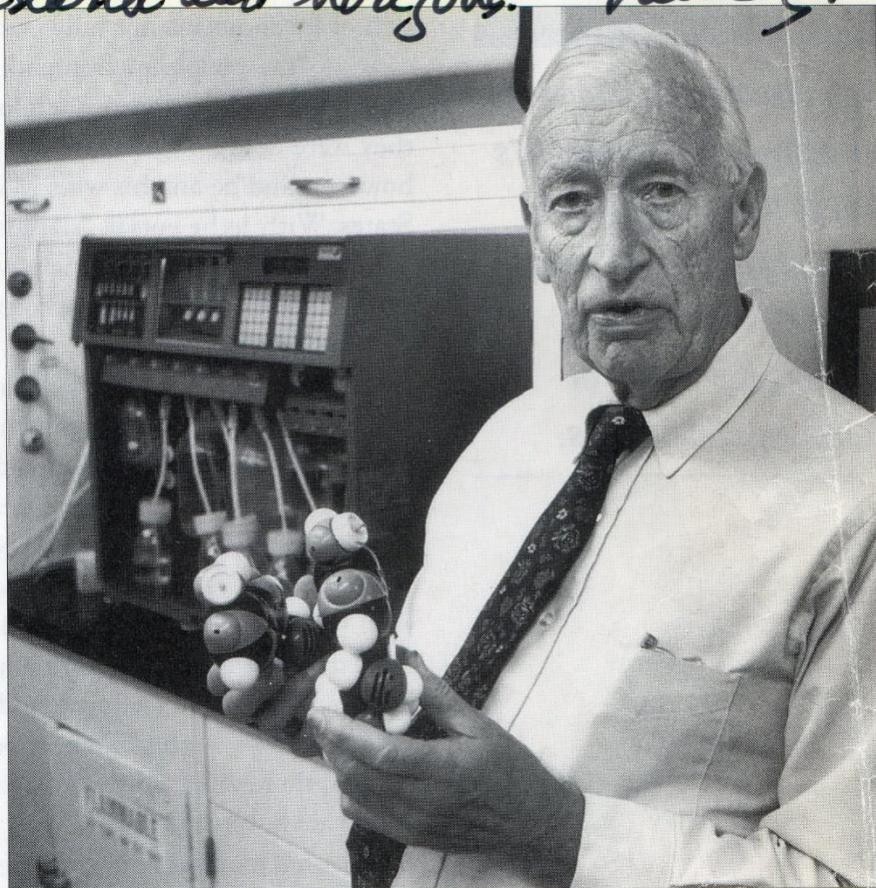
Lundin KE, Gissberg O, Smith CIE “Oligonucleotide therapies: the past and present”.  
Human gene therapy (2015), v.28, 475 -485

To Valer, — With best hopes for bringing nucleic acid chemistry into the heart of new medical research and horizons. Paul Z.

# Drama

"Close to it, in a way " he says in his careful manner. At age 80, he still works full-time as a principal investigator at the Worcester Foundation for Experimental Biology in Shrewsbury Mass. "Why don't I retire? Well, I'm better at this than I am at gardening or carpentry " he says.

These days he is focused on the antisense strand of DNA, which is the noncoding strand that serves as the template for RNA synthesis. He is



JON GILBERT FOX

## Тема лекции:

- Лекарства (?!) на основе синтетических полинуклеотидов. Регулирование активности белков с помощью «ловушек», аптамеров
- Химический факультет МГУ  
Кафедра химии природных соединений
- д.х.н. Метелев Валерий Георгиевич  
[metelev@belozersky.msu.ru](mailto:metelev@belozersky.msu.ru) (495)939-54-11

**Life requires the recognition and function of simple and complex molecules operating together.**

Жизнь требует распознавания и функционирования простых и сложных молекул, действующих вместе.

### миРНК

Мишень – индивидуальная мРНК  
Олигонуклеотид – двусpirальная РНК  
Механизм - деградация целевой мРНК

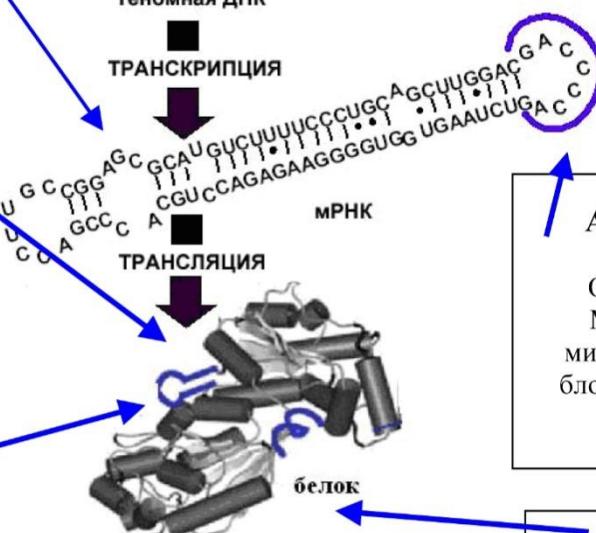


### Антигенная стратегия

Мишень – индивидуальная геномная ДНК  
Олигонуклеотид – односпиральная ДНК, способная к образованию тройных спиралей  
Механизм - формирование трехспиральных структур блокирует транскрипцию

### Иммуностимулирующие олигонуклеотиды

Мишень – толл-подобный receptor 9 (TLR9)  
Олигонуклеотид – односпиральная ДНК с неметилированными CpG участками  
Механизм: активация TLR9 приводит к клеточному иммунному ответу



### "Ловушки" -decoys

Мишень – фактор транскрипции  
Олигонуклеотид - двусpirальная ДНК, содержащая участок узнавания соответствующего фактора транскрипции  
Механизм - конкурентное связывание фактора транскрипции с ловушкой, а не с геномной ДНК

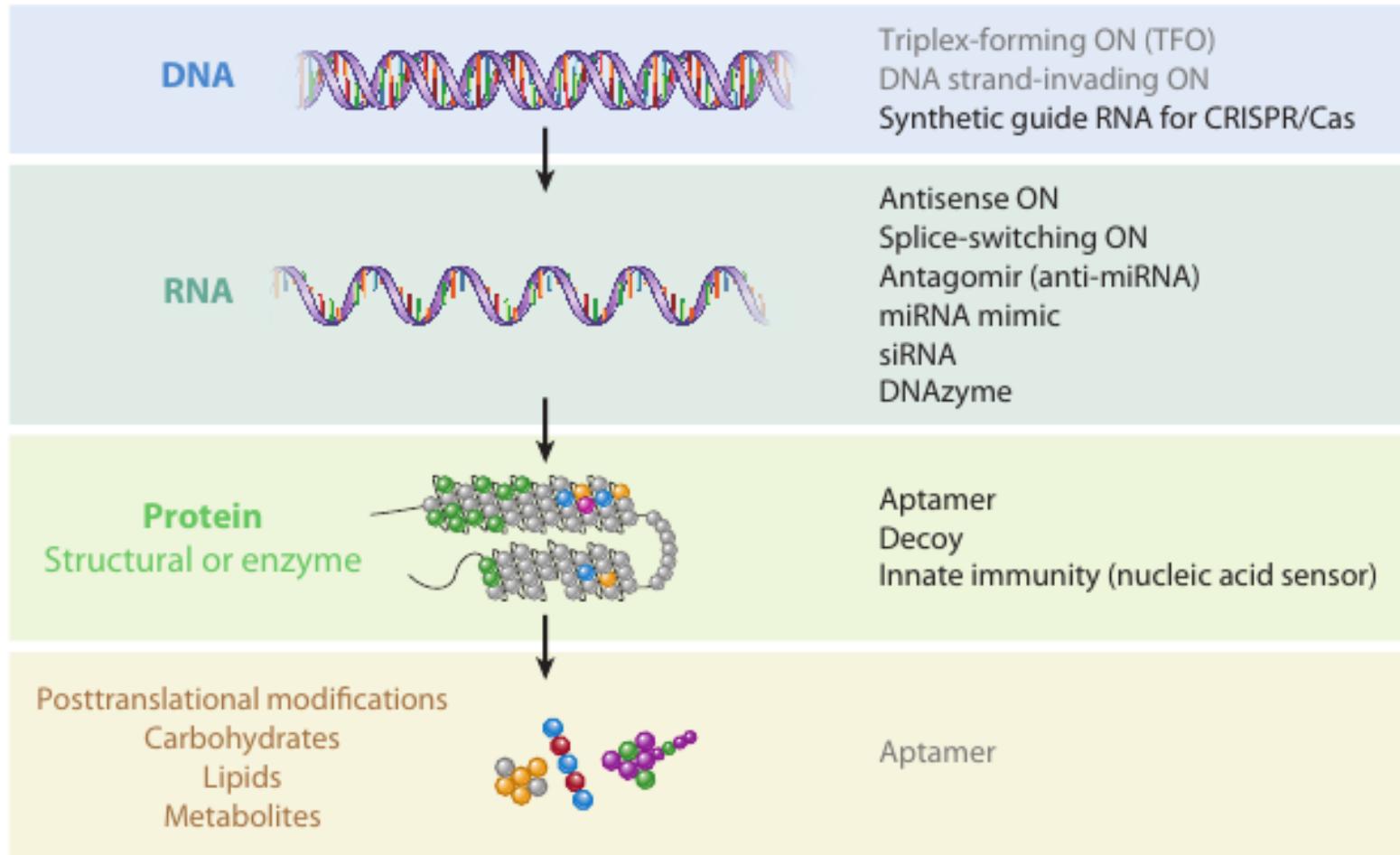
### Антисеневые олигонуклеотиды

Мишень - индивидуальная мРНК  
Олигонуклеотид - односпиральная ДНК  
Механизм: образование гетеродуплекса мишени с олигонуклеотидом, приводящее к блокированию трансляции за счет гидролиза РНК РНКазой Н или механически

### Аптамеры

Мишень - белки, рецепторы  
Олигонуклеотид - односпиральные РНК или ДНК  
Механизм - высокоспецифичное связывание аптамера с мишенью

## Targeting strategies for oligonucleotides



Schematic of ON targeting strategies of the extended central dogma that includes the effects of downstream enzymatic events. Strategies that have not yet reached the clinic are shown in grey. Abbreviations: CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; miRNA, microRNA; ON, oligonucleotide; siRNA, short interfering RNA.

# **Регулирование функциональной активности ДНК связывающих белков с помощью «ловушек» - DECOYS**

# Факторы транскрипции

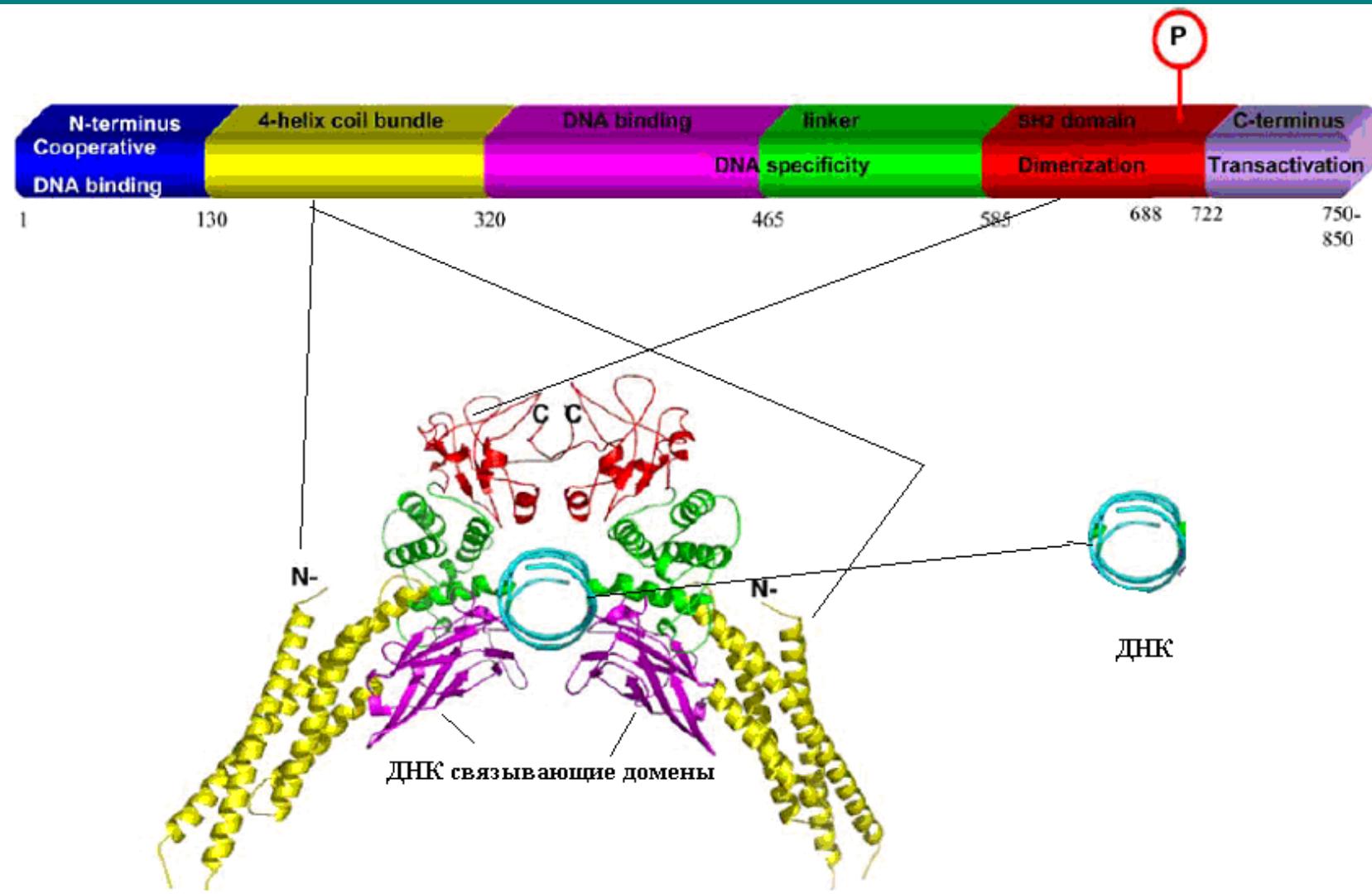
- транскрипционные факторы— белки, контролирующие процесс синтеза мРНК на матрице ДНК (транскрипцию) путём связывания с регуляторными участками ДНК.
- Транскрипционные факторы выполняют свою функцию либо самостоятельно, либо в комплексе с другими белками.
- Они обеспечивают снижение (репрессоры) или повышение (активаторы) константы связывания РНК-полимеразы с регуляторными участками ДНК.

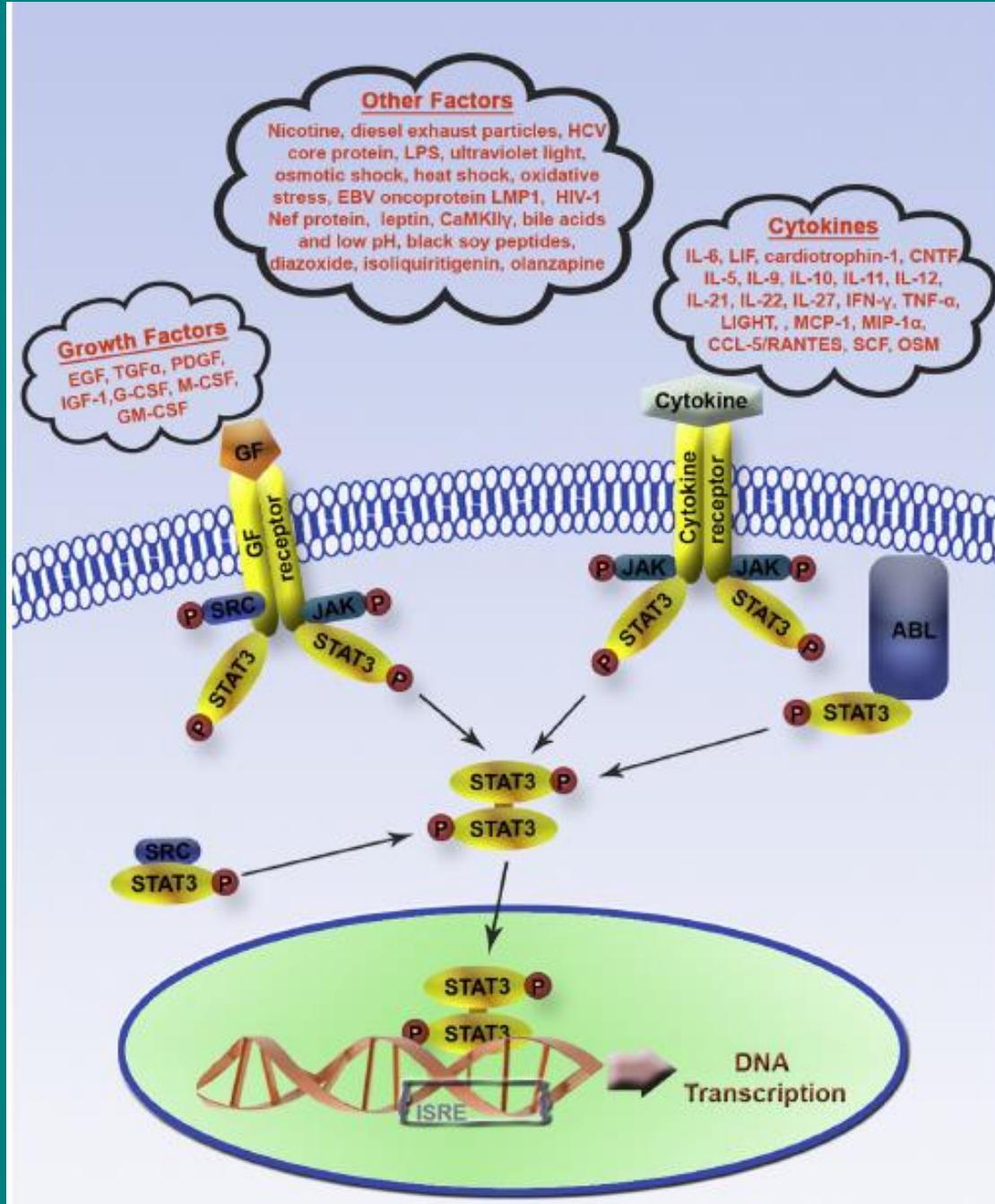
# Определяющая черта факторов транскрипции -

наличие в их составе одного или более ДНК-связывающих доменов, которые взаимодействуют с характерными участками ДНК, расположенными в регуляторных областях генов.

# STAT3

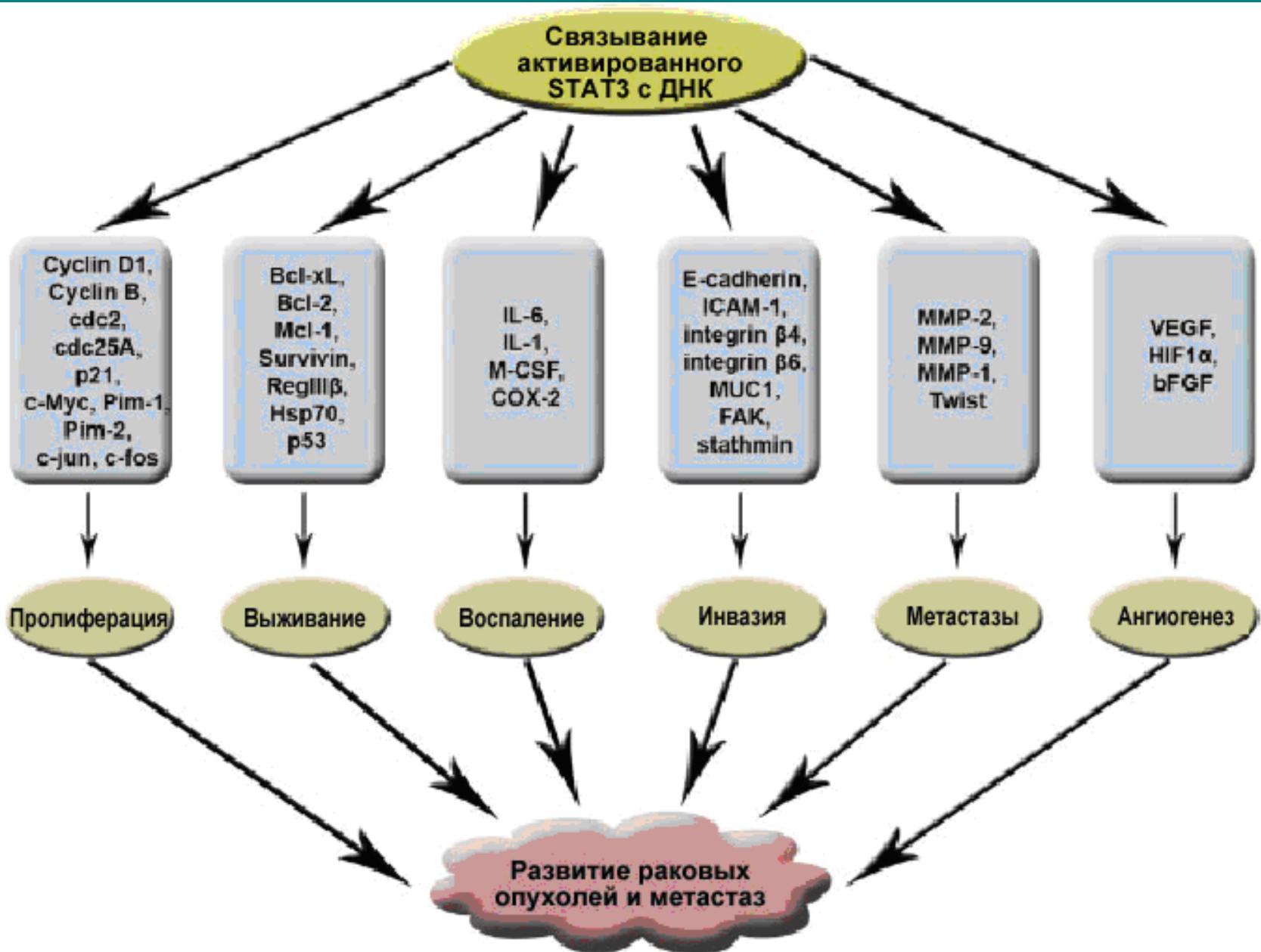
- signal transducer and activator of transcription 3
- сигнальный белок (трансдуктор) и активатор транскрипции 3

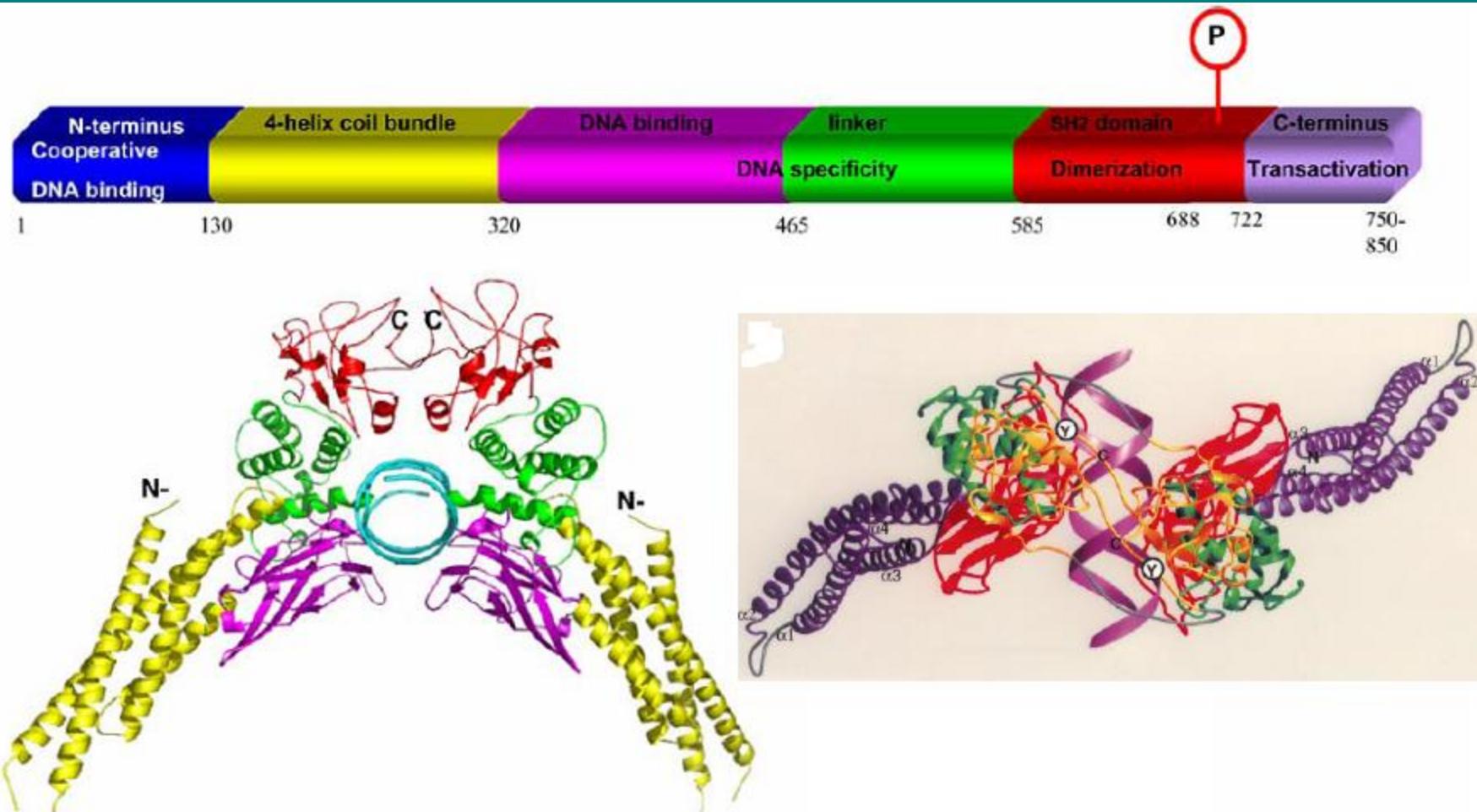


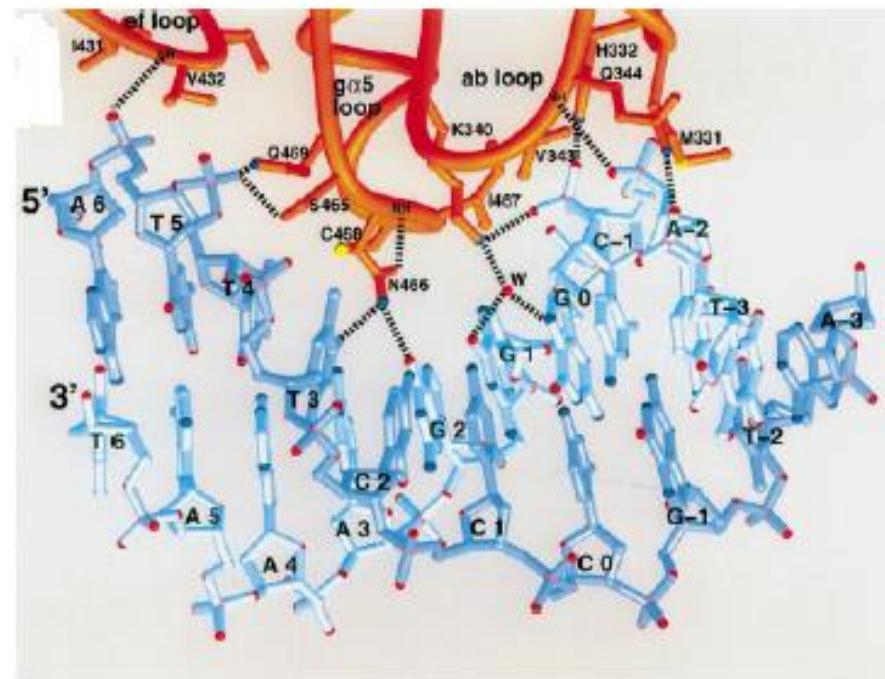
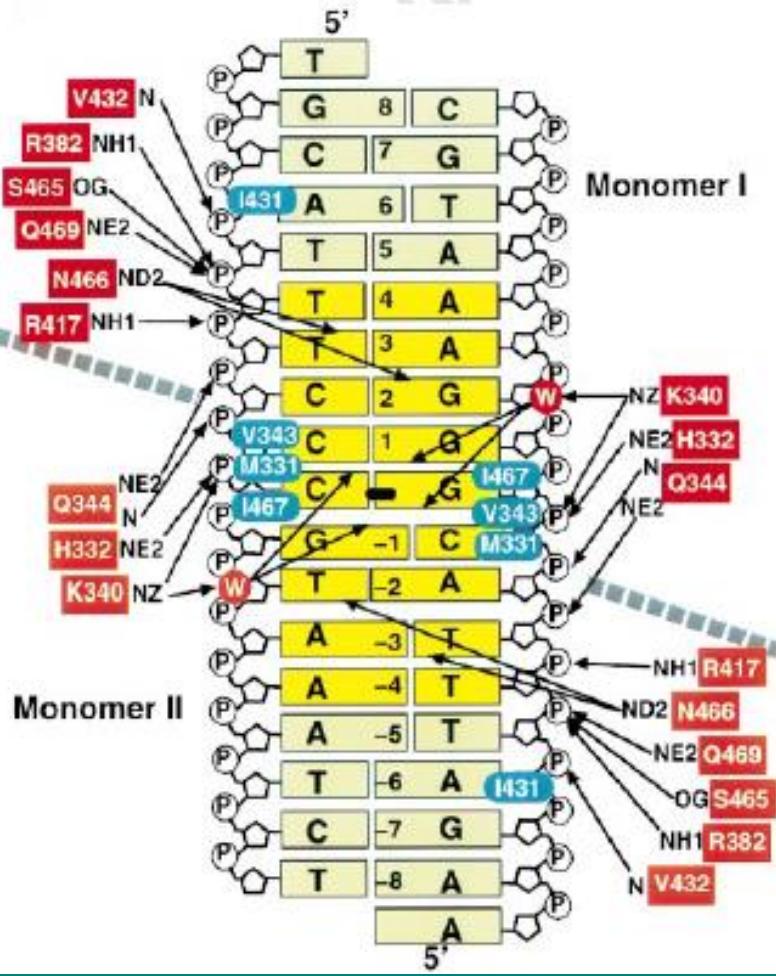


**При физиологических условиях как амплитуда, так и продолжительность рецептор-индуцируемой активации STAT3 являются строго контролируемыми быстрыми процессами.**

**В противоположность временной природе активации STAT3 в нормальных клетках, постоянная активация STAT3 обнаружена в культурах раковых клеток и первичных опухолях человека, включая лейкемию, лимфому, множественную миелому, глиому, рака легких, толстой кишки, почек, головного мозга.**



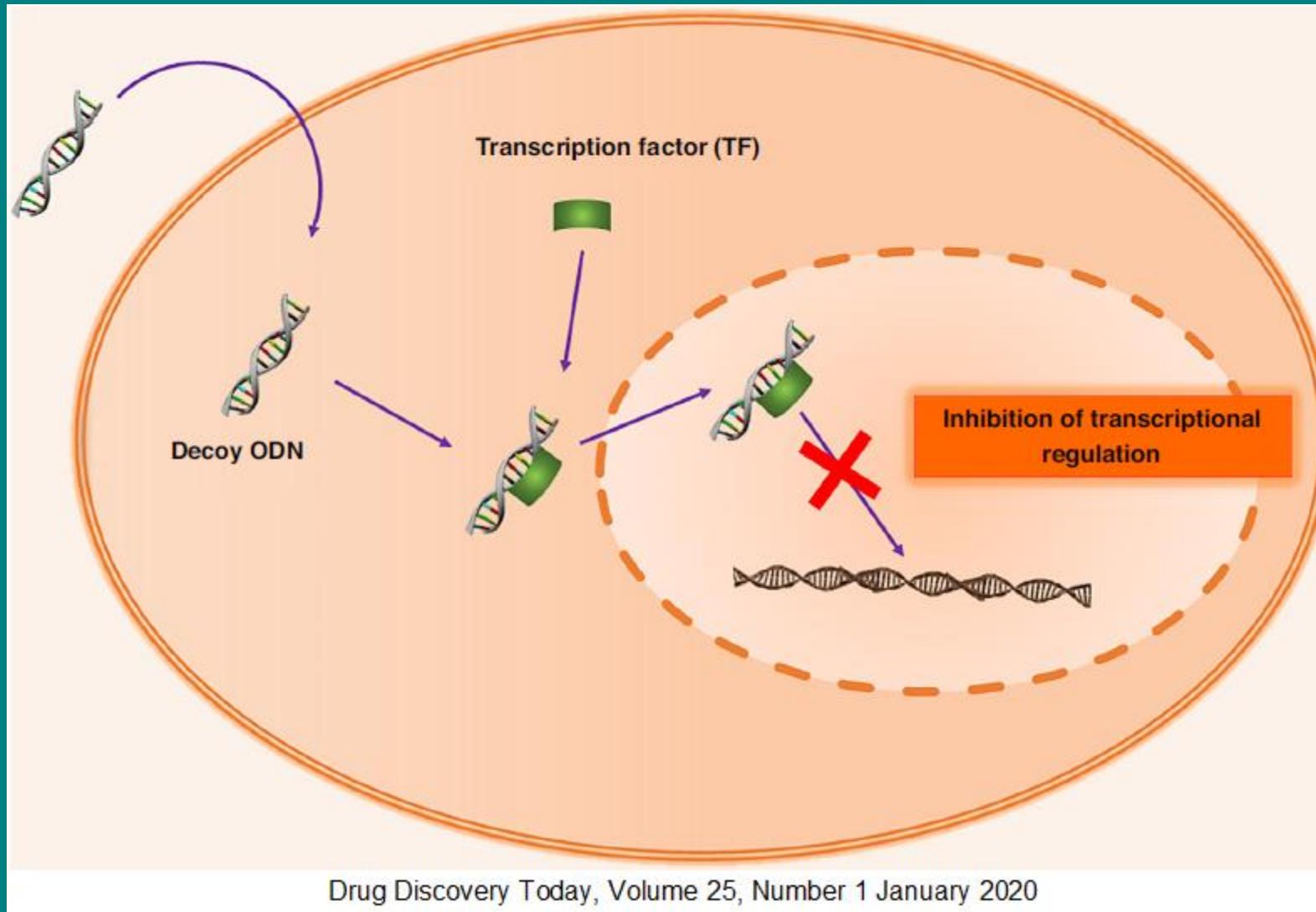




# Decoy – приманка, подсадная утка, ловушка, ложная цель, обманка

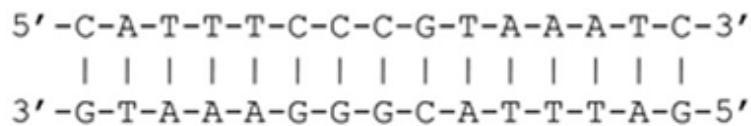
Принцип действия ловушки:

- В состав олигонуклеотидной ловушки входит одна или несколько консенсусных последовательностей, с которыми и связываются соответствующие факторы транскрипции.
- Связывание фактора транскрипции с ловушкой предотвращает взаимодействие фактора с цис-элементами геномной ДНК и ожидаемую экспрессию генов.

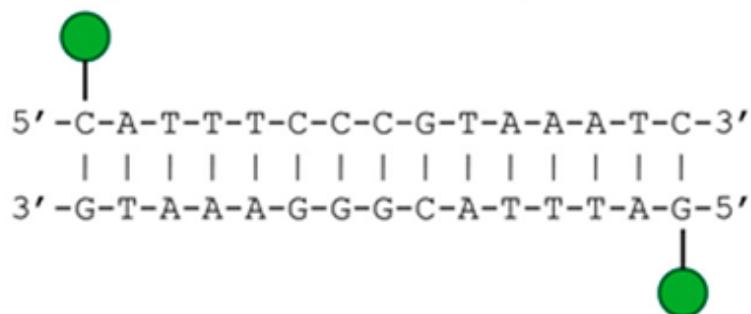




### Linear STAT3 Decoy (S3D)

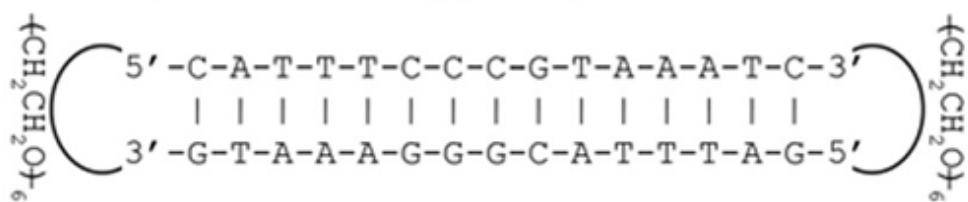


### Biotinylated Linear STAT3 Decoy

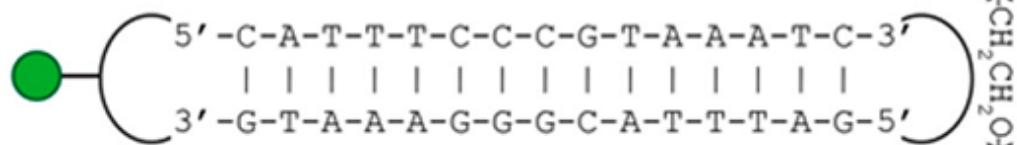


Biotin modification

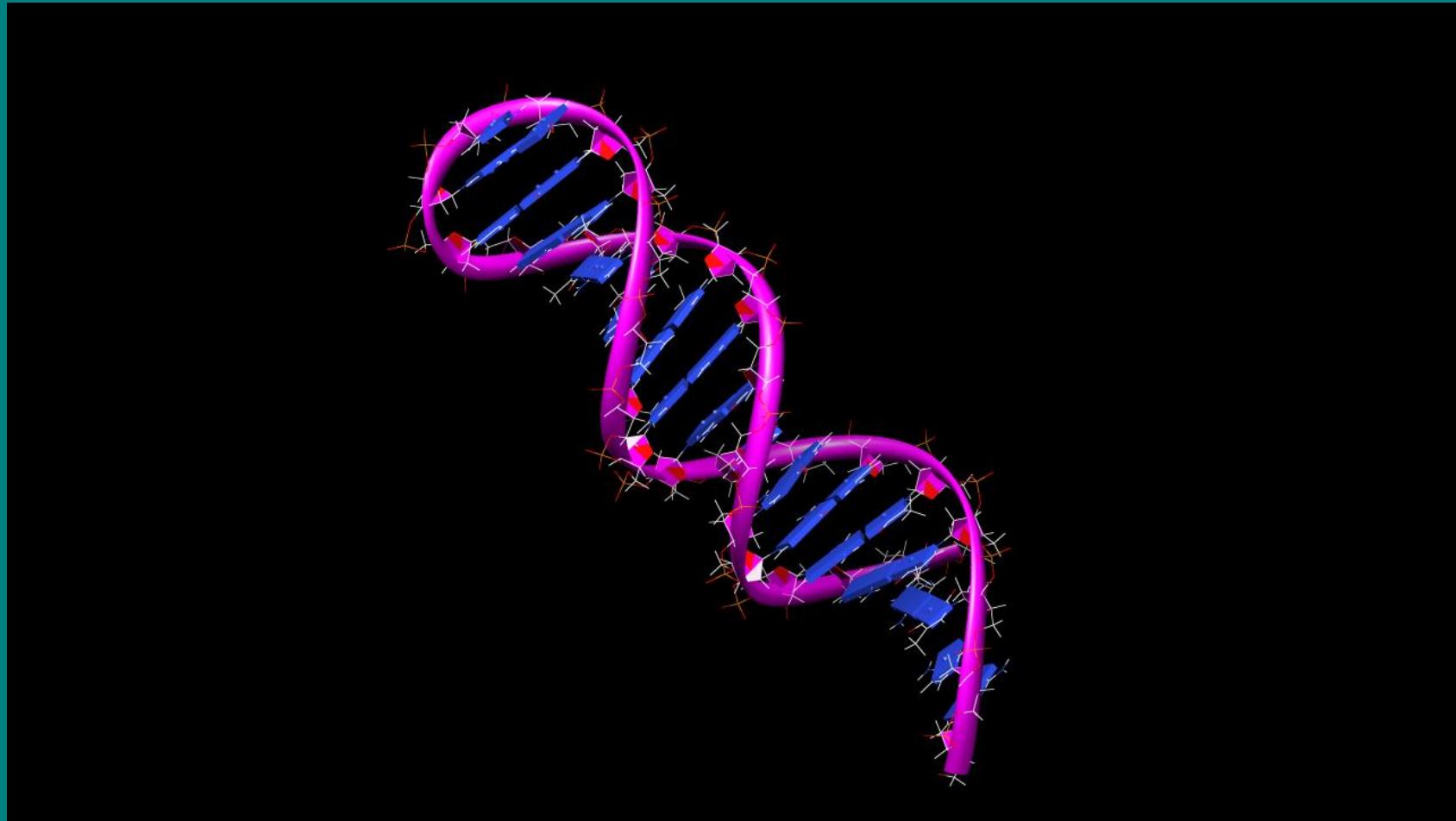
### Cyclic STAT3 Decoy (CS3D)

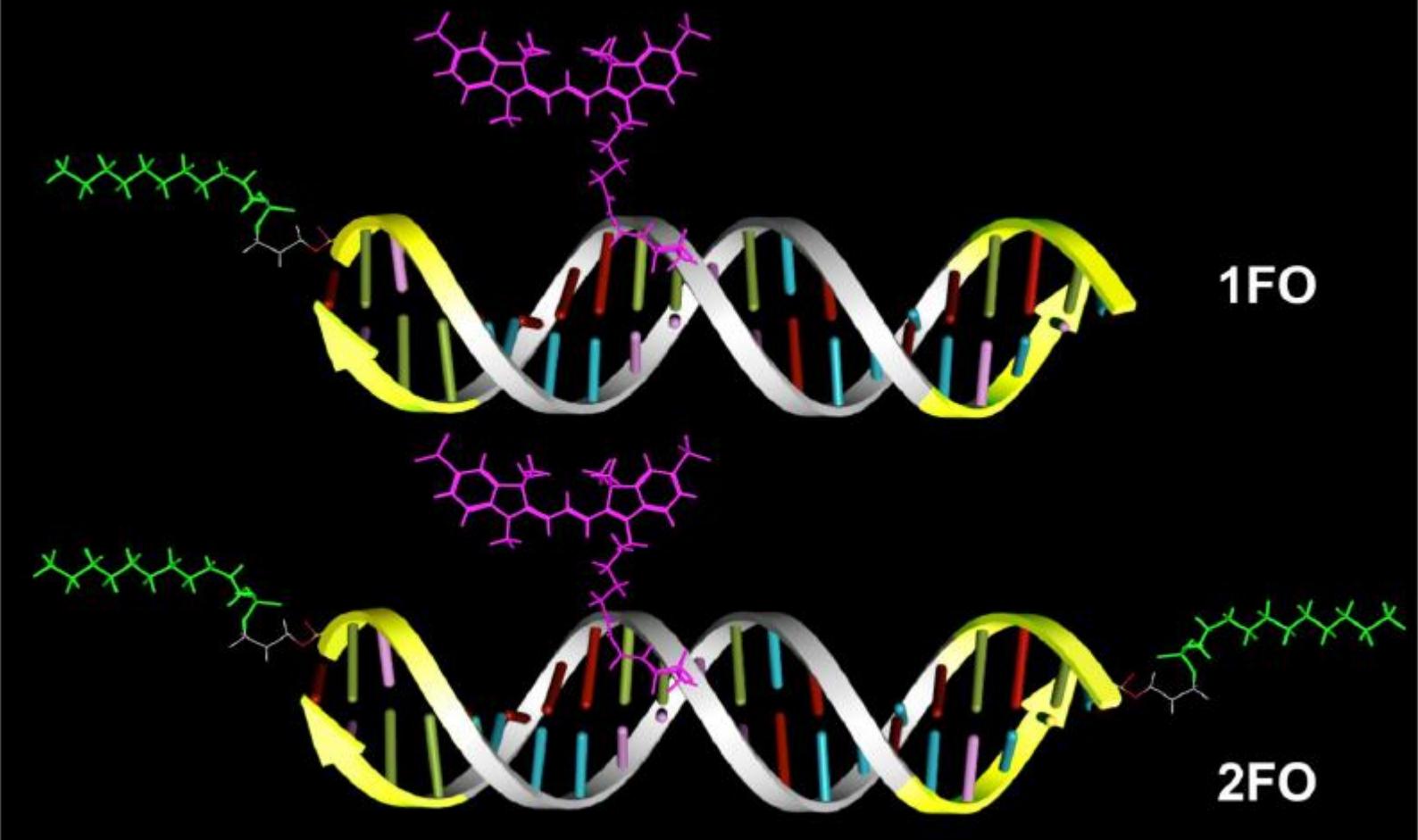


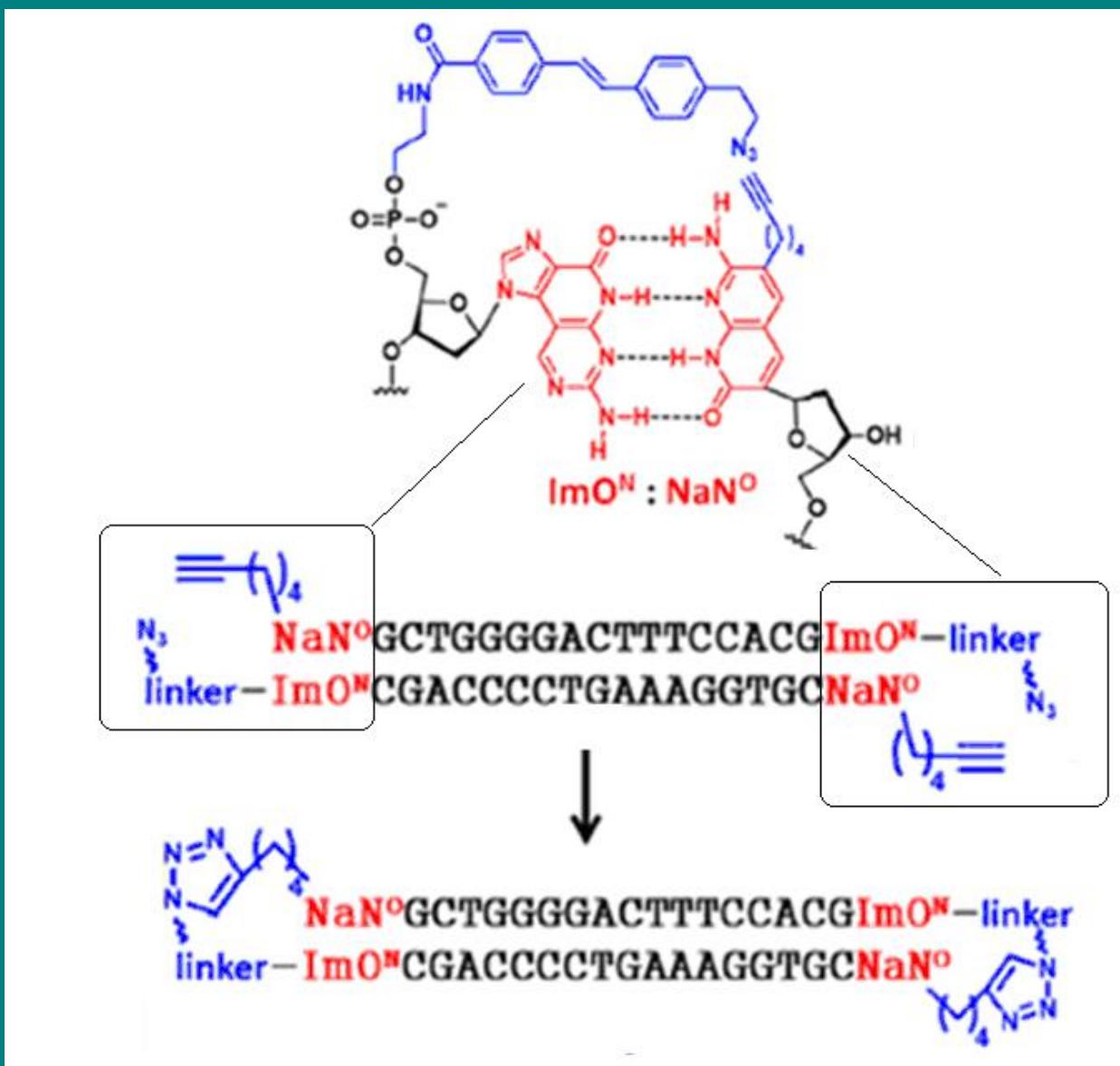
### Biotinylated Cyclic STAT3 Decoy

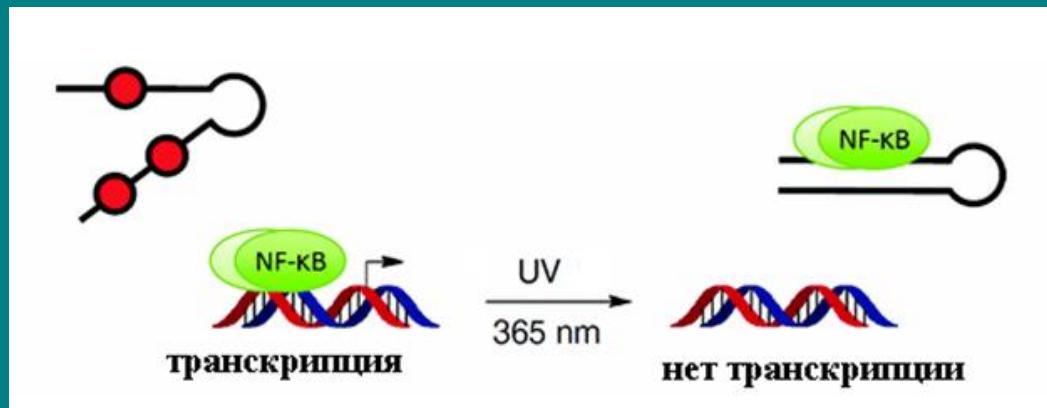
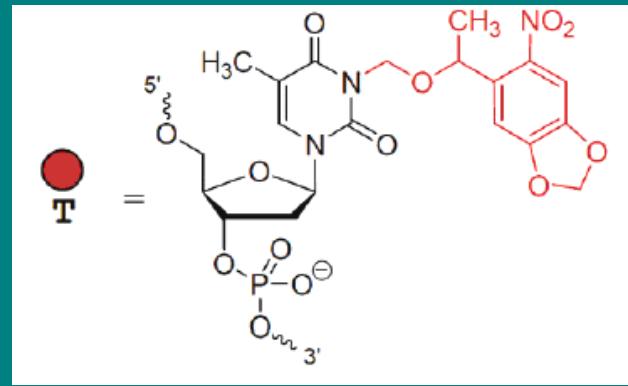


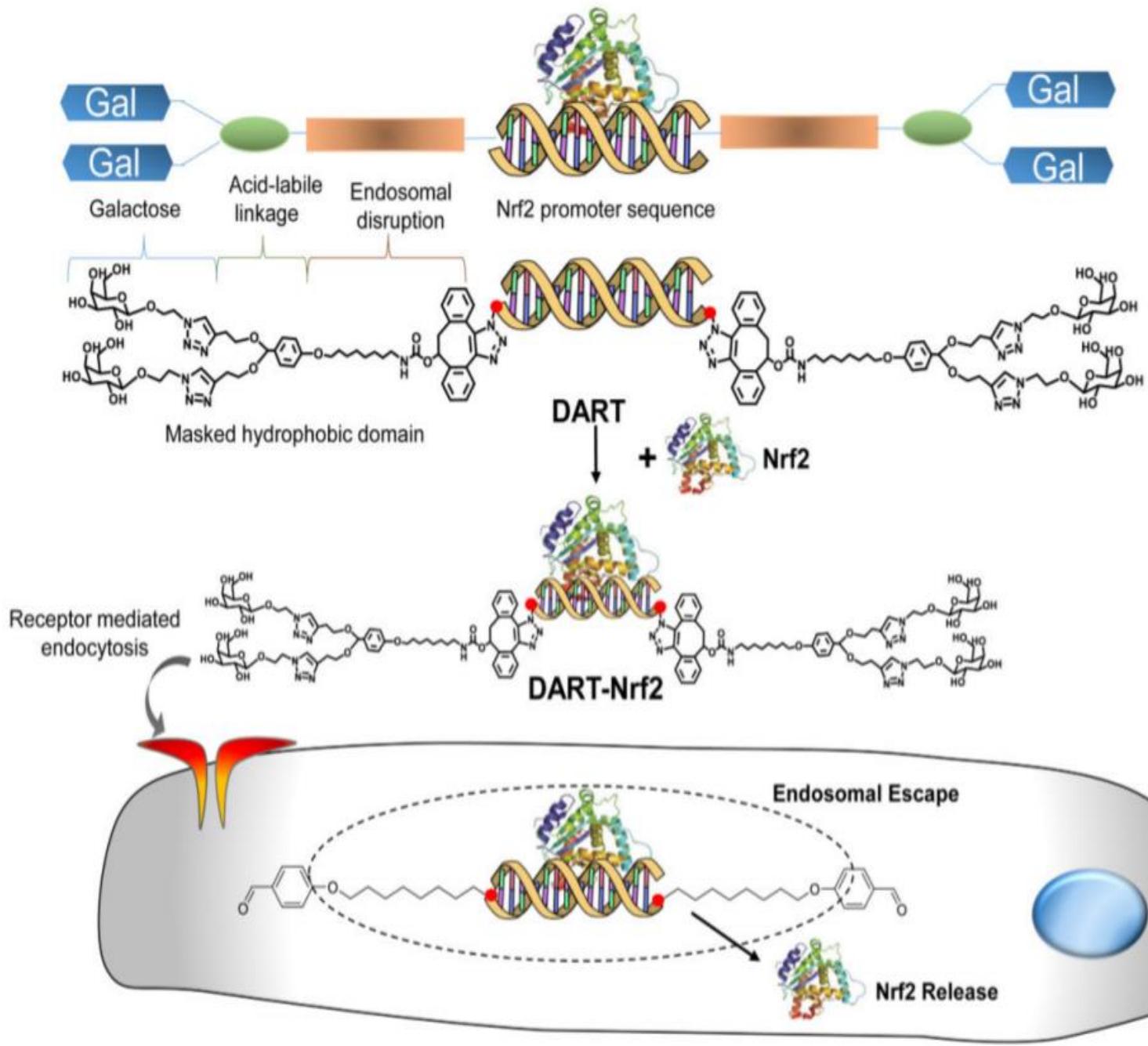
5' R<sub>1</sub>HN(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>pCATTTCGGTAAATC G  
3' R<sub>2</sub>HN(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>pGTAAAGGGCATTTAGA A











RESEARCH ARTICLE

# First-in-Human Trial of a STAT3 Decoy Oligonucleotide in Head and Neck Tumors: Implications for Cancer Therapy

Malabika Sen<sup>1</sup>, Sufi M. Thomas<sup>1</sup>, Seungwon Kim<sup>1</sup>, Joanne I. Yeh<sup>2,3</sup>, Robert L. Ferris<sup>1</sup>, Jonas T. Johnson<sup>1</sup>, Umamaheswar Duvvuri<sup>1</sup>, Jessica Lee<sup>1</sup>, Nivedita Sahu<sup>1</sup>, Sonali Joyce<sup>1</sup>, Maria L. Freilino<sup>1</sup>, Haibin Shi<sup>2</sup>, Changyou Li<sup>4</sup>, Danith Ly<sup>8</sup>, Srinivas Rapireddy<sup>8</sup>, Jonathan P. Etter<sup>9</sup>, Pui-Kai Li<sup>9</sup>, Lin Wang<sup>1</sup>, Simion Chiosea<sup>6</sup>, Raja R. Seethala<sup>6</sup>, William E. Gooding<sup>7</sup>, Xiaomin Chen<sup>10</sup>, Naftali Kaminski<sup>4</sup>, Kusum Pandit<sup>4</sup>, Daniel E. Johnson<sup>4,5</sup>, and Jennifer R. Grandis<sup>1,5</sup>



Morishita R. Япония   Grandis J.R. США   Fagard R. Франция



|     |    |     |
|-----|----|-----|
| 6.5 | 4  | 1.5 |
| 48  | 23 | 6   |

Clinical score (EASI)  
VAS score

Igawa K et al, *Bri J Dermatol*, 2009

**Fig. 5.** Clinical scores: The effects of topical application of STAT6 Decoy ointment for refractory facial erythema in patients with atopic dermatitis were assessed using procedures approved by the university ethics committee. Marked amelioration of the erythema and pruritus was observed after application of the ointment in patients with atopic dermatitis. Photographs show the clinical manifestations of a patient who showed a complete response.



July 12, 2016

AnGes MG, Inc.

**AnGes to Start Development of Next-Generation Decoy Oligonucleotide  
--Fundamental Technologies Established for  
STAT 6/NF-kB Chimera Decoy as a Treatment for Inflammatory Diseases--**

AnGes MG, Inc. ("AnGes") announced that, having achieved technical milestones related to fundamental technology, it will initiate the product development of Chimera Decoy, the next-generation nucleic-acid drug. AnGes's Chimera Decoy is an oligonucleotide that is designed to suppress inflammation by binding and inhibiting both STAT6 and NF-kB, two of the key transcription factors for inflammatory activities. This STAT6/NF-kB Chimera Decoy is expected to act more effectively compared to AnGes's first-generation Decoy Oligo as an inhibitor for a single transcription factor, NF-kB. Research and development of STAT6/NF-kB Chimera Decoy has been conducted in collaboration with Osaka University since 2012.

# **SMALL MOLECULAR DRUGS MIMICKING DNA DAMAGE (DBAIT): A NEW STRATEGY FOR SENSITIZING TUMORS TO RADIOTHERAPY**

**M. Quanz, N. Berthault, C. Roulin, M. Roy, A. Herbette, C.  
Agrario, C. Alberti, V. Josserand, J\_L. Coll, X. Sastre-  
Garau, J-M. Cosset, L. Larue, J-S Sun and M. Dutreix**

**bait [beɪt] сущ**

**приманка, наживка, прикормка**

**Dbait molecules****Sequences and chemical structures**

|                          |   |
|--------------------------|---|
| Dbait32H                 | 5' ACGCACGGGTGTTGGGTCGTTGTTGGATCT3'<br>3' TGC GTGCCACAACCCAGCAAACAAGCCTAGA5'  |
| Dbait32Hb                | 5' GCTAGGCTTGTGCTGGGTGTTAGGCACAGC3'<br>3' CGA TCCGAACAAACGACCCAACATCCGTGTCG5' |
| Dbait32Hc                | 5' GCTGTGCCACAACCCAGCAAACAAGCCTAGA3'<br>3' CGA CACGGGTGTTGGGTCGTTGTTGGATCT5'  |
| Dbait24H                 | 5' ACGCACGGGTGTTGGGTCGTTGT3'<br>3' TGC GTGCCACAACCCAGCAAACA5'                 |
| Dbait16H                 | 5' ACGCACGGGTGTTGGG3'<br>3' TGC GTGCCACAACCC5'                                |
| Dbait8H                  | 5' ACGCACGG3'<br>3' TGC GTGCC5'   |
| Dbait32ss                | 5' ACGCACGGGTGTTGGGTCGTTGTTGGATCT3'   |
| Dbait32C                 | 5' ACGCACGGGTGTTGGGTCGTTGTTGGATCT3'<br>3' TGC GTGCCACAACCCAGCAAACAAGCCTAGA5'  |
| Dbait32Hc-<br>Cy3 or Cy5 | 5' GCTGTGCCACAACCCAGCAAACAAGCCTAGA3'<br>3' CGA CACGGGTGTTGGGTCGTTGTTGGATCT5'  |

Cy3 or  
Cy5

**List of Dbait molecules.** Dbait molecules contain a hairpin loop formed by a hexaethylene glycol linker [ $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_6$ ] tethering two complementary DNA strands.

[https://www.youtube.com  
/watch?v=P76XpD-Ylx4](https://www.youtube.com/watch?v=P76XpD-Ylx4)

<https://www.youtube.com/watch?v=t4-ICmbWO0g>

**TRANSCRIPTIONAL FACTORS: Gene regulation and the role of oestrogen explained**

<https://www.youtube.com/watch?v=gdpQwNxQpA>

**Composite Transcription Factor Decoys**

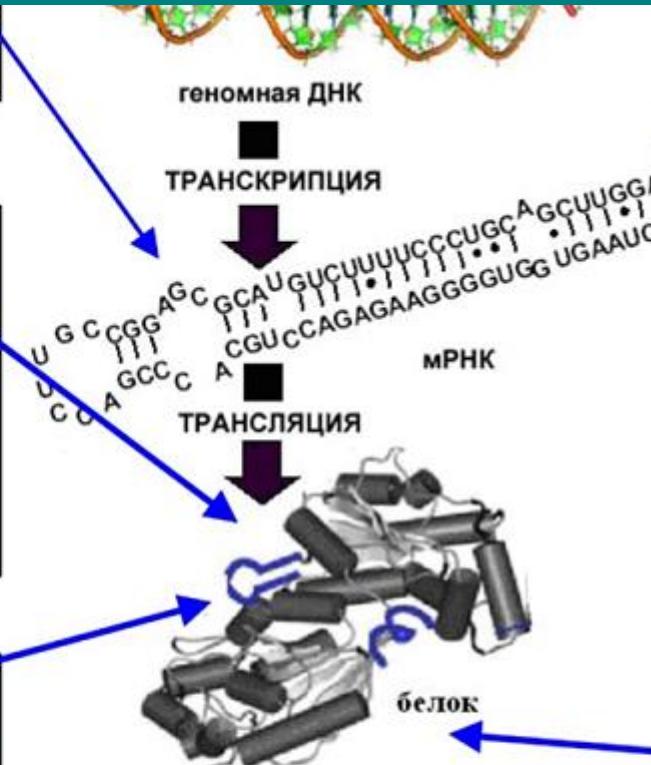
Механизм - деградация целевой мРНК

### Иммуностимулирующие олигонуклеотиды

Мишень – толл-подобный рецептор 9 (TLR9)  
Олигонуклеотид – односпиральная ДНК с  
неметилированными CpG участками  
Механизм: активация TLR9 приводит к  
клеточному иммунному ответу

### "Ловушки" -decoys

Мишень – фактор транскрипции  
Олигонуклеотид - двуспиральная ДНК,  
содержащая участок узнавания  
соответствующего фактора транскрипции  
Механизм - конкурентное связывание  
фактора транскрипции с ловушкой, а не с  
геномной ДНК

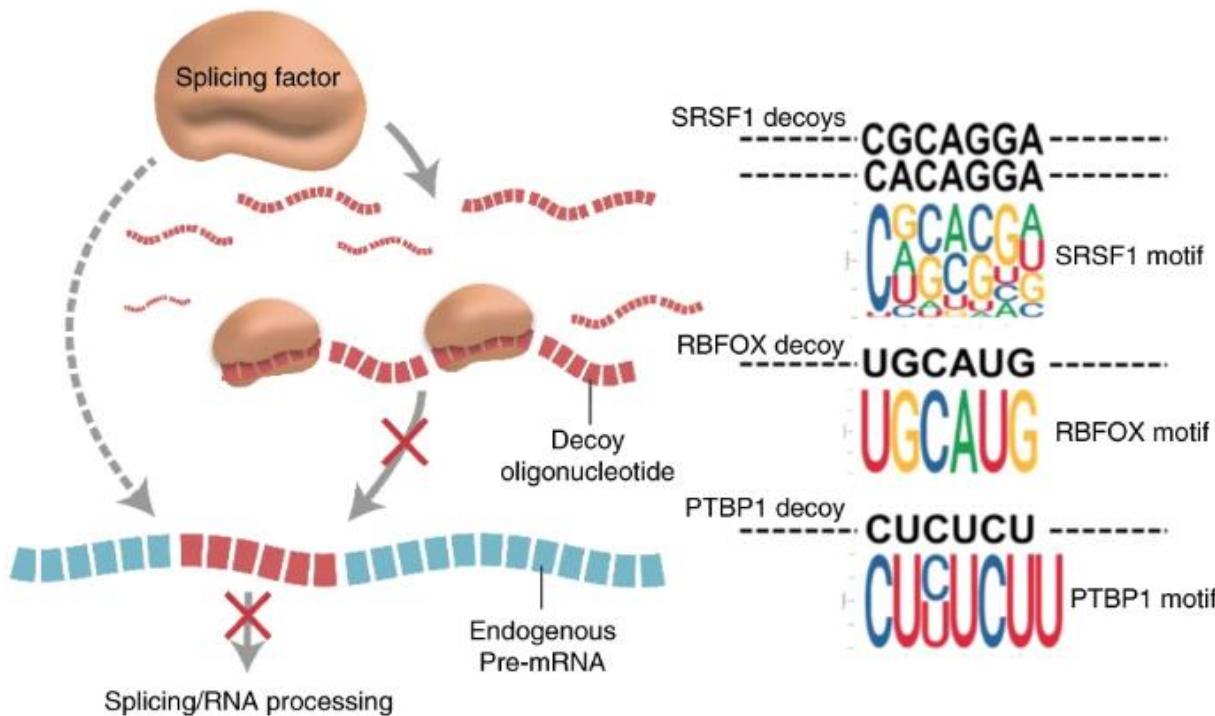


**Transcription factor decoy technology: A therapeutic update. Hecker M, Wagner AH**

**Biochem Pharmacol. 2017 Nov 15;144:29-34**

**Transcription factors: Time to deliver A.V. Ulasov,  
A. A. Rosenkranz, A.S. Sobolev Journal of Controlled  
Release, Volume 269, 2018, pp. 24-35**

## Specific inhibition of splicing factor activity by decoy RNA oligonucleotides



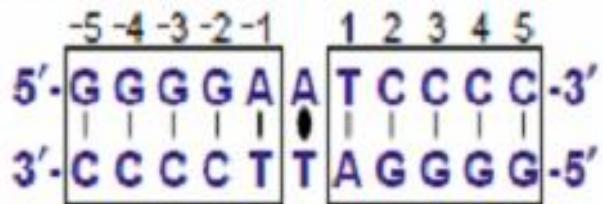
Широко известны другие олигонуклеотиды и их производные, способные специфически связывать свои мишени. Их также можно рассматривать как «ловушки» по производимому эффекту. Эти соединения называются аптамерами или иногда химическими антителами.

В основном, это односпиральные РНК или ДНК, которые (например, в применении к NF-кВ) не содержат консенсусный участок узнавания (кВ-участок), но настолько хорошо «имитируют» пространственную структуру этого участка, что мишень эффективно связывается с аптамером.

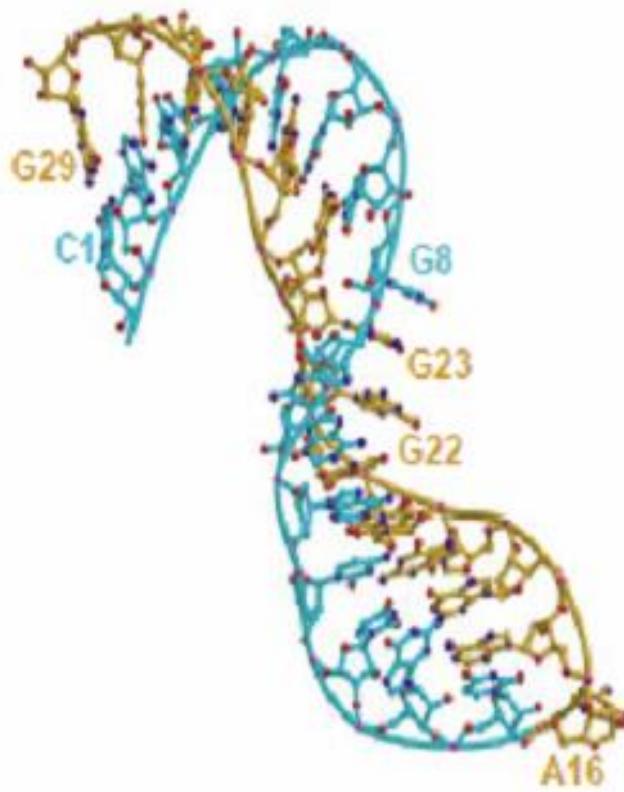
# АПТАМЕРЫ

Слово аптамер (aptamer) произошло от латинского слова “*aptus*”, означающего пригонка; прилаживание; примерка и греческого слова “*teros*” – частица, крупица

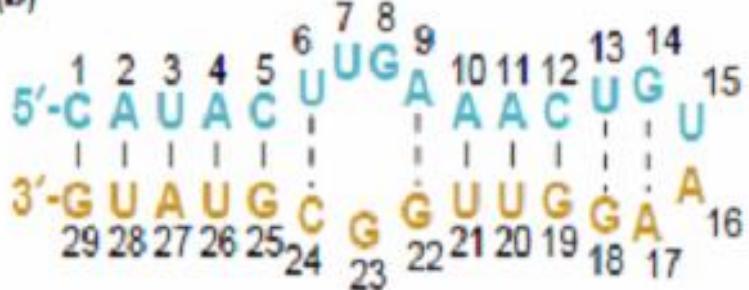
(a)



(c)

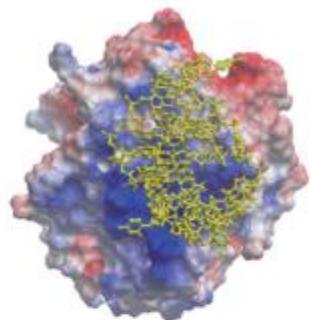


(b)

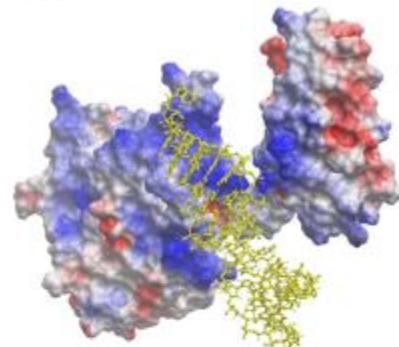


### Overall structure of known aptamer-protein complexes

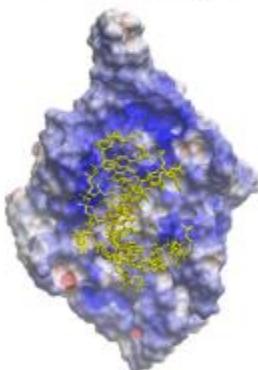
Aptamer-thrombin complex



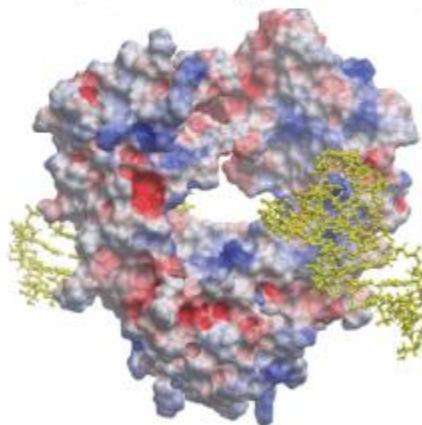
Aptamer-nuclear factor- $\kappa$ B complex



Aptamer-MS2 coat protein complex



Aptamer-Fc region of human IgG1 (hFc1)

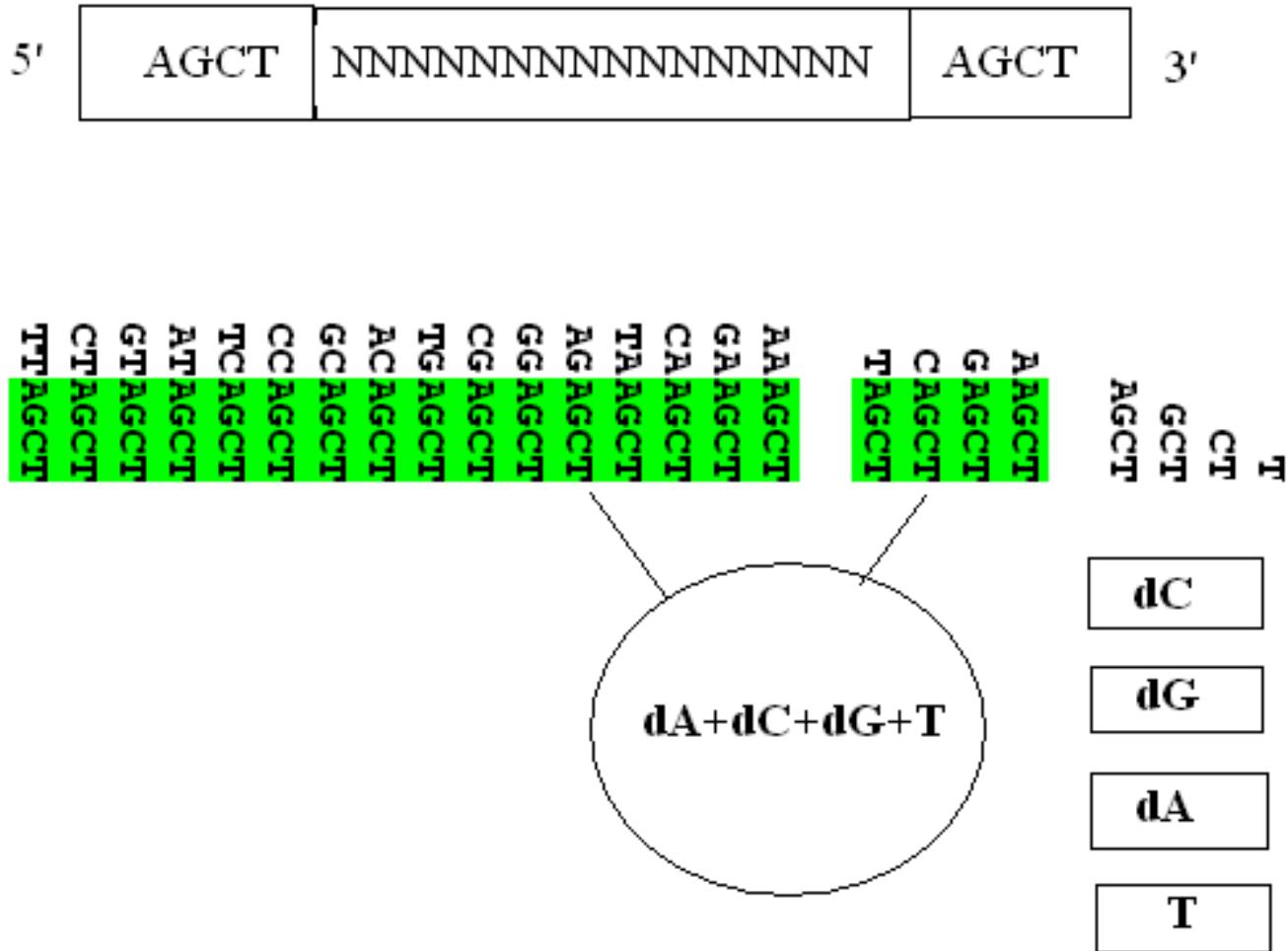


The RNA aptamer is represented by a yellow ball-and-stick model.

Blue areas: positively charged; red areas: negatively charged.

# SELEX

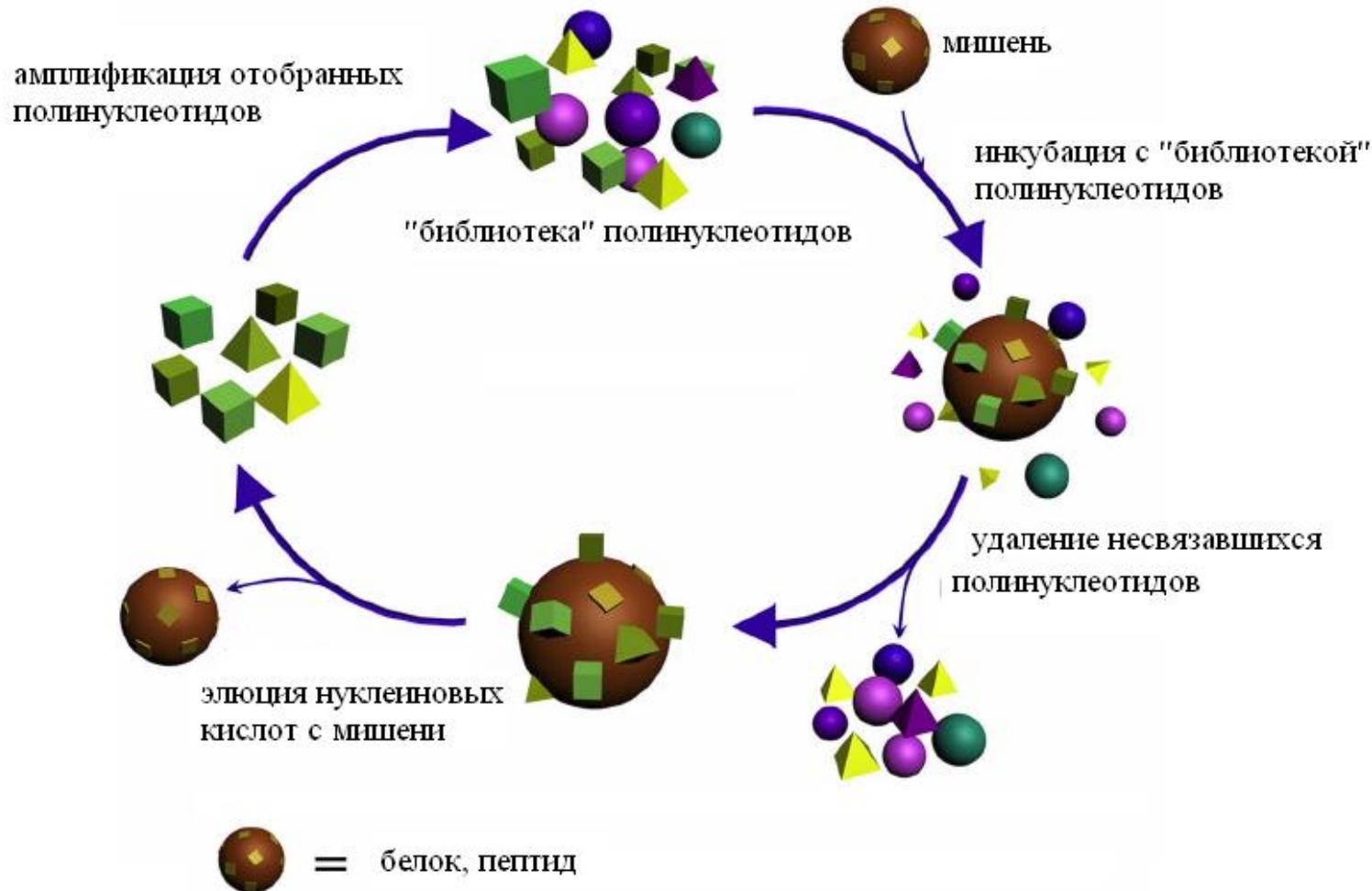
- systematic evolution of ligands by exponential enrichment –
- систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением.

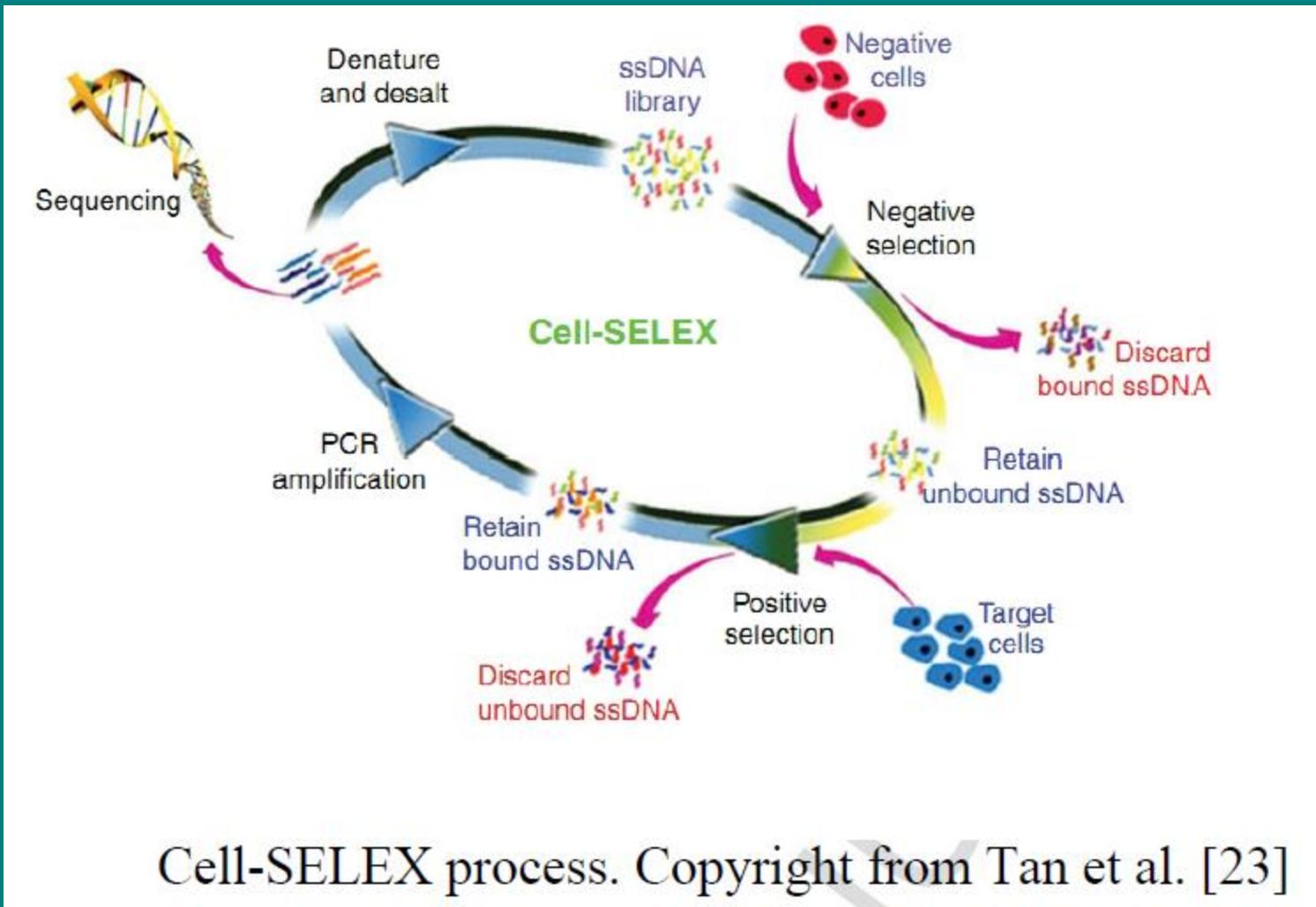


# Мишени аптамера

- ионы металлов (Kawakami *et al.*, 2000),
- 
- небольшие органические соединения (Mann *et al.*, 2005),
- 
- биологические кофакторы (Lauhon and Szostak, 1995; Holland *et al.*, 2000),
- 
- метаболиты (Bruno *et al.*, 2008),
- белки (Ruckman *et al.*, 1998; White *et al.*, 2001; Savla *et al.*, 2011)
- целые организмы такие как вирусы (Tang *et al.*, 2009),
- 
- бактерии (Hamula *et al.*, 2011),
- 
- дрожжи (Kolesnikova *et al.*, 2010),
- клетки млекопитающих (Chen *et al.*, 2009).

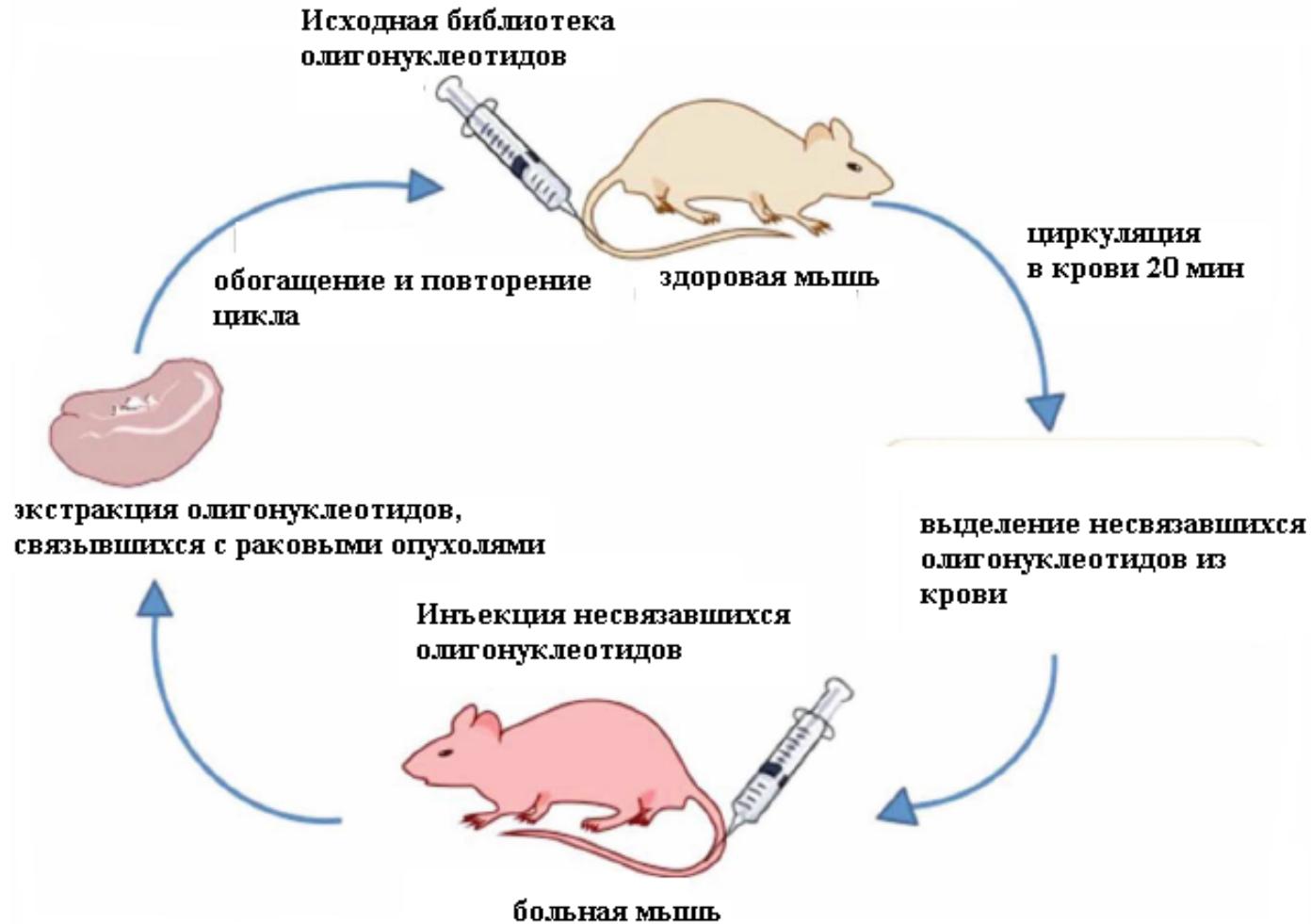
# Один раунд SELEX

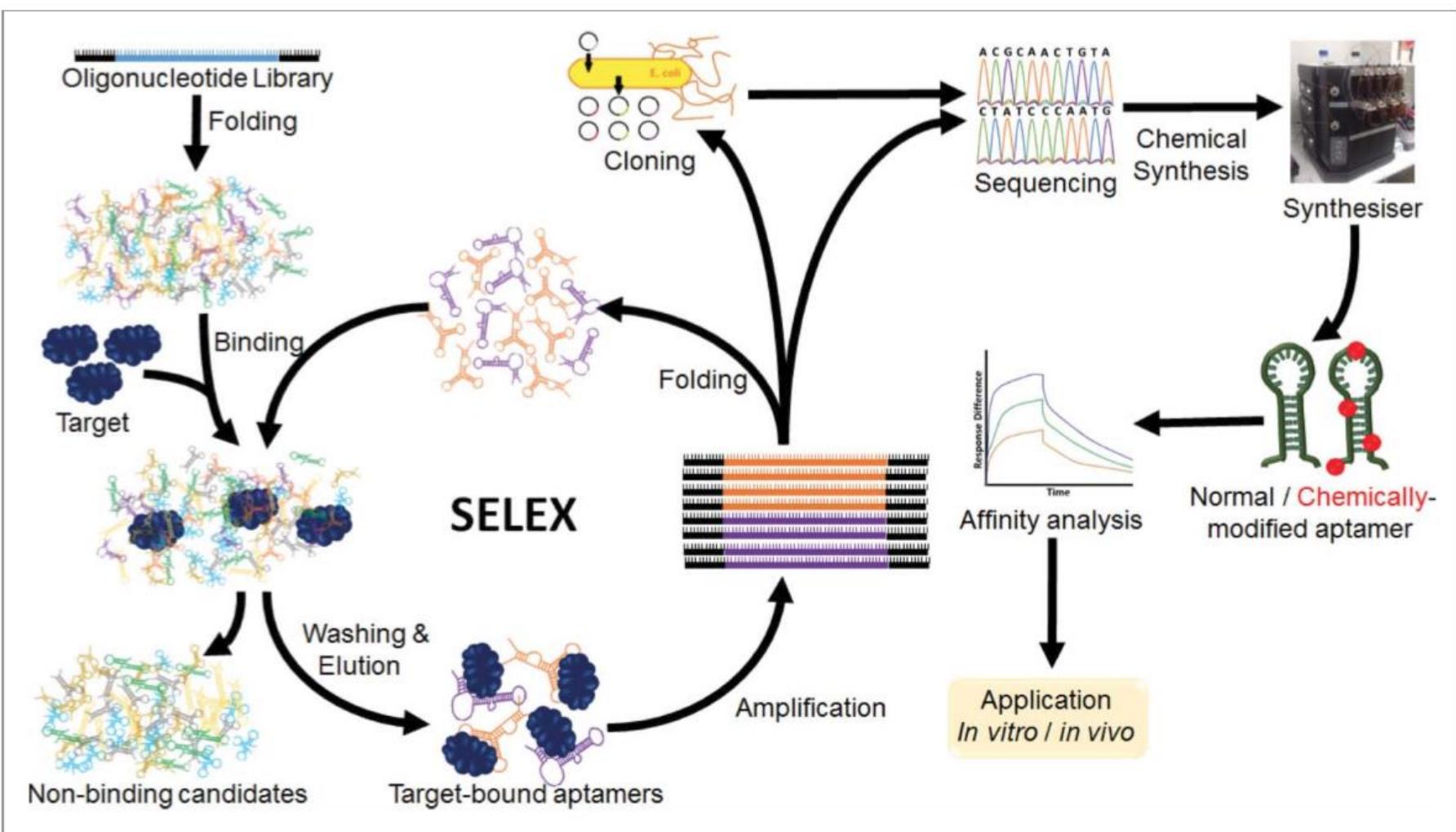




Cell-SELEX process. Copyright from Tan et al. [23]

## *Принципы отбора антамеров in vivo*





Schematic illustration of the SELEX and post-SELEX methods for developing aptamers.

Большинство описанных аптамеров на белки имеют общий механизм действия:

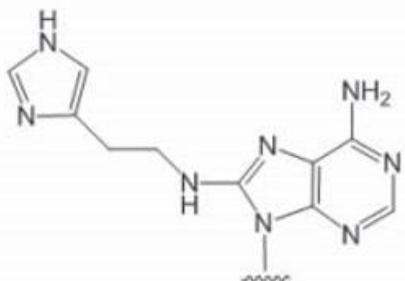
аптамер, имеющий высокое сродство к целевому белку, прочно связывается с ним и тем самым блокирует его взаимодействие с другим эндогенным белком или нуклеиновой кислотой, т.е. разрушает целевые белок-белковые или белок-НК взаимодействия как конкурентный ингибитор.

## **Уникальная особенность аптамеров**

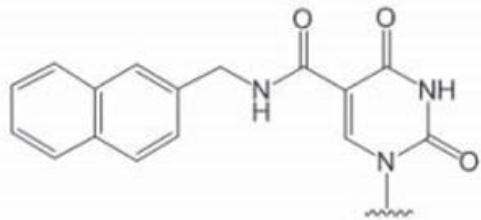
**возможность «отмены» ингибиторных  
свойств с помощью комплементарных  
олигонуклеотидов**

**Аптамер как антидот на лекарство**

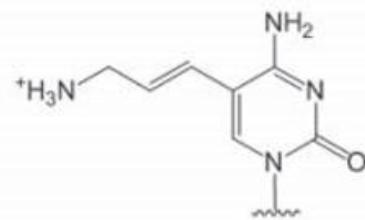
К настоящему времени получены аптамеры к тысячам мишней. Например, только компания SomaLogic ([http://www.somalogic.com/  
Technology.aspx](http://www.somalogic.com/Technology.aspx)) создала тысячи одноцепочечных ДНК-аптамеров (известных как SOMAmers) для более чем 1100 мишней (рецепторы, киназы, факторы роста, гормоны).



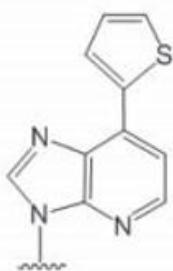
5-Imidazolyl Deoxyadenosine



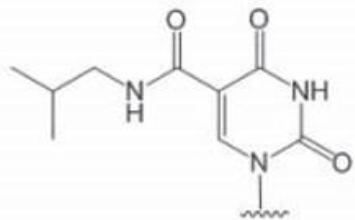
5-(2-Naphthylmethylaminocarbonyl) Deoxyuridine



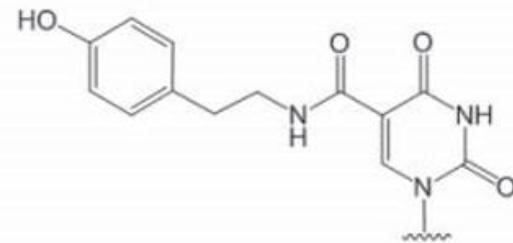
5-Aminoallyl Deoxycytidine



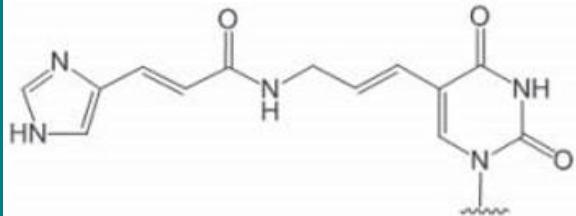
7-(2-Thienyl) Imidazo [4,5-b] Pyridine



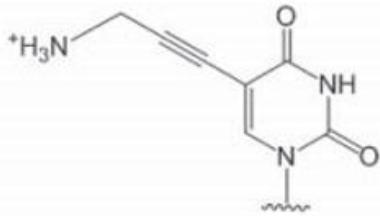
5-Isobutylaminocarbonyl Deoxyuridine



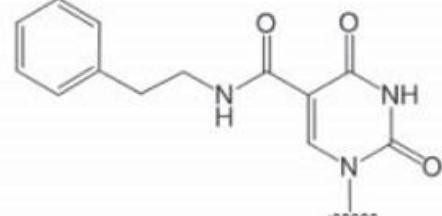
5-Tyrosyl Deoxyuridine



5-Imidazole Deoxyuridine Analogue

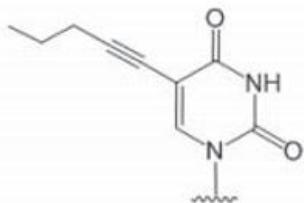


5-(3''Aminopropynyl)-2'-Deoxyuridine

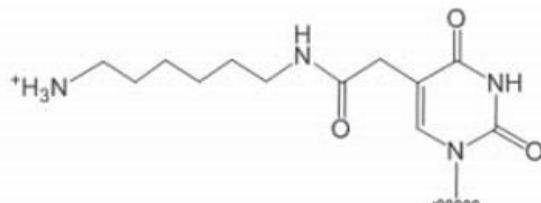


5-Phenylethyl Deoxyuridine

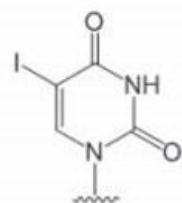
Structures of various base-modified nucleotides used in aptamer selection by SELEX methodologies.



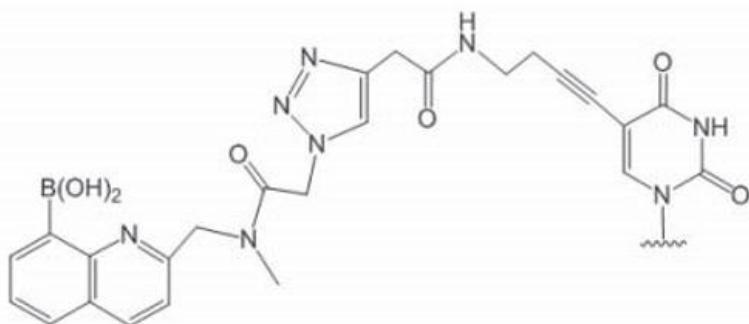
5-(1-Pentynyl)-2'-Deoxyuridine



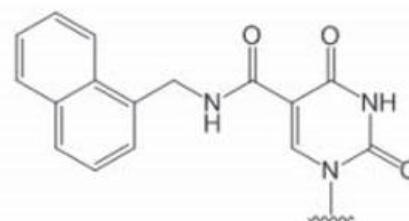
5-N-(6-Aminohexyl) Carbamoylmethyl Deoxyuridine



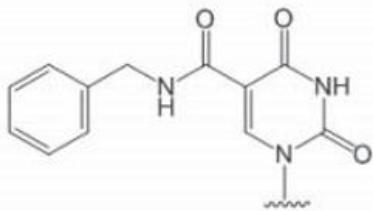
5-Iodo Uridine



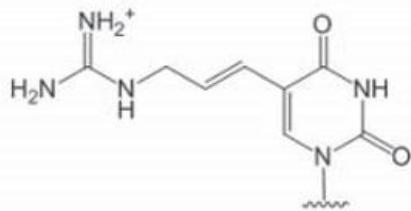
5-Boronic acid moiety-modified Thymidine



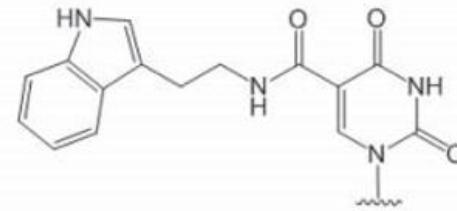
5-Naphthylmethylaminocarbonyl Deoxyuridine



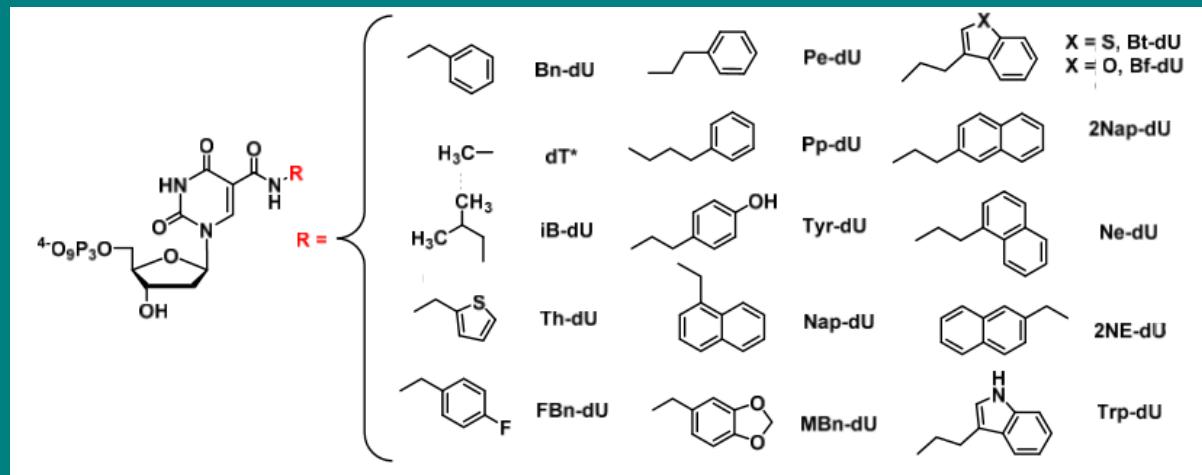
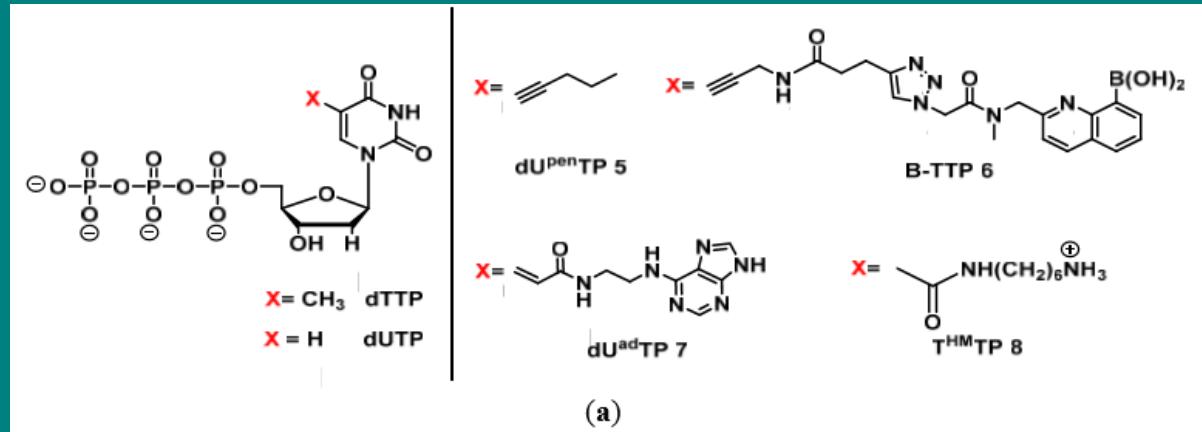
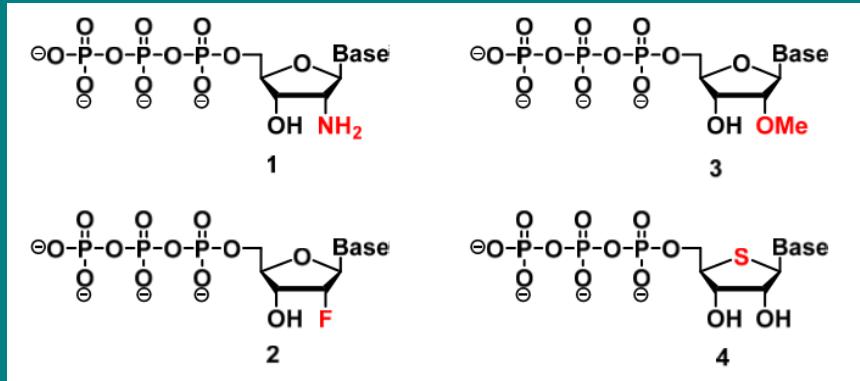
5-Benzylaminocarbonyl Deoxyuridine

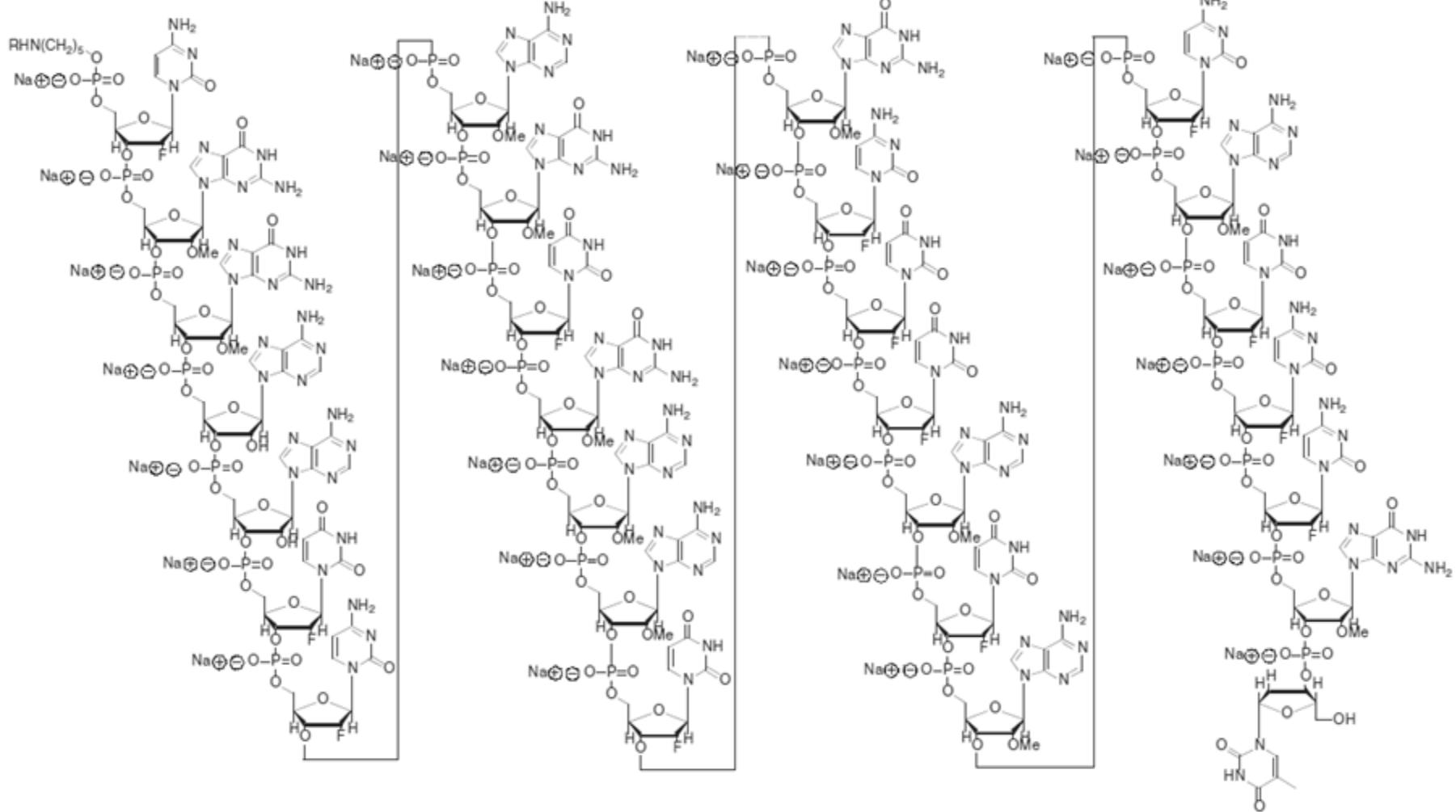


5-Guanidinoallyl Deoxyuridine



5-Tryptaminocarbonyl Deoxyuridine





Разрешен к использованию Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США в 2004 г. для подавления возрастной макулодегенерации

Пегаптаниб (Macugen®/Макуген, «Pfizer») –  
Outside the US pegaptanib is marketed by Pfizer.  
Approval was granted by the U.S. Food and Drug  
Administration (FDA) in December 2004.

28-ми звенный аптомер, в составе которого  
находятся 2'-фтор-2'-дезоксириимидиновые и  
2'-О-метиловые пуриновые нуклеозиды, 5'-  
концевой полиэтиленгликолевый линкер (~40  
кДа) и 3', 3-концевая межнуклеотидная связь

Formula C<sub>294</sub>H<sub>342</sub>F<sub>13</sub>N<sub>107</sub>Na<sub>28</sub>O<sub>188</sub>P<sub>28</sub>[C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O]<sub>n</sub>

(где n около 900)      Mol. Mass      50 kD

**НОВЫЕ ЛЕКАРСТВА**

**АНАЛИТИЧЕСКИЕ  
РЕАГЕНТЫ**

**ДОСТАВКА  
ЛЕКАРСТВ**

**ПИЩЕВОЙ  
САНИТАРНЫЙ  
КОНТРОЛЬ**

**ДИАГНОСТИКА**

**АПТАМЕРЫ**

**ВИЗУАЛИЗАЦИЯ**

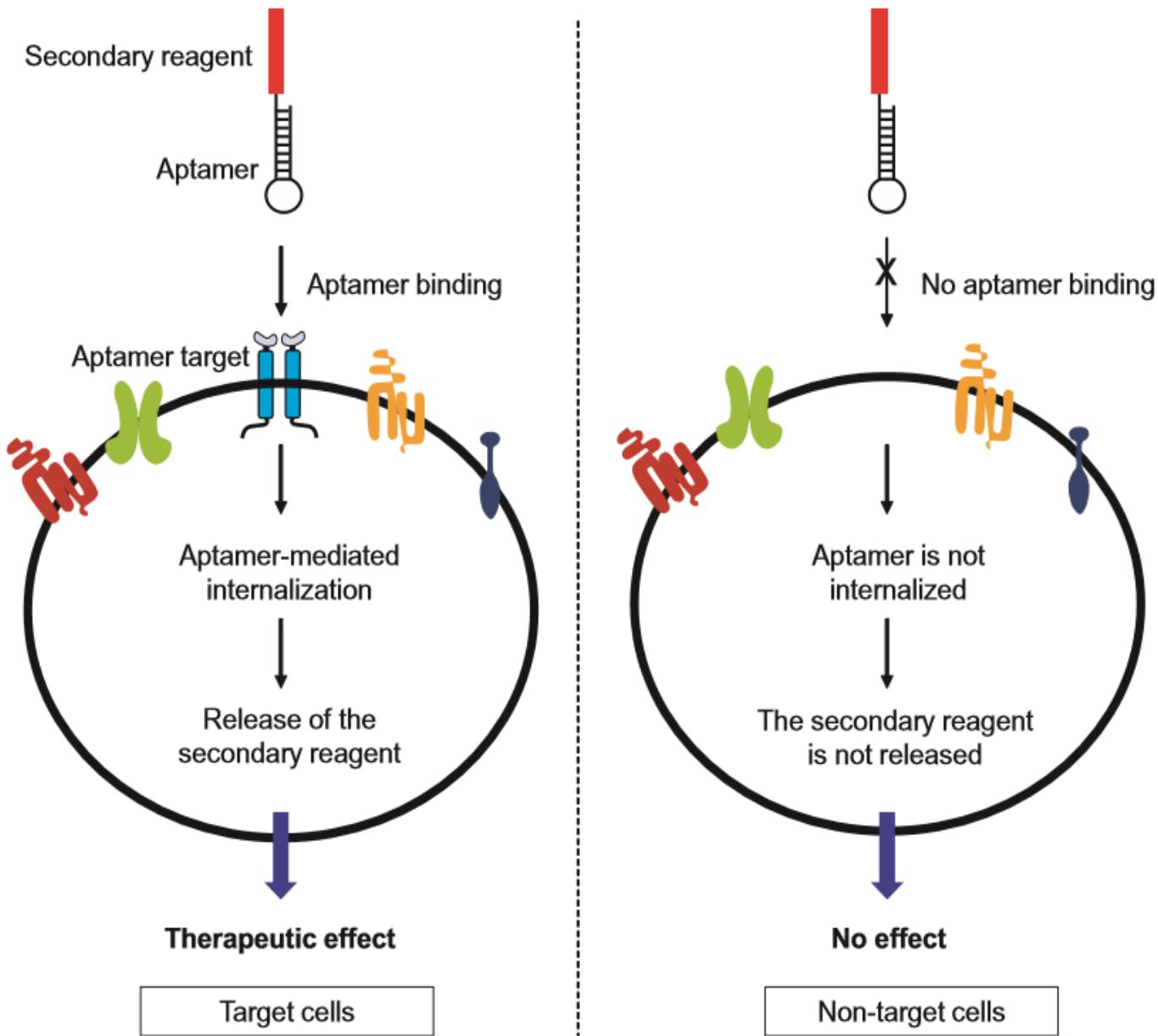


## Examples of nucleic acid aptamers to targets of therapeutic interest

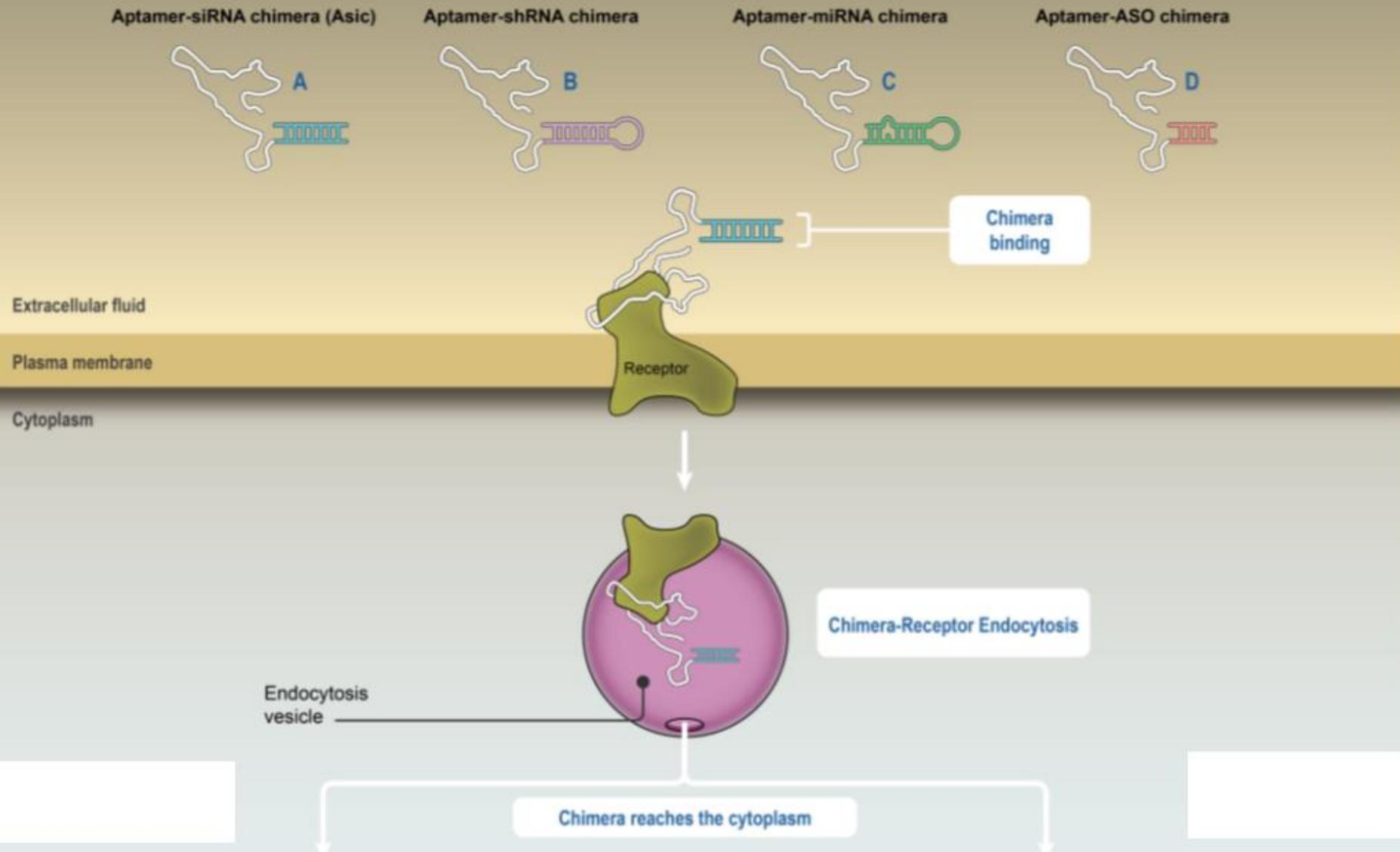
|    | <b>Aptamers</b> | <b>Molecular targets</b>             | <b>Associated diseases</b>       | <b>Refs</b> |
|----|-----------------|--------------------------------------|----------------------------------|-------------|
| 1  | Macugen         | Vascular endothelial growth factor   | Age-related macular degeneration | 39          |
| 2  | AS1411          | Nucleolin                            | Cancer                           | 40          |
| 3  | sgc8            | Protein tyrosine Kinase 7            | Cancer                           | 41          |
| 4  | TD05            | Immunoglobulin μ Heavy Chains (IGHM) | Lymphoma                         | 42          |
| 5  | A20             | Prostate-specific membrane antigen   | Cancer                           | 43          |
| 6  | TTA1            | Tenascin C                           | Cancer                           | 6           |
| 7  | S1.3/S2.2       | Mucin 1                              | Cancer                           | 44          |
| 8  | IGEL1.2         | Immunoglobulin E                     | Allergy                          | 45          |
| 9  | Apt-αvβ3        | αvβ3 integrin                        | Cancer                           | 46          |
| 10 | TBA             | α-thrombin                           | Thrombosis                       | 8           |
| 11 | B28             | HIV gp120                            | Viral infection                  | 11          |
| 12 |                 | NF-κB                                | Cancer                           | 47          |
| 13 | E2F-E1          | E2F transcription factor             | Cancer                           | 48–49       |
| 14 | A30             | HER3                                 | Cancer                           | 10          |
| 15 | WT-15           | Plasminogen activator inhibitor 1    | Tumor metastasis                 | 50          |

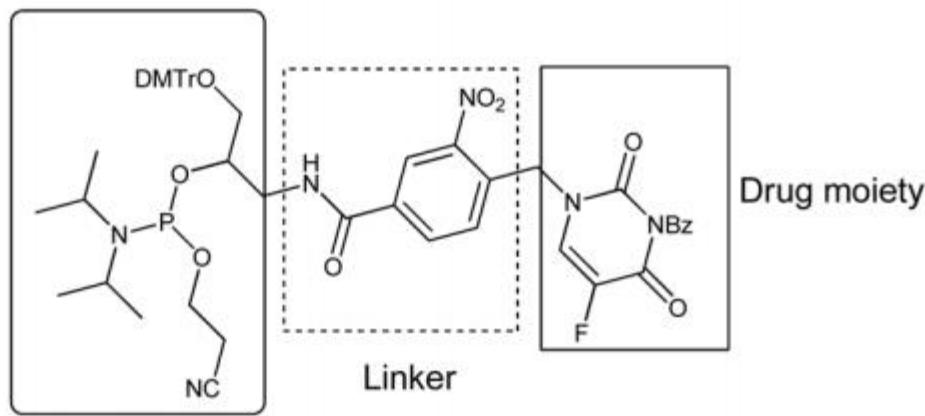
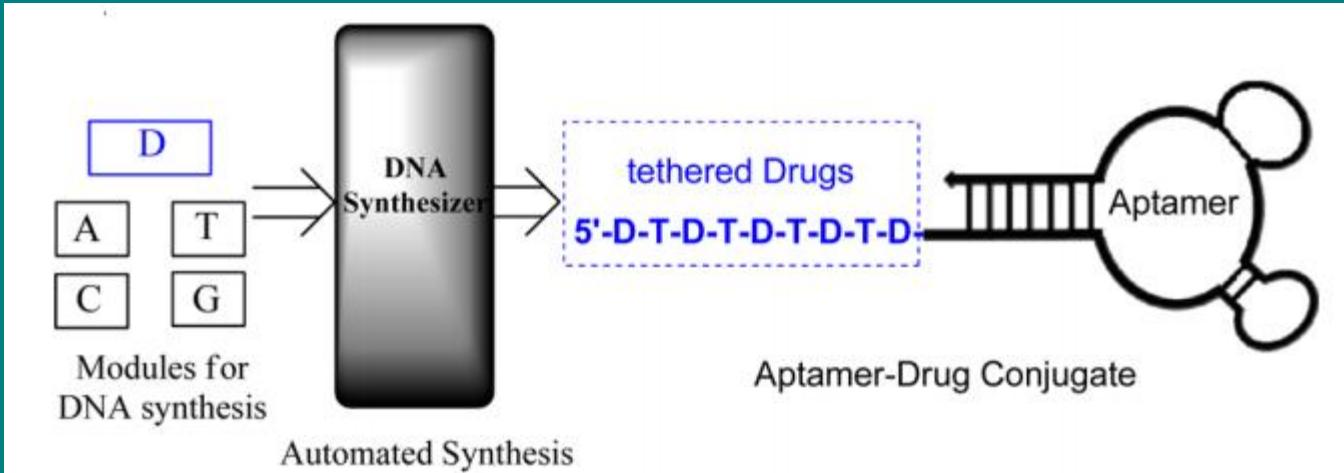
## Перспективы использования аптамеров

Особый интерес могут представить аптамеры, способные связываться с белками на поверхности клетки и тем самым блокировать эти клеточные рецепторы, а также для доставки различных терапевтических реагентов в клетки.

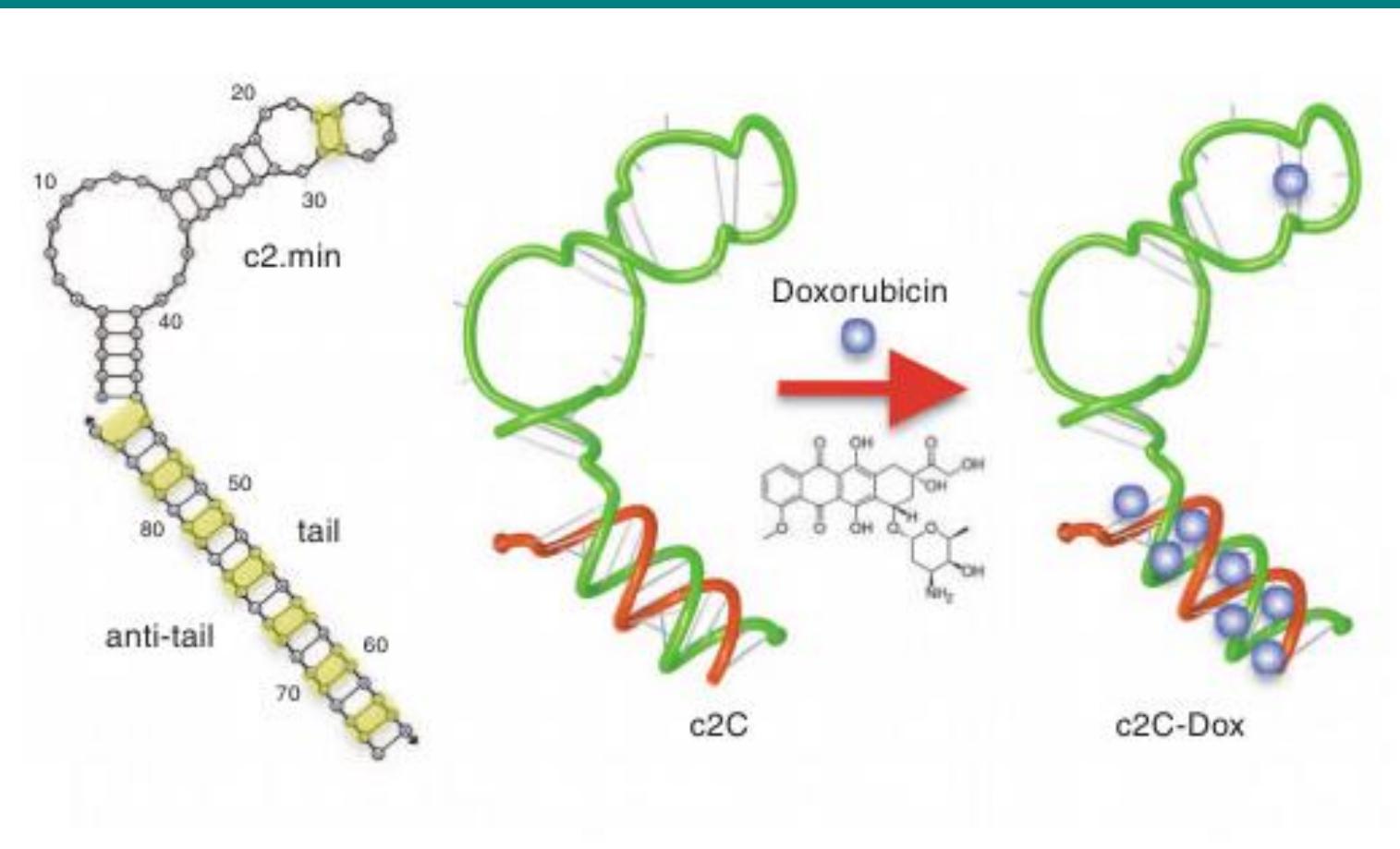


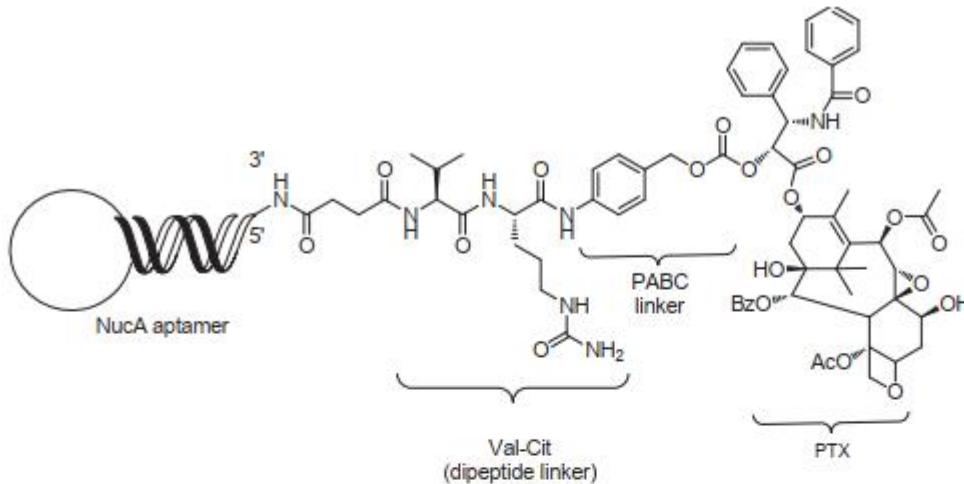
## DIFFERENT TYPES OF APTAMER-IRNA CHIMERAS



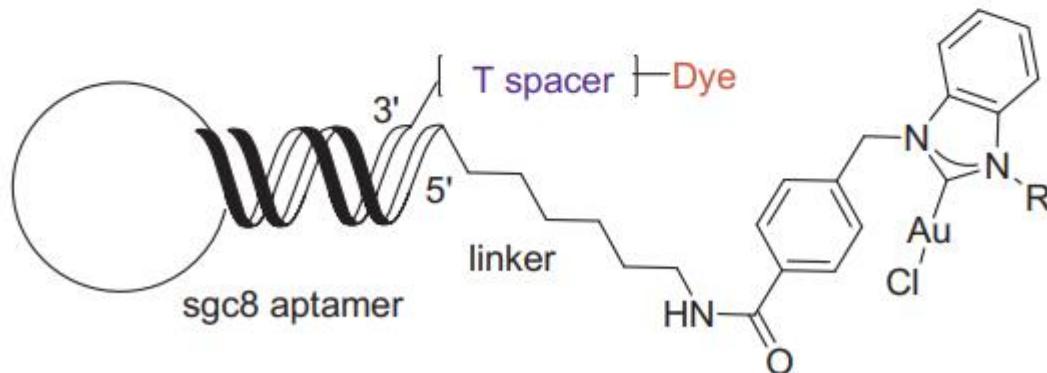


Molecular Structure of Phosphoramidite D

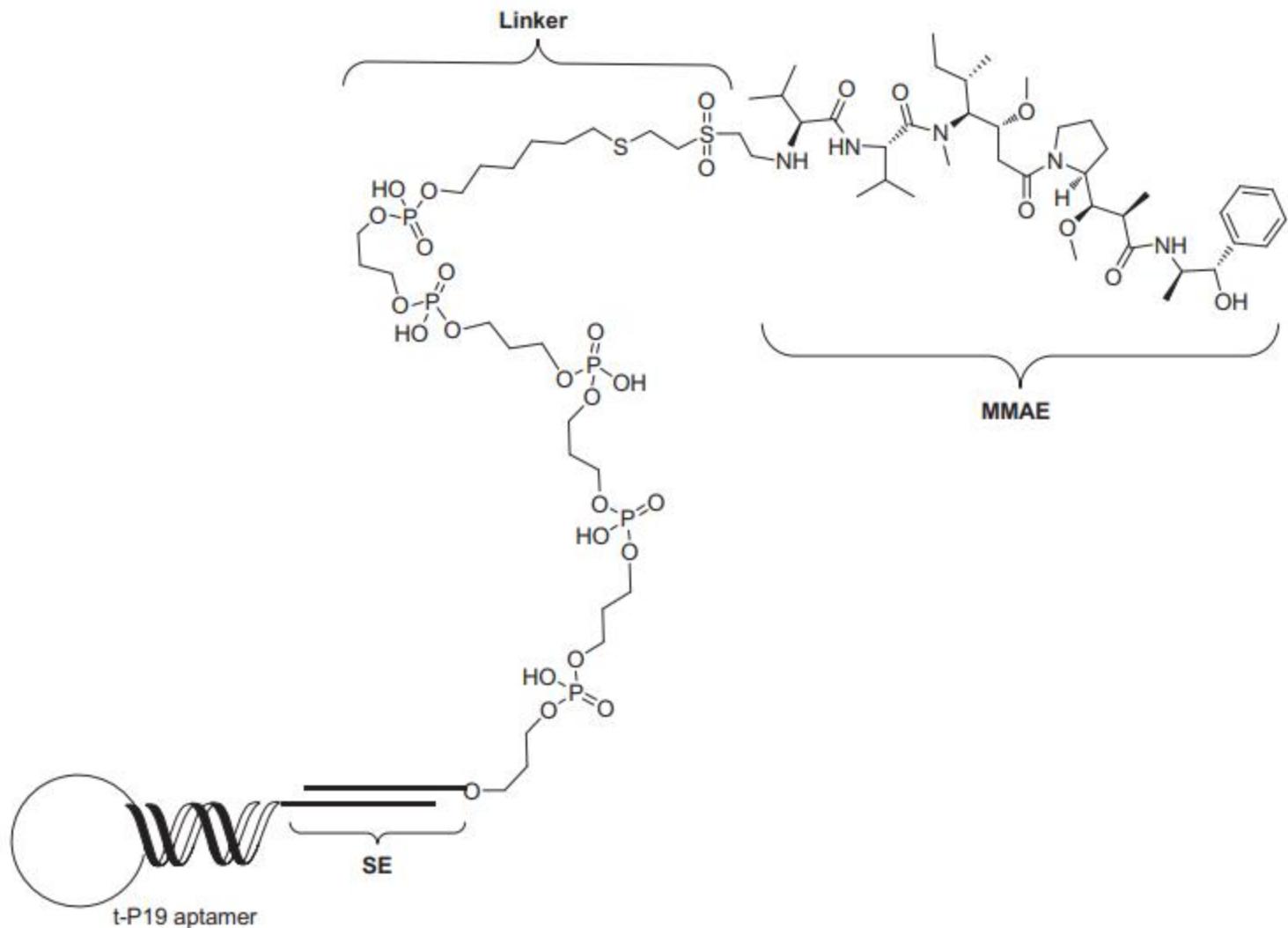




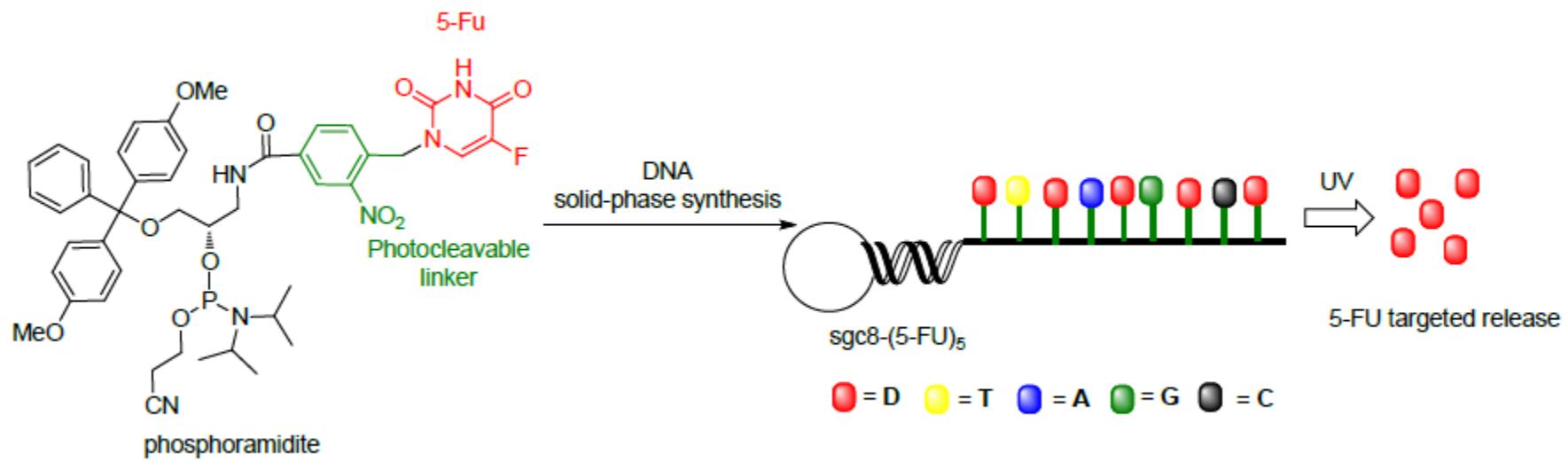
Cathepsin B-sensitive dipeptide bond-linked nucleolin aptamer-paclitaxel (PTX) conjugate.

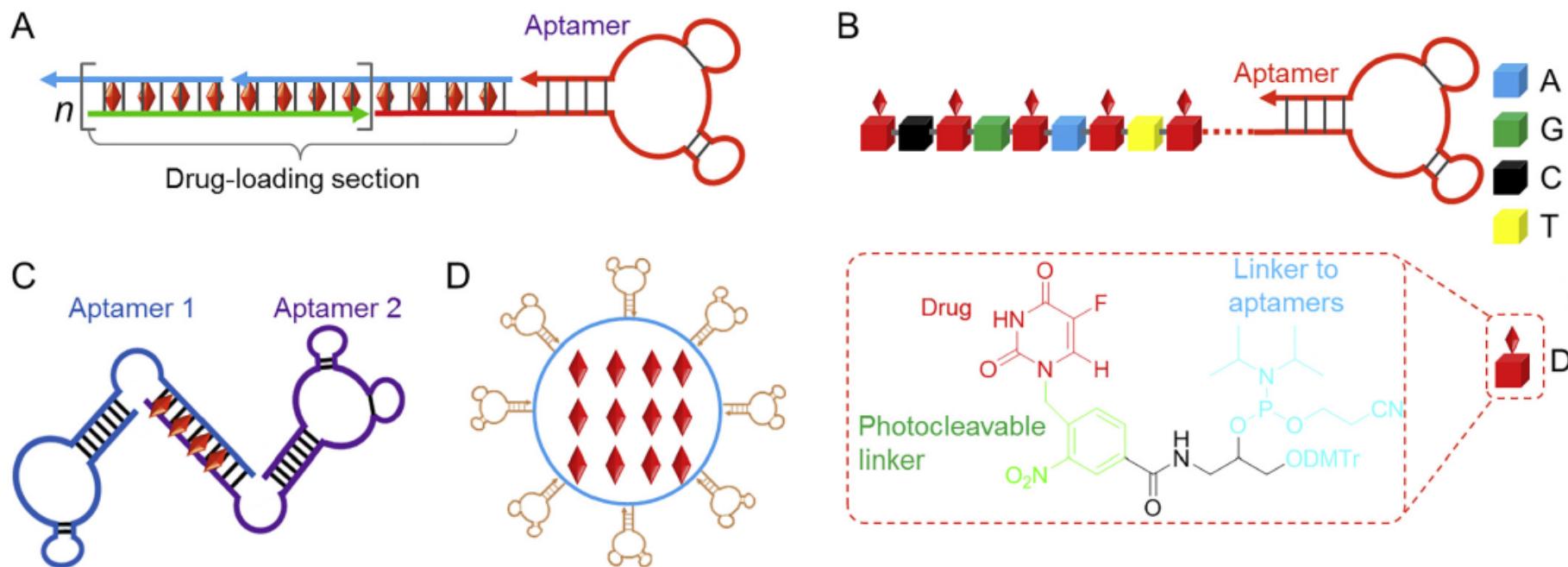


Design of the Aptamer-NHC-Au<sup>I</sup> conjugate.



Schematic representation illustrating chemical conjugation of MMAE to tP19 through DNA strand hybridization.  
W. Xuan et al. Biomaterials 182 (2018) 216–226

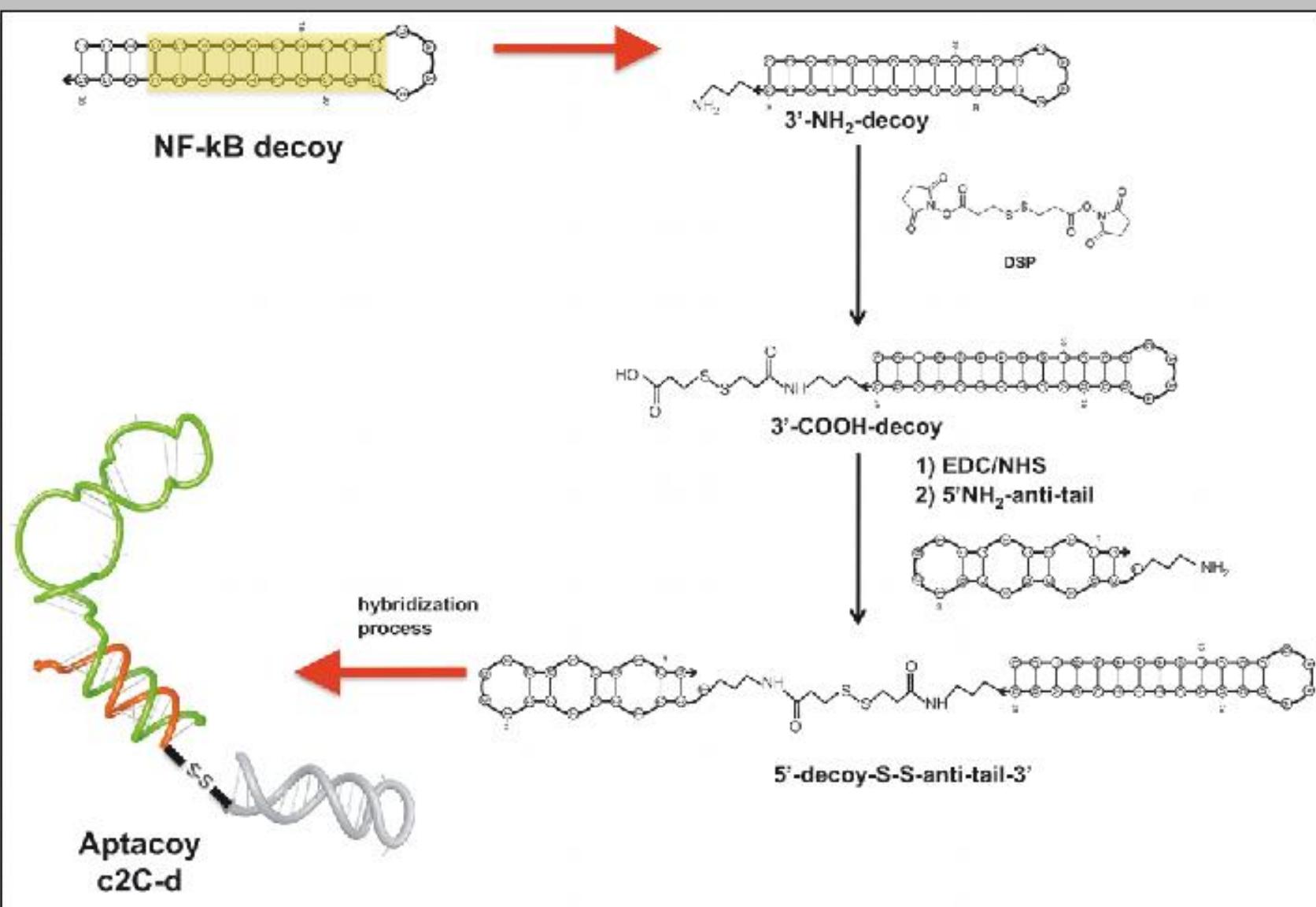




**Fig. 3.** ApDCs for chemotherapy. (A) Via noncovalent complexation of aptamer-tethered nanotrails and drugs, an ApDC was developed to deliver a large payload of DNA-intercalating drugs into target tumor cells. (B) An example of ApDCs that was programmably synthesized using a phosphoramidite that carried a 5-FU prodrug via a photocleavable linker (inset: molecular structure of a prodrug-incorporating phosphoramidite). (C) As a mimic of bispecific antibody, a bi-specific ApDC was developed by simply linking two independent aptamers via a dsDNA linker, which was additionally harnessed for drug loading in bi-specific drug delivery. (D) A schematic representation of aptamer-functionalized nanocarriers for targeted drug delivery.

Aptamer + decoy =

aptacoy



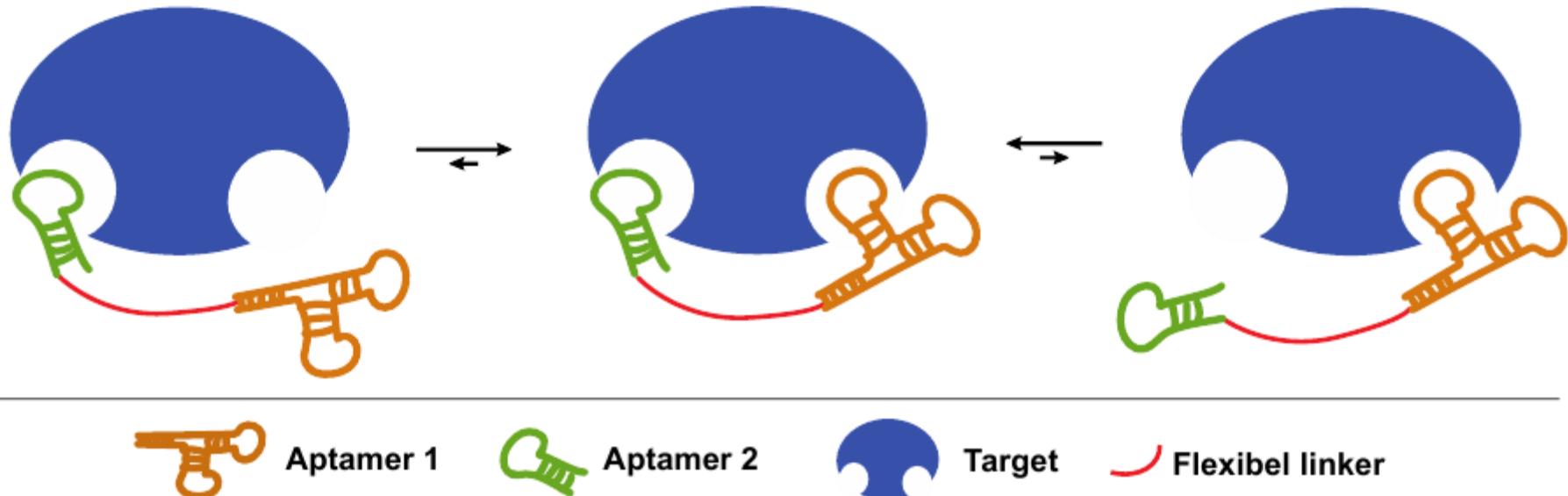


### Антисенсовые олигонуклеотиды

Мишень - индивидуальная мРНК  
 Олигонуклеотид - односпиральная ДНК  
 Механизм: образование гетеродуплекса  
 мишени с олигонуклеотидом, приводящее к  
 блокированию трансляции за счет гидролиза  
 РНК РНКазой Н или механически

### Аптамеры

Мишень - белки, рецепторы  
 Олигонуклеотид - односпиральные РНК или  
 ДНК  
 Механизм - высокоспецифичное связывание  
 аптамера с мишенью



Principle of avidity explained for a bivalent aptamer towards a multimeric target.  
The dimeric aptamer construct consists of two aptamers conjugated by a flexible linker.

Int.J.Mol.Sci 2020, 21, 4522

<https://www.youtube.com/watch?v=ZQujMqXm2wQ>

**Aptamers and SELEX: The Past, The Present, and The Future**

[https://www.youtube.com/watch?v=nFK\\_Y9cvqdw](https://www.youtube.com/watch?v=nFK_Y9cvqdw)

**Aptamers in Drug Development: From Biomarker Discovery to Targeted Drug Delivery.**

<https://www.youtube.com/watch?v=IBEkyVSqaAw>

**Synthetic Antibodies - The Emerging Field of "Aptamers" in Diagnostics and Drug Discovery**

## Reviews:

**Aptamer Therapeutics in Cancer: Current and Future Yoshihiro Morita, Macall Leslie, Hiroyasu Kameyama, David E. Volk, Takemi Tanaka** Cancers 2018, 10, 80;

**Annual Review of Pharmacology and Toxicology Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art Edvard Smith and Rula Zain Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2019. 59:25.1–25.26**



Advanced Drug Delivery Reviews  
Available online 27 September 2018  
In Press, Corrected Proof ⓘ



Aptamer-guided nanomedicines for anticancer drug delivery ☆  
Walhan Alshaer <sup>a, b</sup>, Hervé Hillaireau <sup>a</sup>  Elias Fattal <sup>a</sup>

**Current Perspectives on Aptamers as Diagnostic Tools and Therapeutic Agents.**

**Prabir Kumar Kulabhushan, Babar Hussain and Meral Yüce.**

**Pharmaceutics 2020, 12, 646**

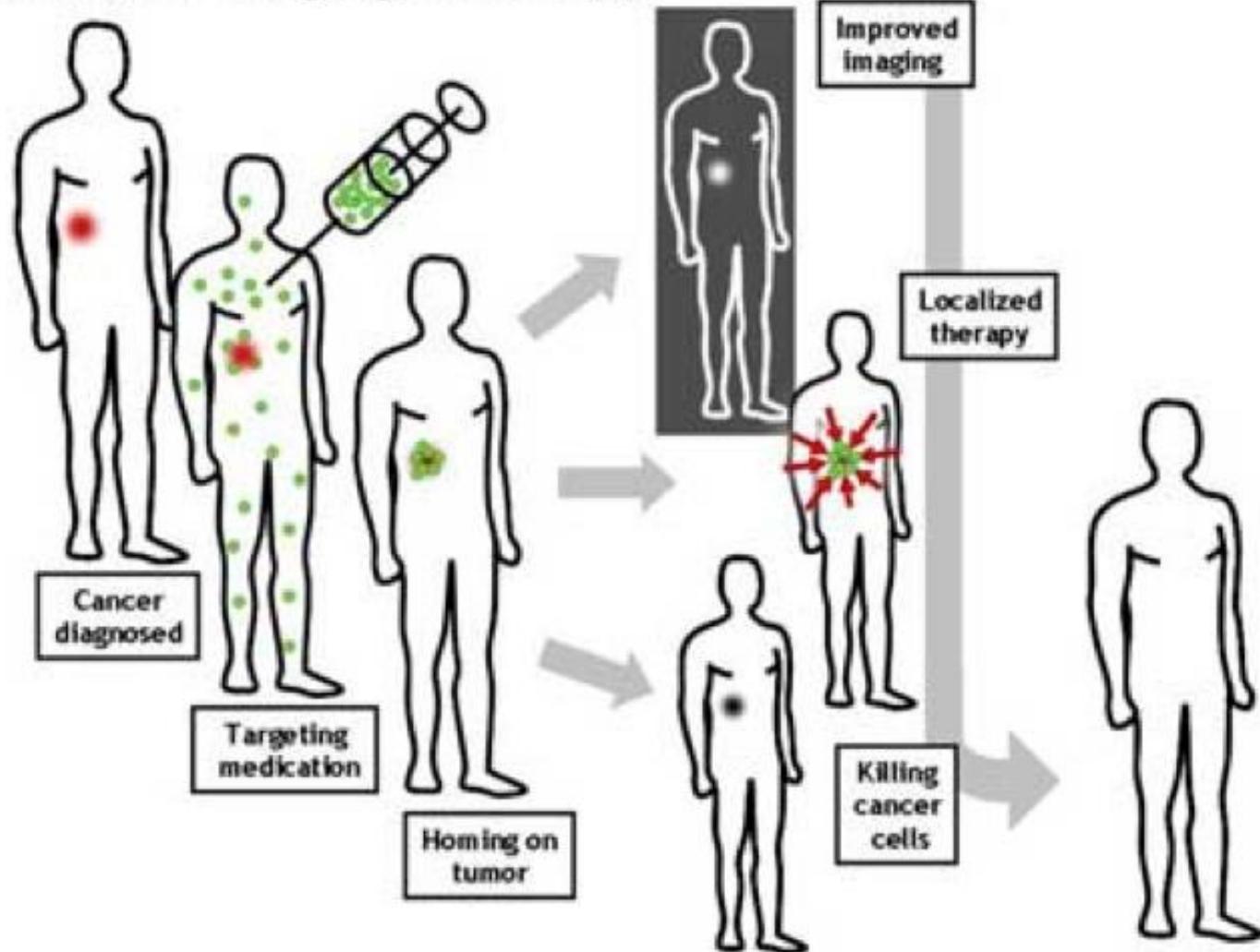
**G-Quadruplex-Forming Aptamers—Characteristics, Applications, and Perspectives**

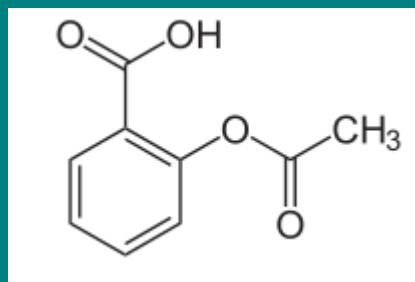
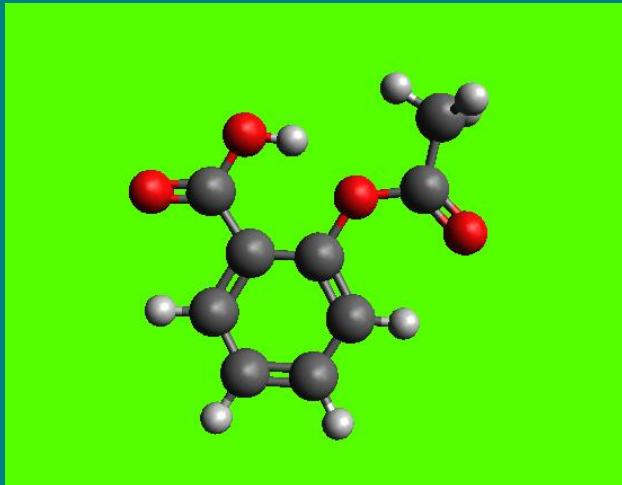
**Carolina Roxo, Weronika Kotkowiak and Anna Pasternak**  
**Molecules 2019, 24, 3781;**

**Dimeric and Multimeric DNA Aptamers for Highly Effective Protein Recognition** Claudia Riccardi, Ettore Napolitano, Domenica Musumeci and Daniela Montesarchio **Molecules 2020, 25, 5227**

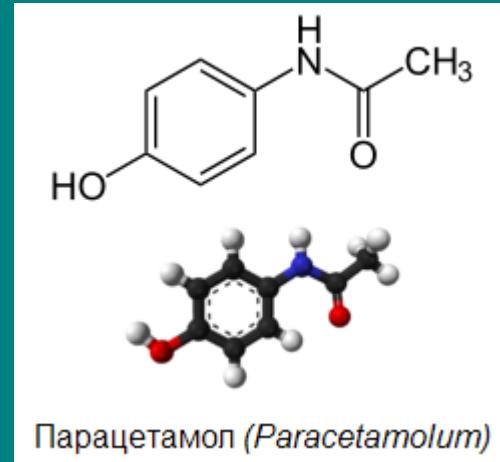
**Any identified gene that plays  
a key role in cancer  
progression or drug  
resistance can be exploited  
with oligonucleotides**

## Molecular imaging & therapy

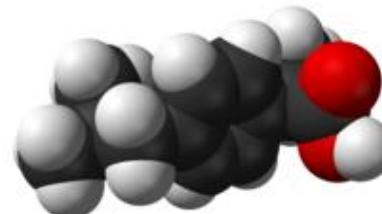
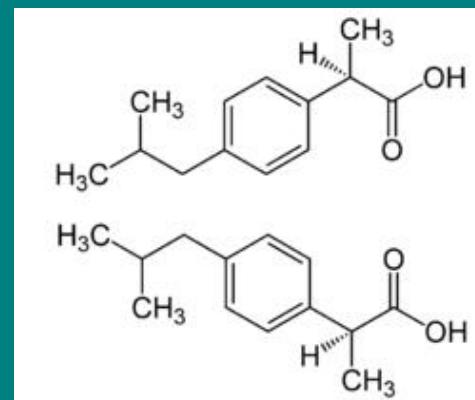




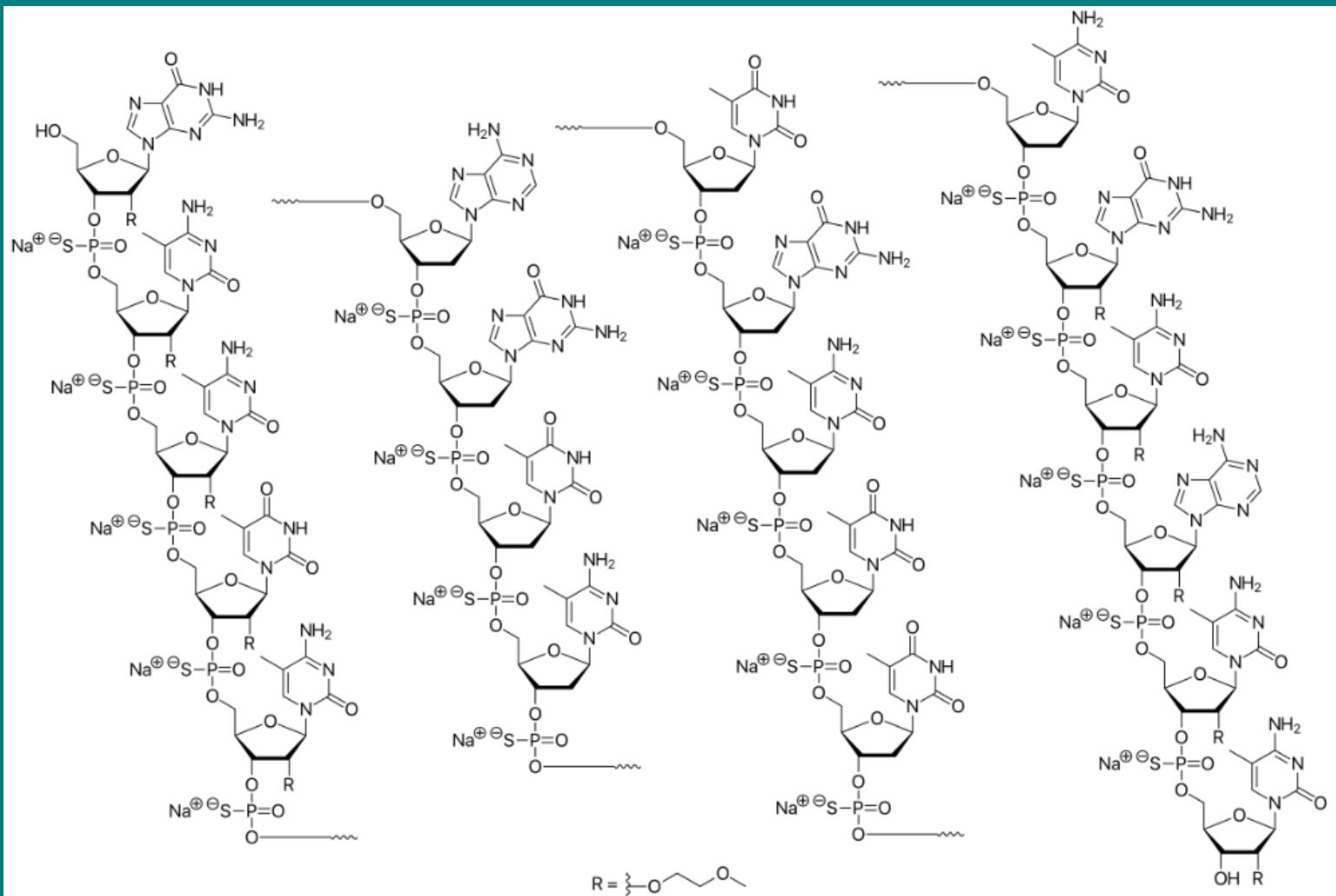
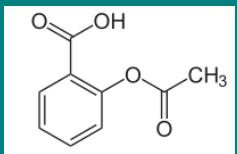
аспирин



Парацетамол (*Paracetamolum*)



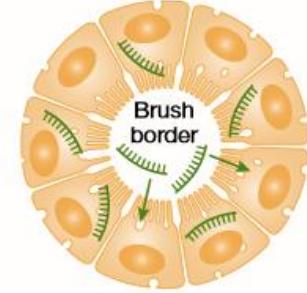
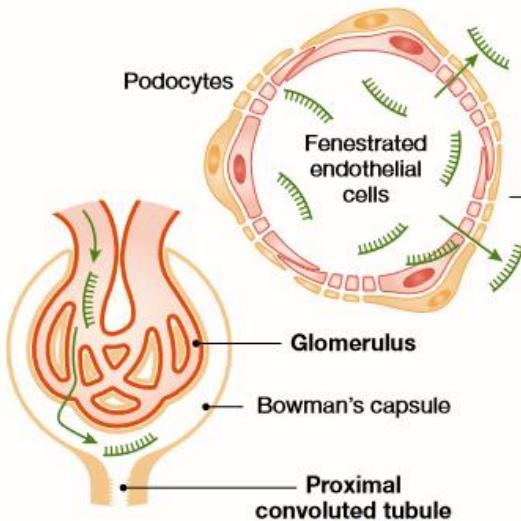
Ибупрофен (*Ibuprofenum*)



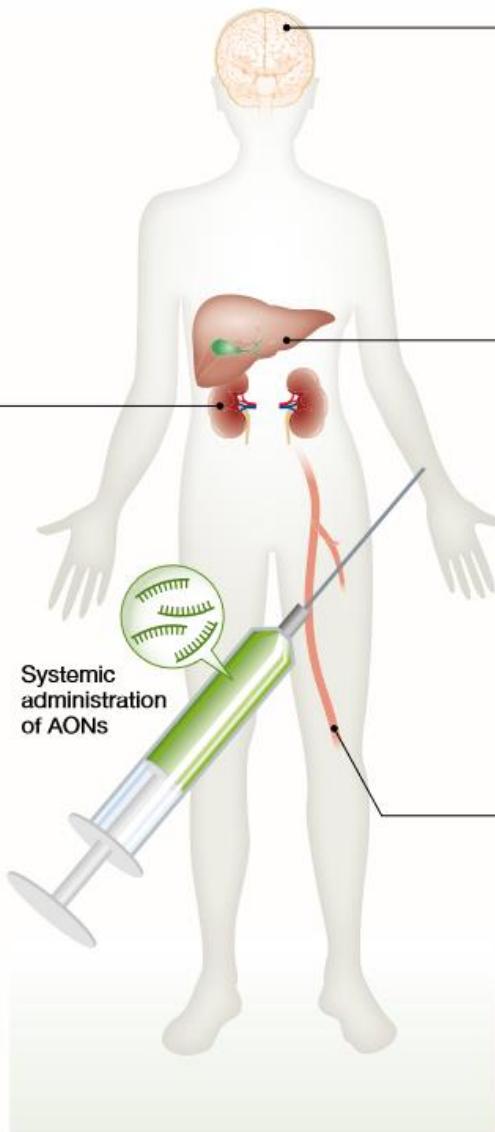
## Мипомерсен (Mipomersen)

## KIDNEY

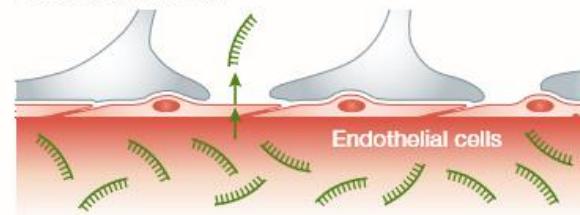
Upon systemic administration up to 18–40% of AONs accumulate in the kidneys



Antisense oligonucleotides (AONs)

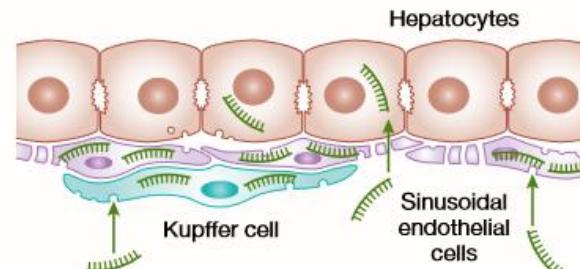


## BRAIN Blood-brain barrier



## LIVER

Upon systemic administration up to 40–50% of AONs accumulate in the liver



## BLOOD VESSELS

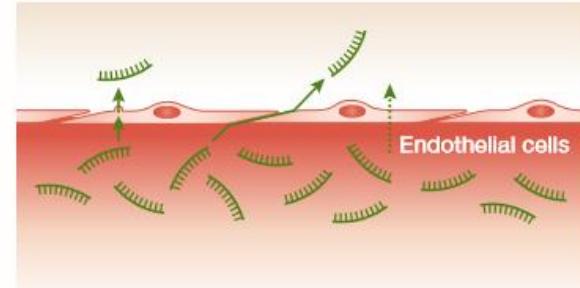
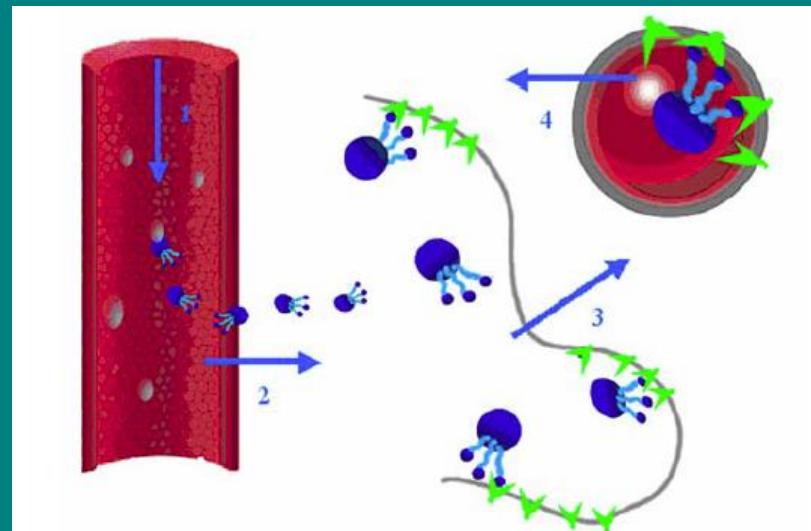


Figure 2. Barriers in AON delivery.

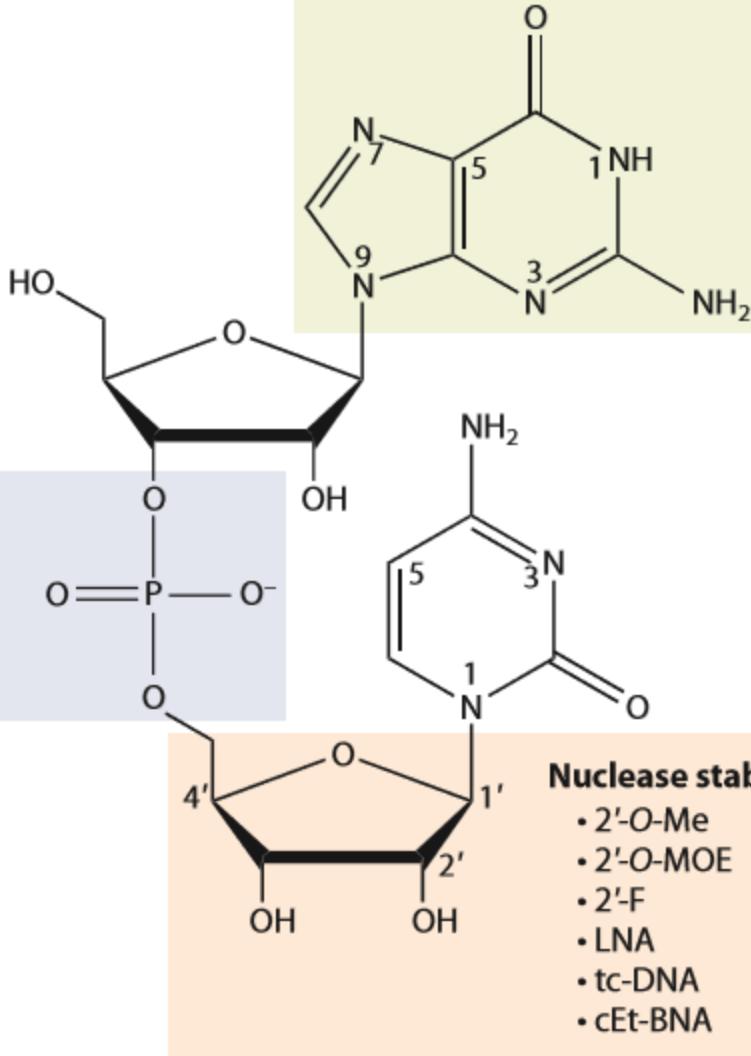
## После введения в кровеносную систему олигонуклеотиду необходимо

- 1) избежать быстрой деградации нуклеазами плазмы и ретикуло-эндотелиальной системы и быстрого выведения через почечную фильтрацию
- 2) получить доступ к целевым клеткам через преодоление капиллярного эндотелия и диффузию во внеклеточном матриксе
- 3) быть «захвачен» целевыми клетками главным образом через receptor опосредованный эндоцитоз
- 4) внутри клетки освободиться из эндосом и не только достигнуть внутриклеточную целевую мишень, но и успешно связаться с ней.



**Nuclease stability and pharmacokinetics**

- PS
- NP

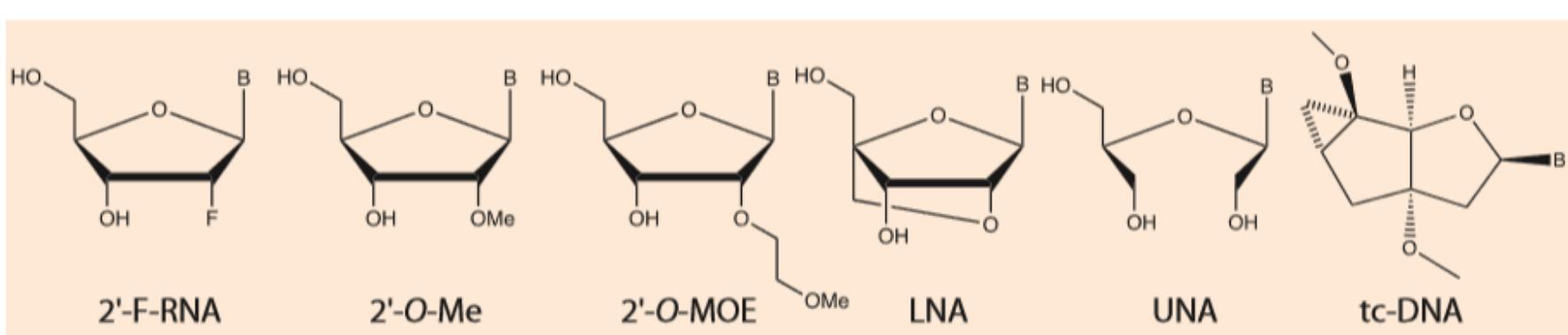
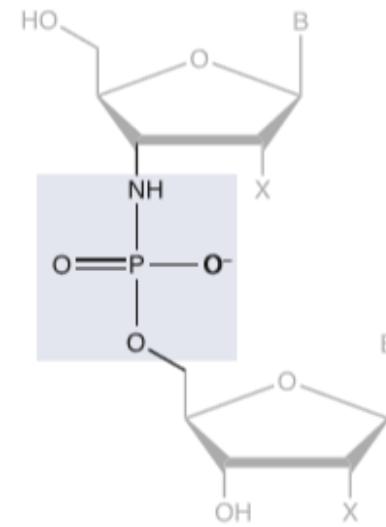
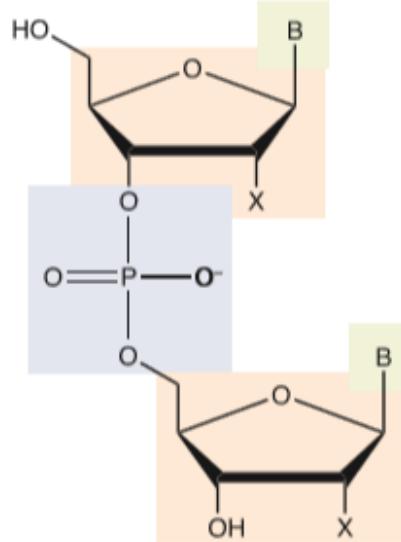
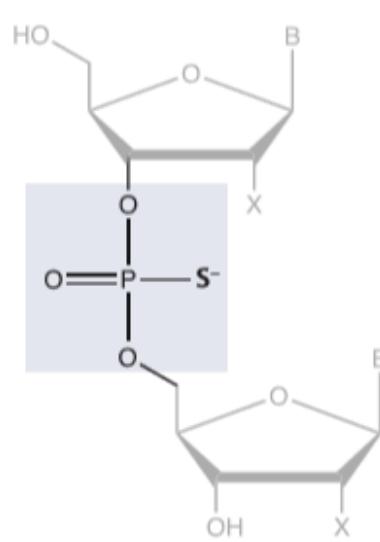
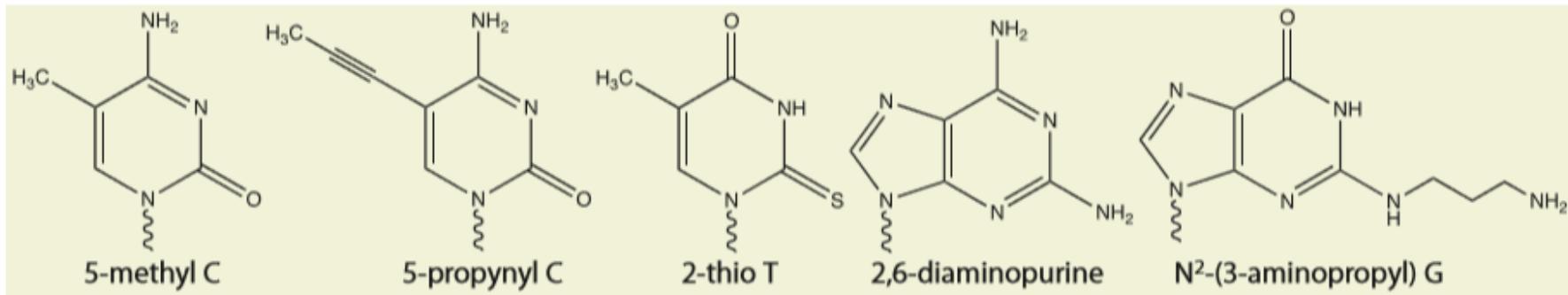


**Binding affinity and specificity**

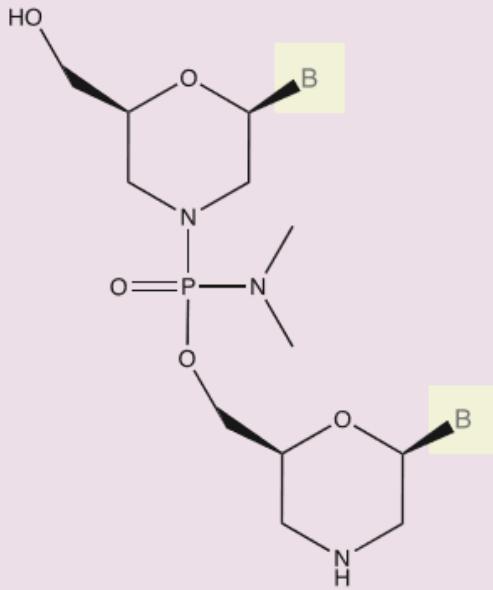
- 5-methyl
- 5-propynyl
- 2-thio
- 2,6-diaminopurine

**Nuclease stability and binding affinity**

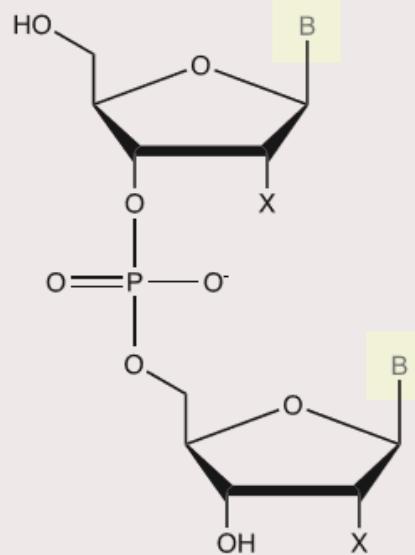
- 2'-O-Me
- 2'-O-MOE
- 2'-F
- LNA
- tc-DNA
- cEt-BNA



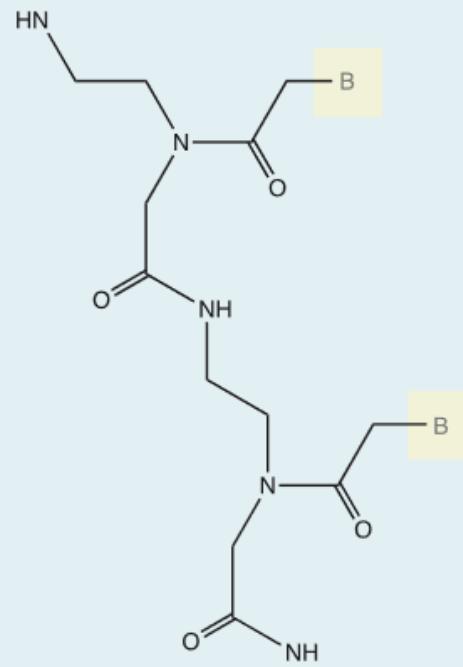
**a** Phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMO)



**b** DNA or RNA



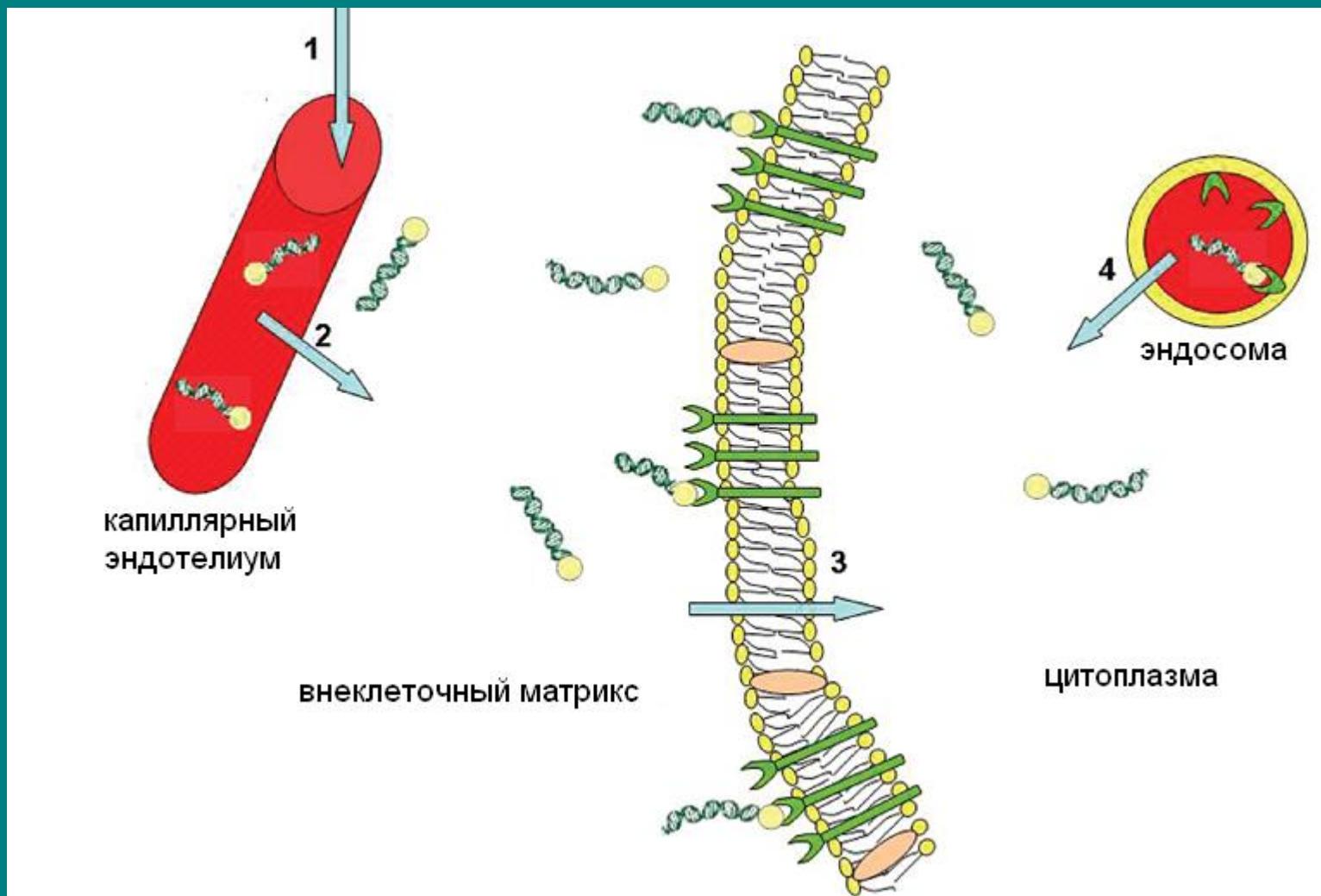
**c** Peptide nucleic acid (PNA)



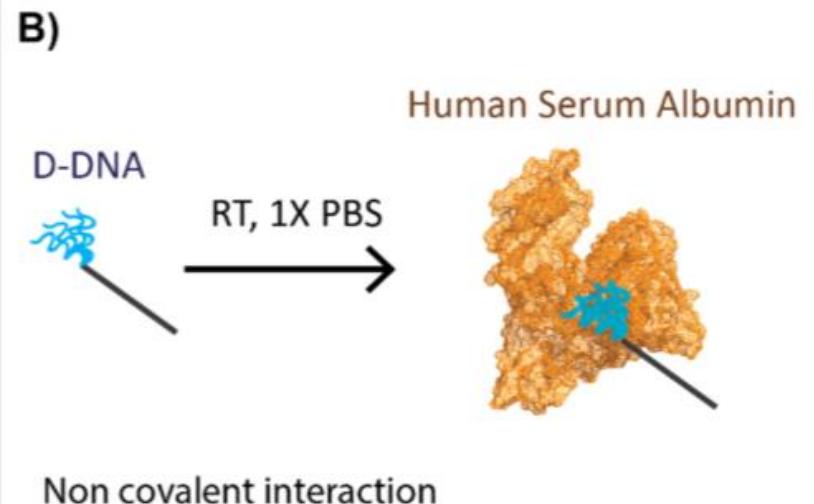
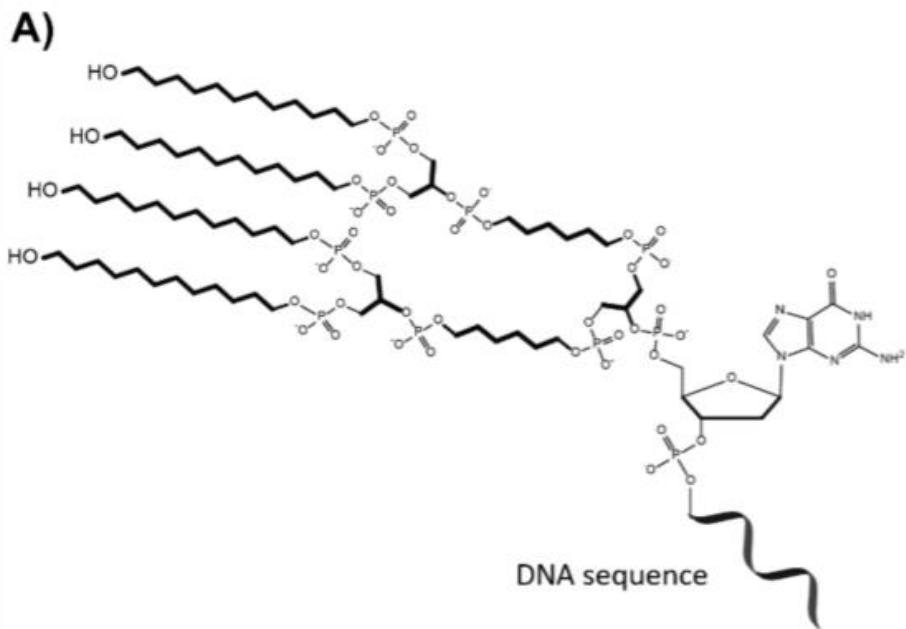
B

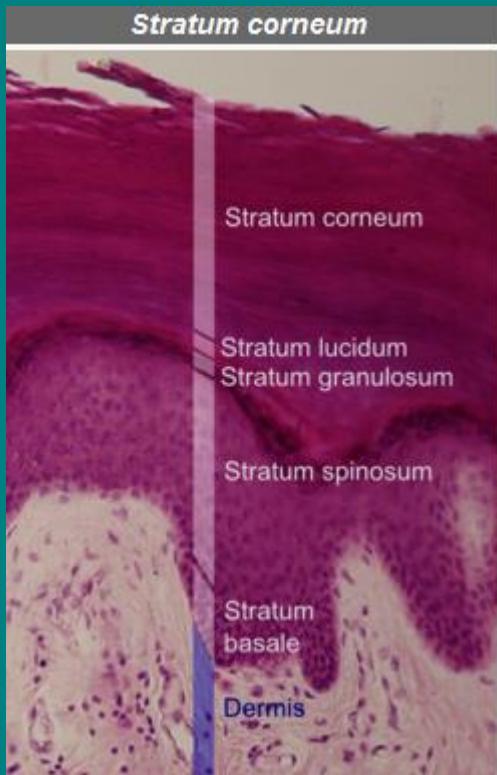
Heterocyclic nucleobase

Chemical structures of (a) phosphorodiamidate morpholino oligomers, (b) DNA or RNA, and (c) peptide nucleic acid. Abbreviation: B, heterocyclic nucleobase.



# DNA Nanostructures for High-Affinity Binding to Human Serum Albumin



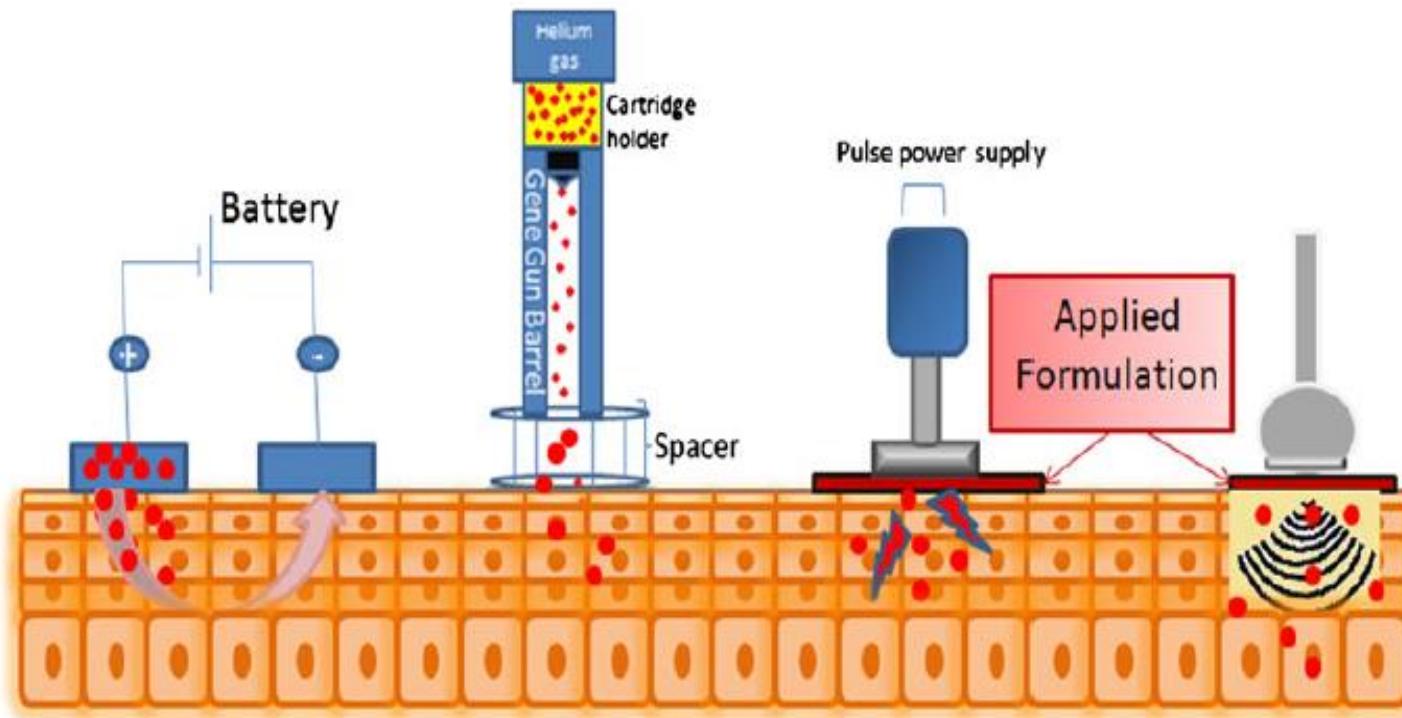


«Прямой проход» больших (тем более заряженных отрицательно) молекул через неповрежденную кожу вряд ли возможен.

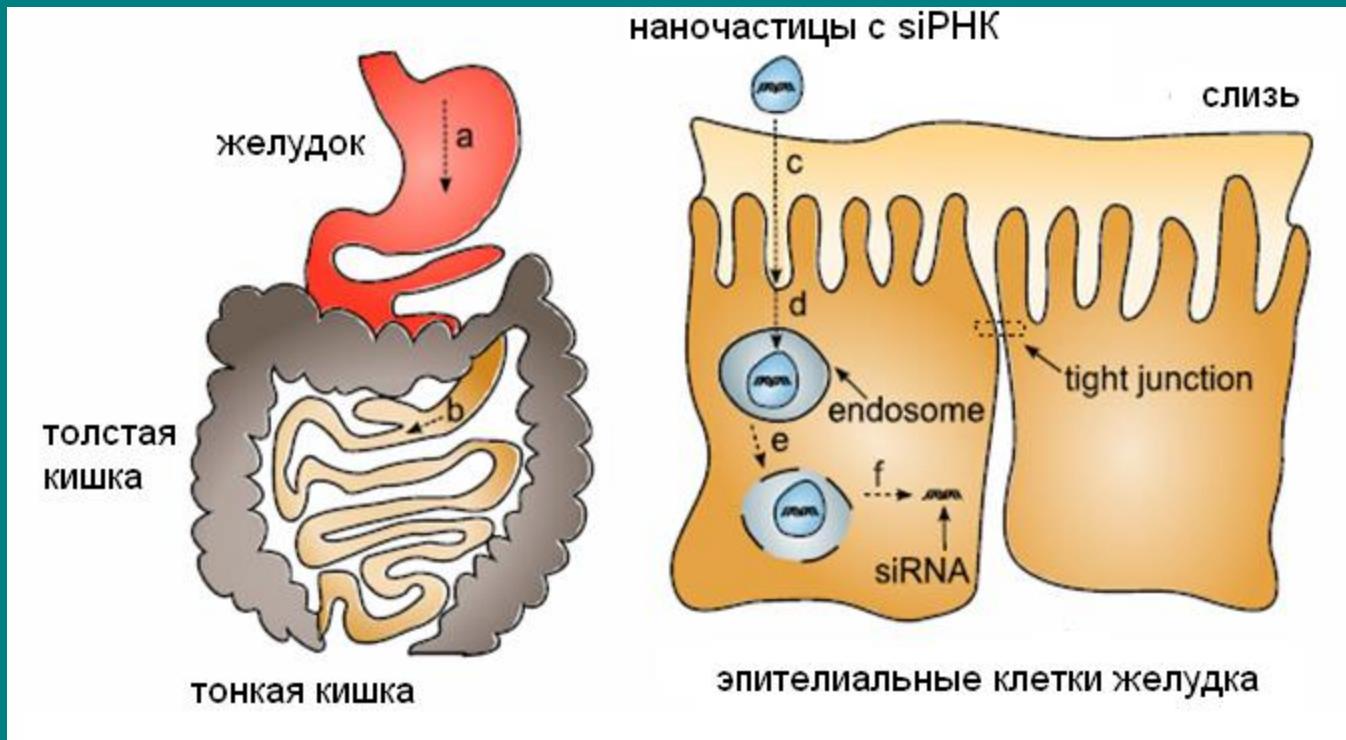
Проникновение осуществляется через волосяные фолликулы, потовые железы и поврежденный кожный покров.

Применение напряжения (при ионофорезе), которое влияет на образование пор, недостаточно.

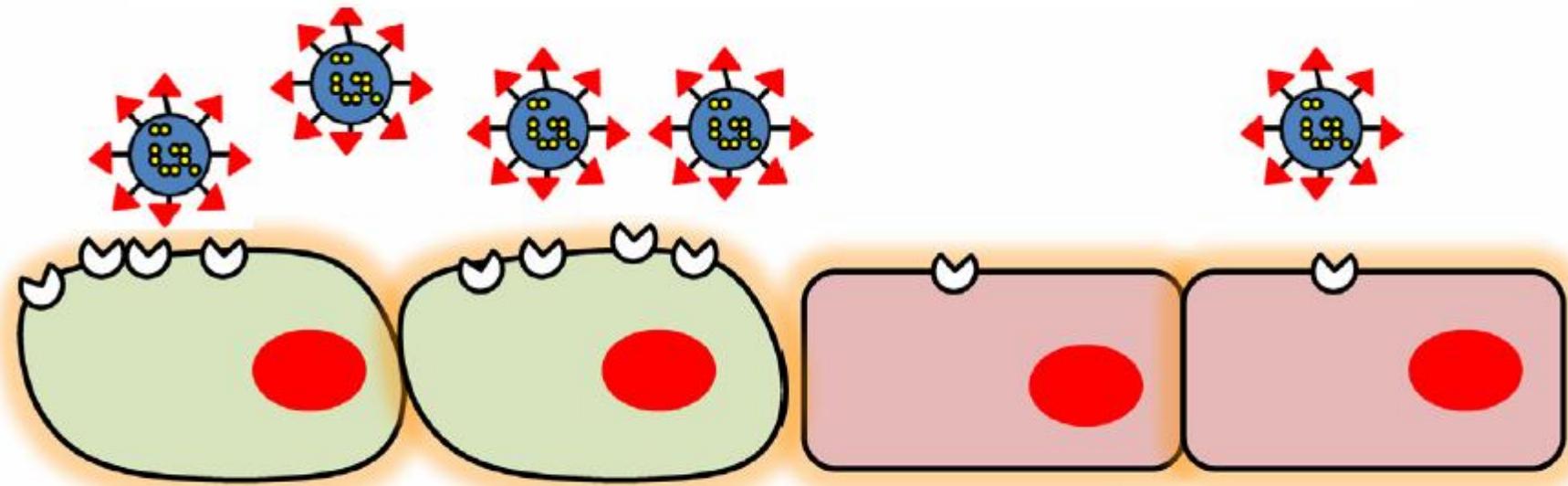
Использование микроигл в комбинации с катодным ионофорезом более перспективно.

**a - Iontophoresis****b- Gene Gun****c - Electroporation****d- Ultrasound**

**Fig. 3** Physical methods for siRNA delivery in the skin. In the iontophoresis (**a**) the positively charged chamber releases the formulation with the same charge through electromigration and electroosmosis. In the gene gun (**b**) an adjustable low-pressure helium pulse impels the gene-coated gold particles into the target. The electroporation (**c**) uses electric pulses to create transient pores in a cell membrane and the ultrasound (**d**) alters the permeability properties of the cell membrane improving local siRNA delivery.

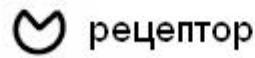


## Лиганд-рецепторная доставка наноносителя с лекарством

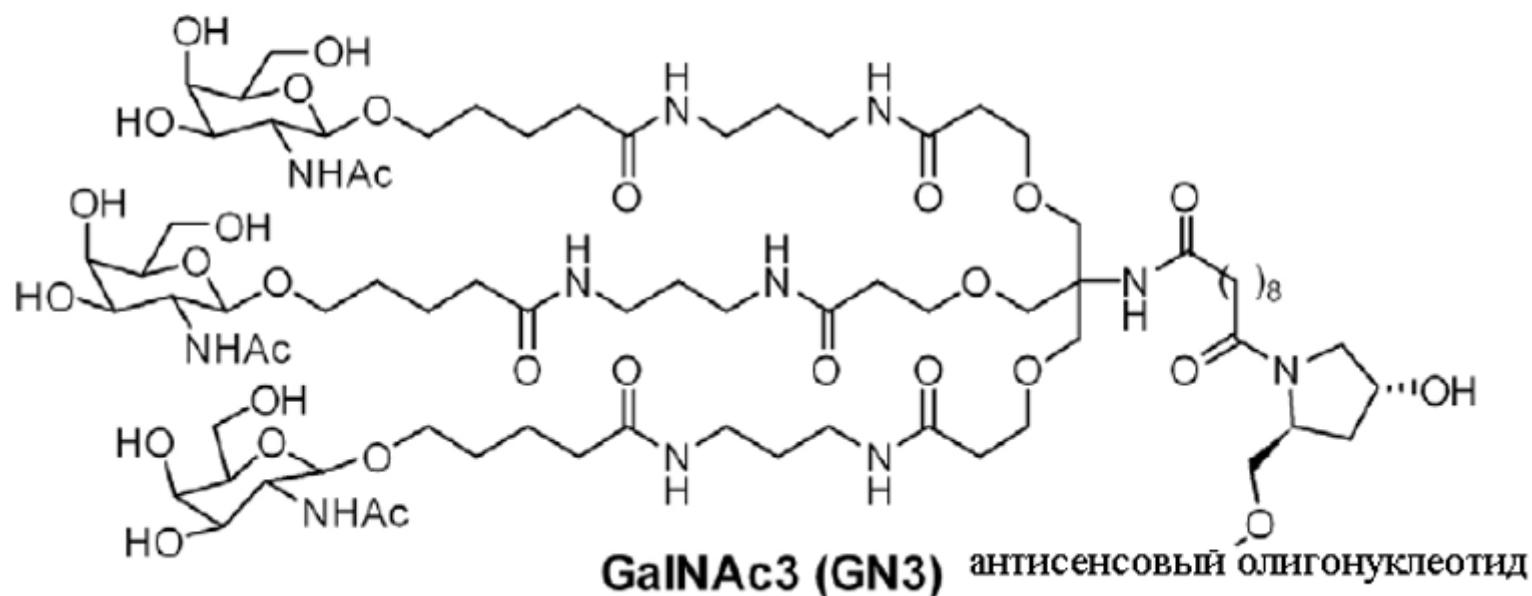


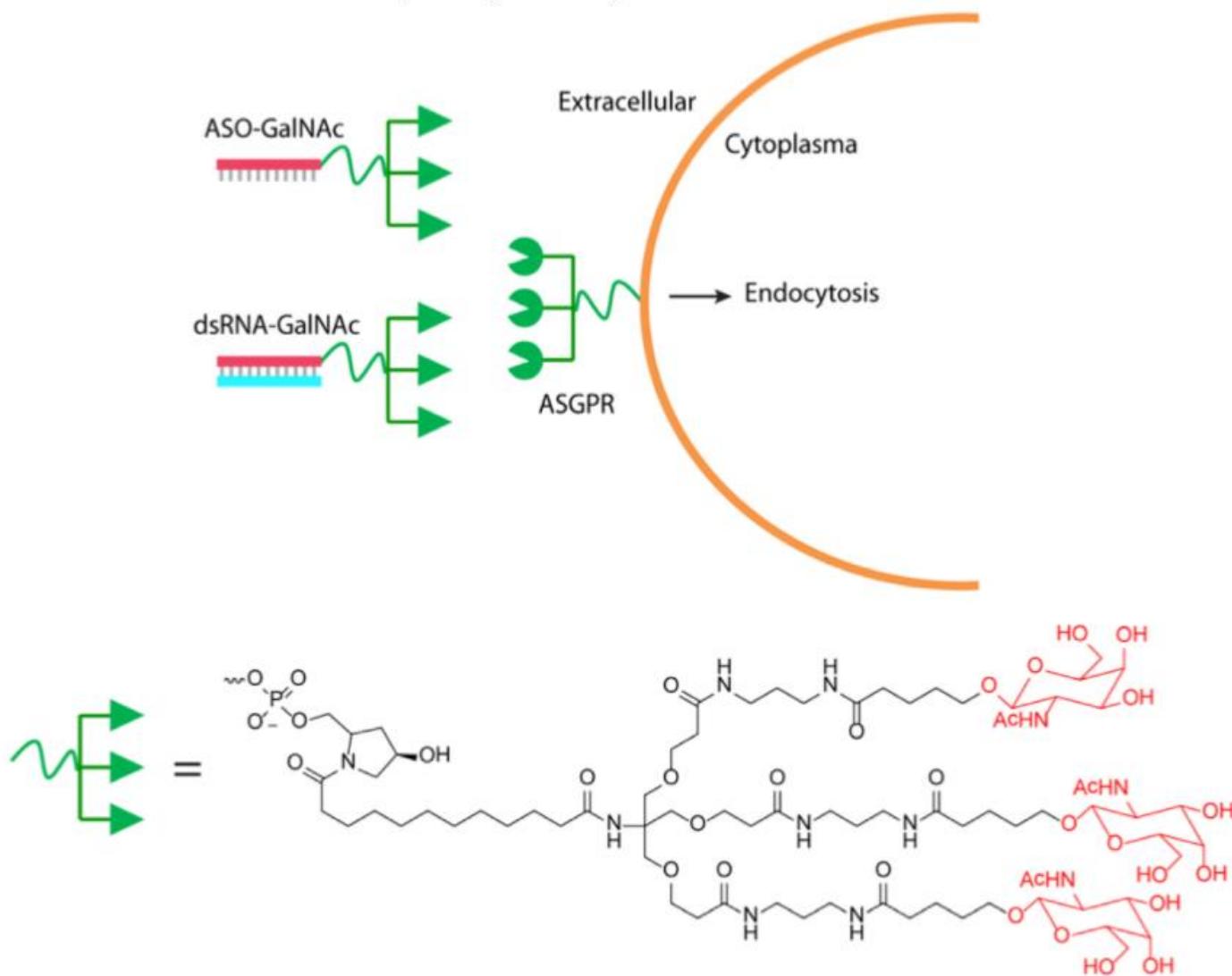
Раковые клетки

Нормальные клетки

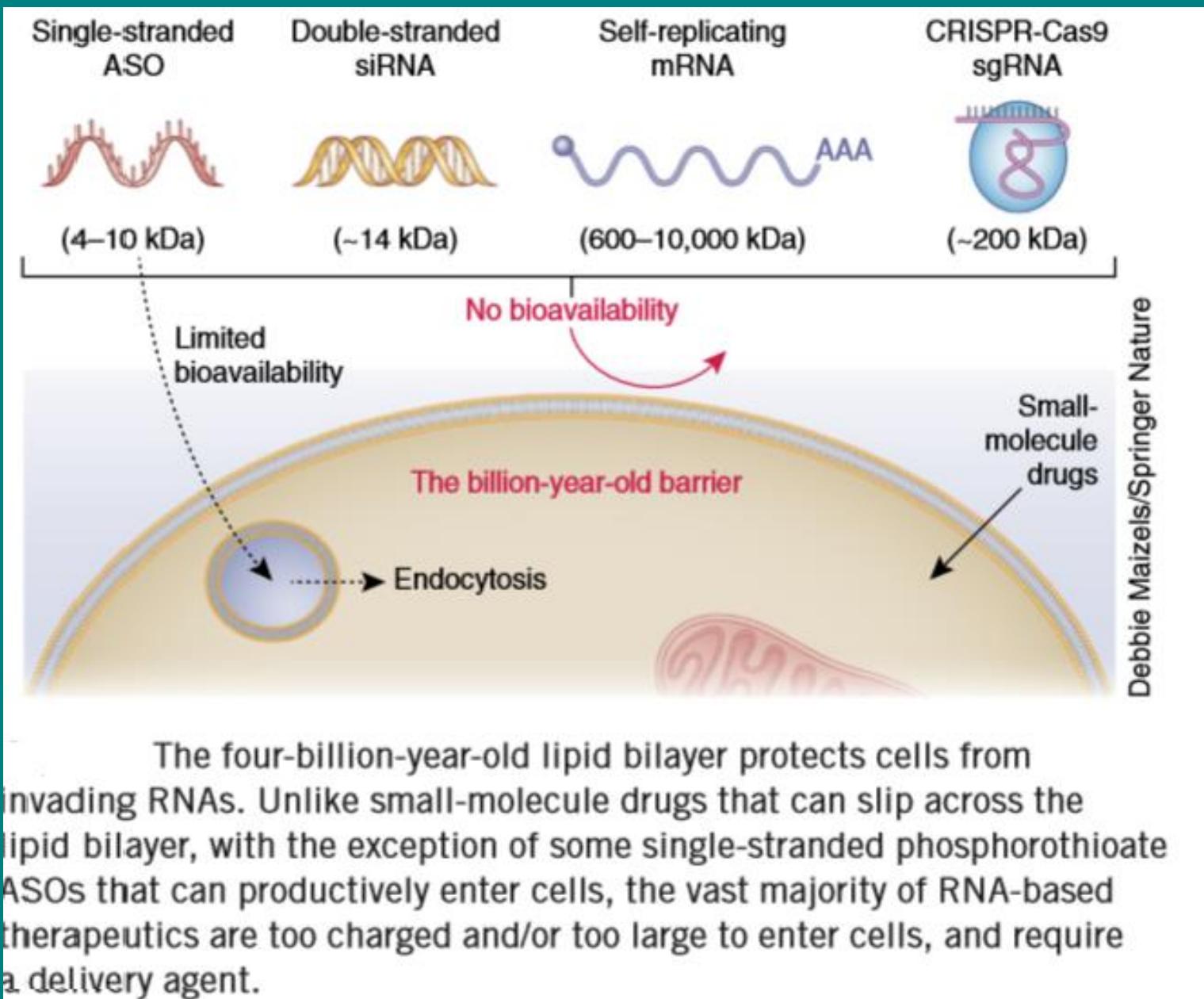


Использование тригалактозаминового производного антисенсового олигонуклеотида (GalNAc3 является высокоафинным лигандом одного из рецепторов гепатоцитов) в 6-10 раз повышает его потенциал при действии на печень

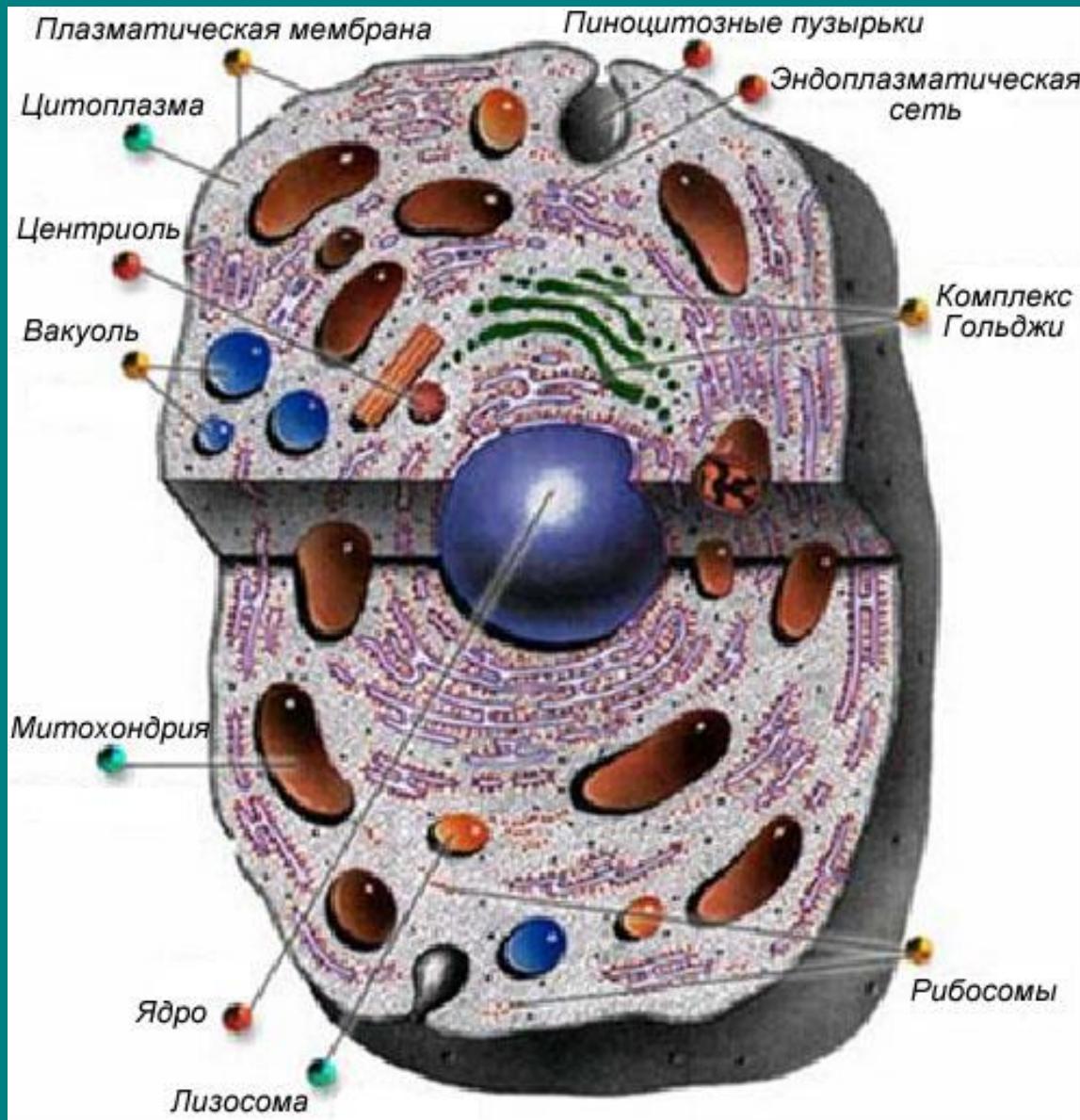




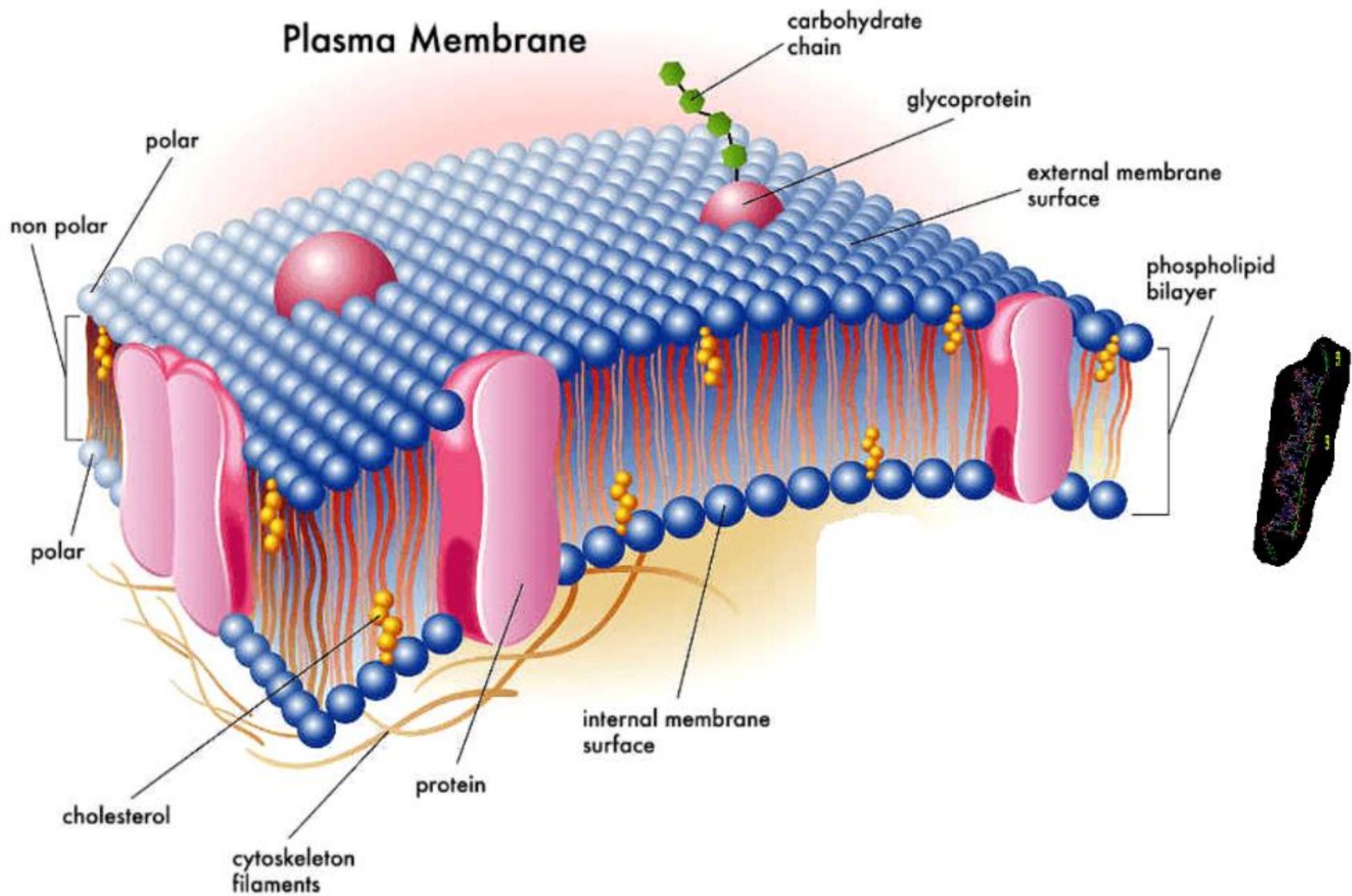
Conjugation of GalNAc to passenger strand of dsRNAs or ASOs to enhance delivery to the liver. ASGPR: asialoglycoprotein receptor.

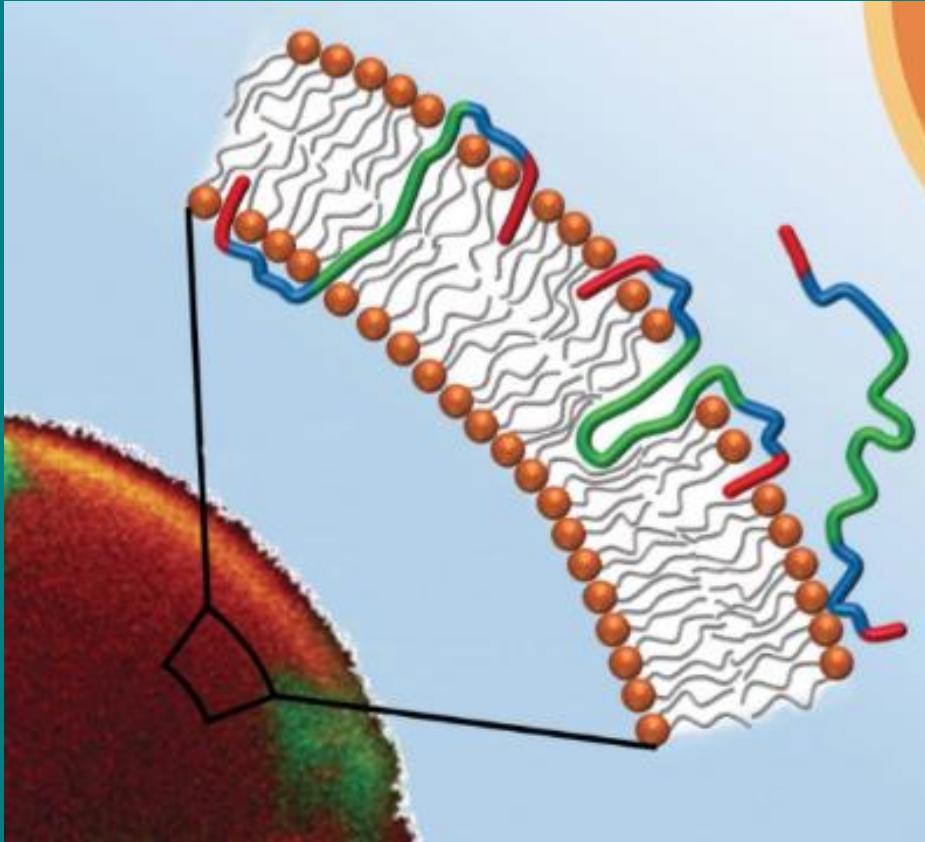


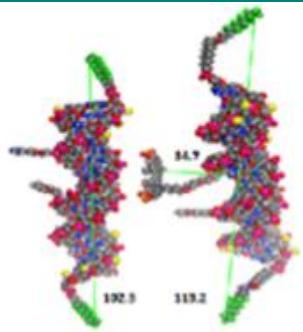
# Эукариотическая клетка



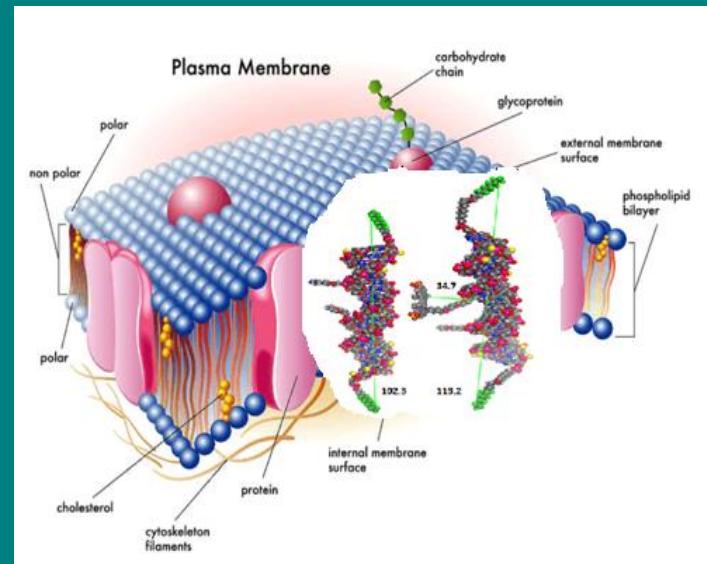
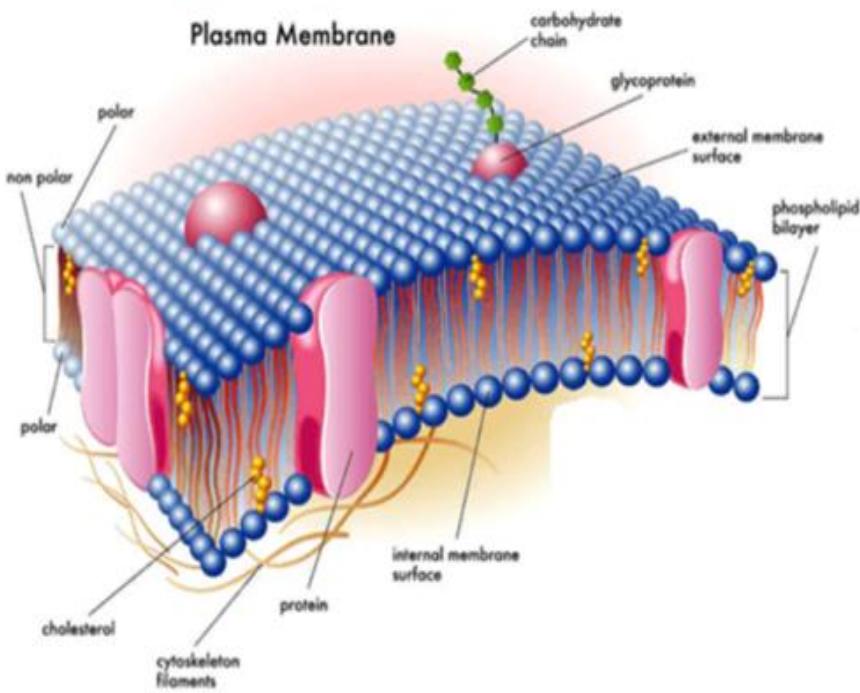
## Plasma Membrane

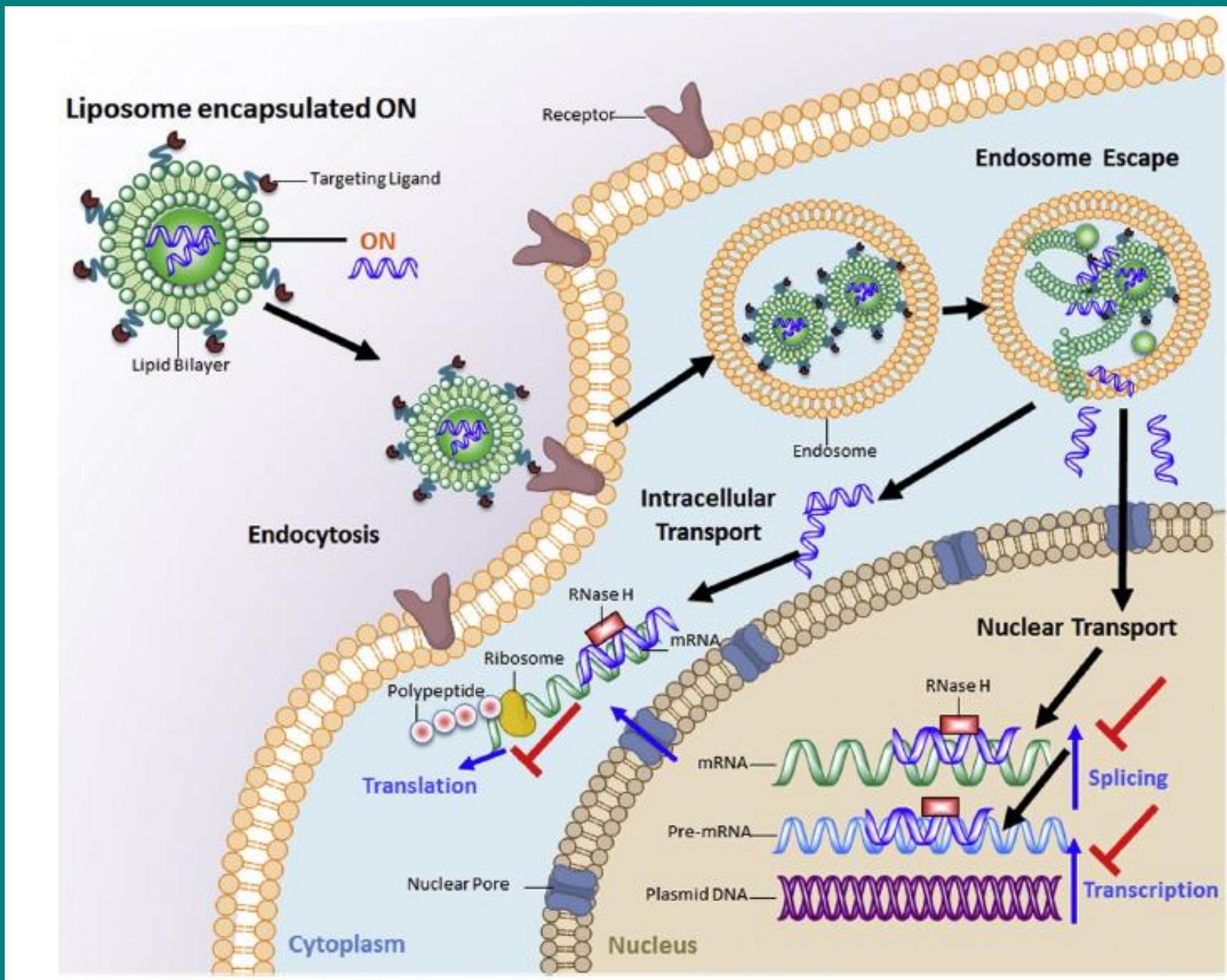


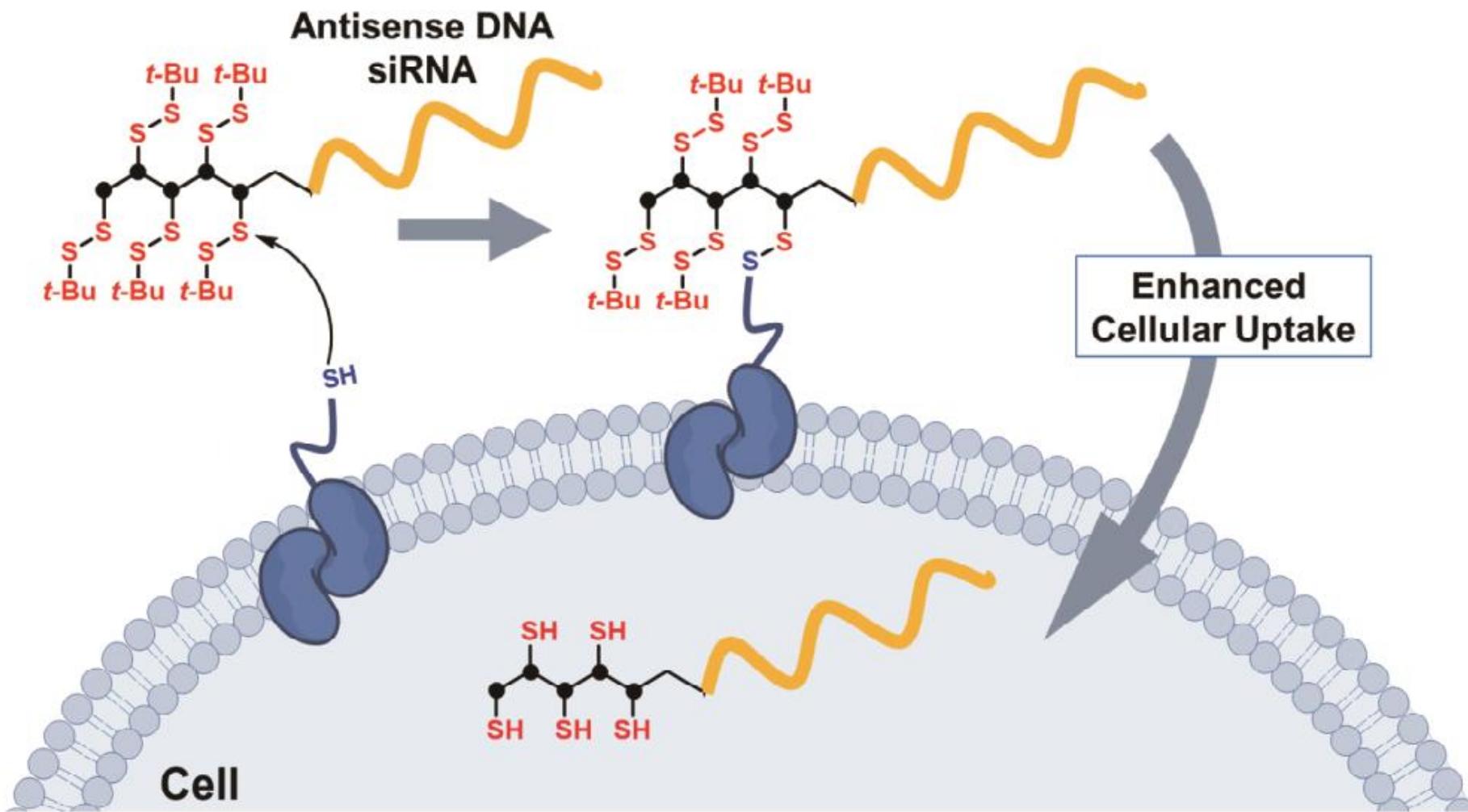




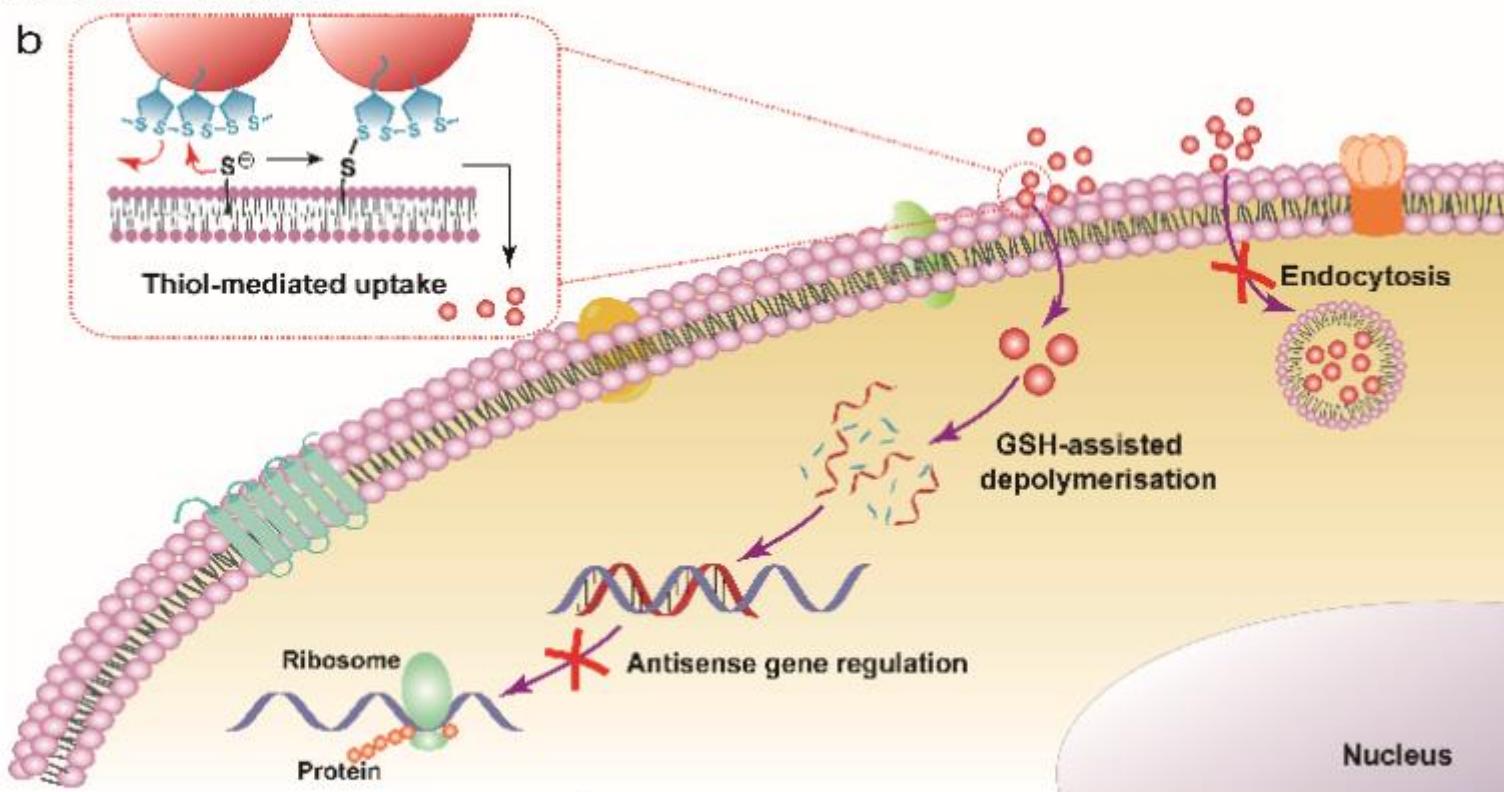
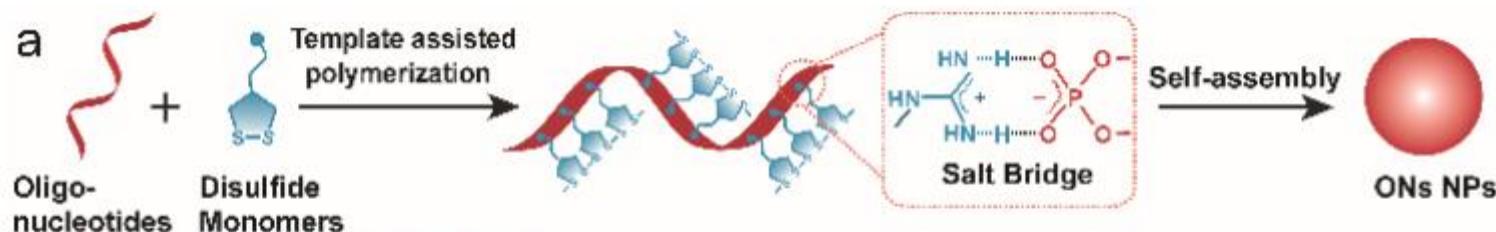
Plasma Membrane





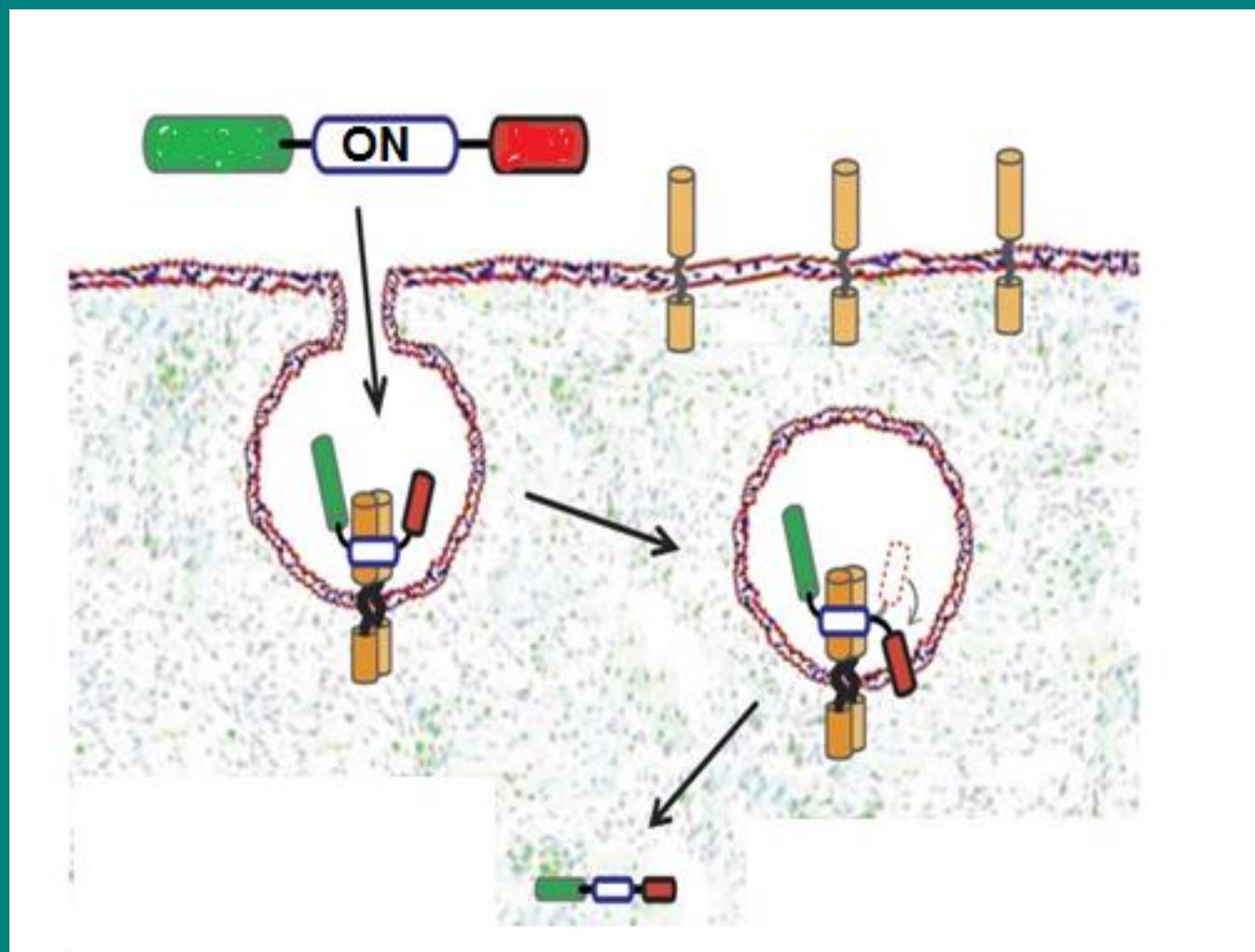


Conjugation with disulfide units enhanced the permeability of oligonucleotides.



(a) Schematic illustration of ONs template-assisted polymerization approach to form ONs NPs. (b) ONs NPs for effective intracellular gene delivery via thiol-mediated uptake, following by rapid disassembly via GSH-assisted depolymerisation and release the ONs for antisense gene regulation.

**Disulfide-unit conjugation enables  
ultrafast cytosolic internalization  
of antisense DNA and siRNA**

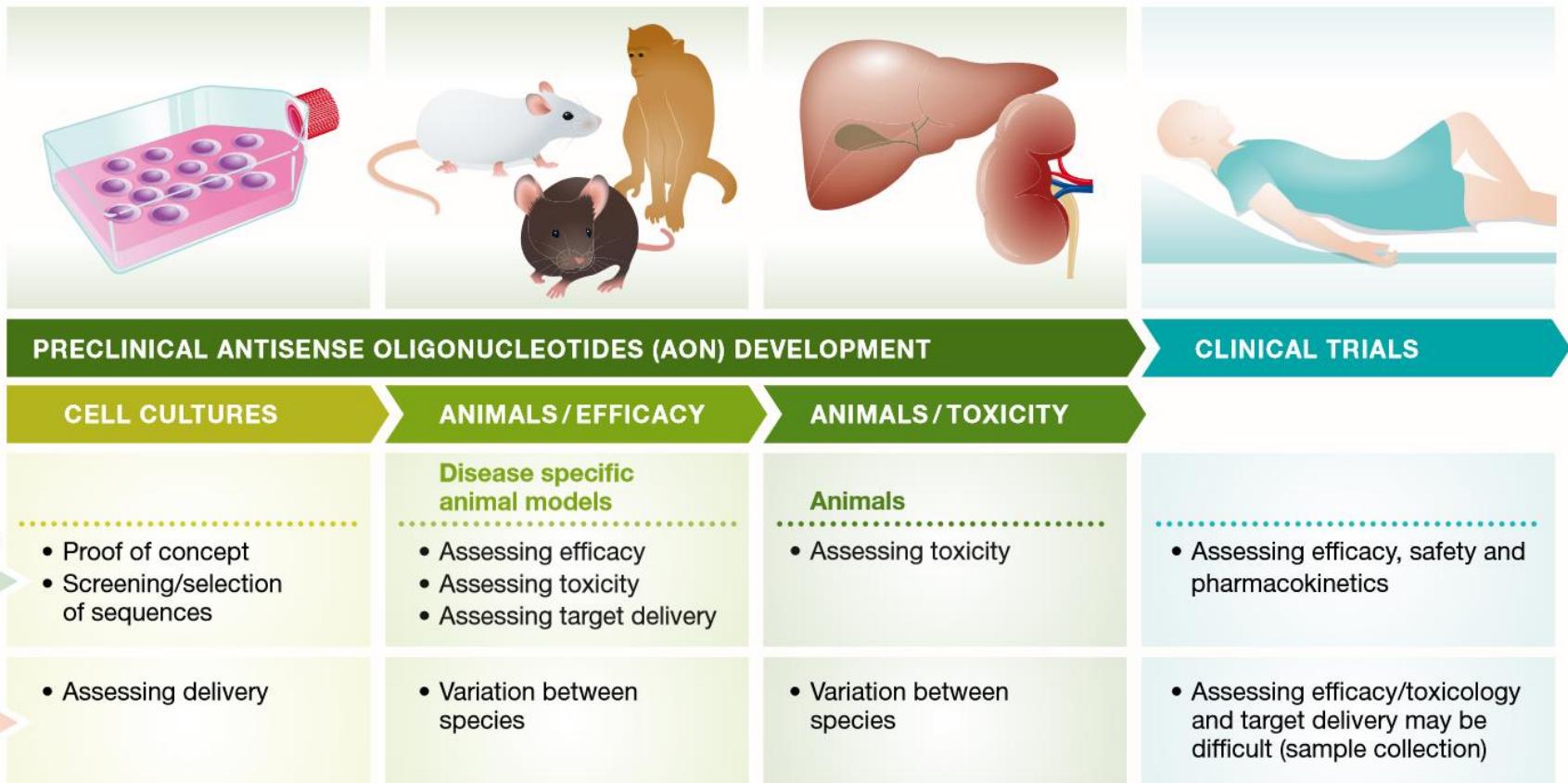


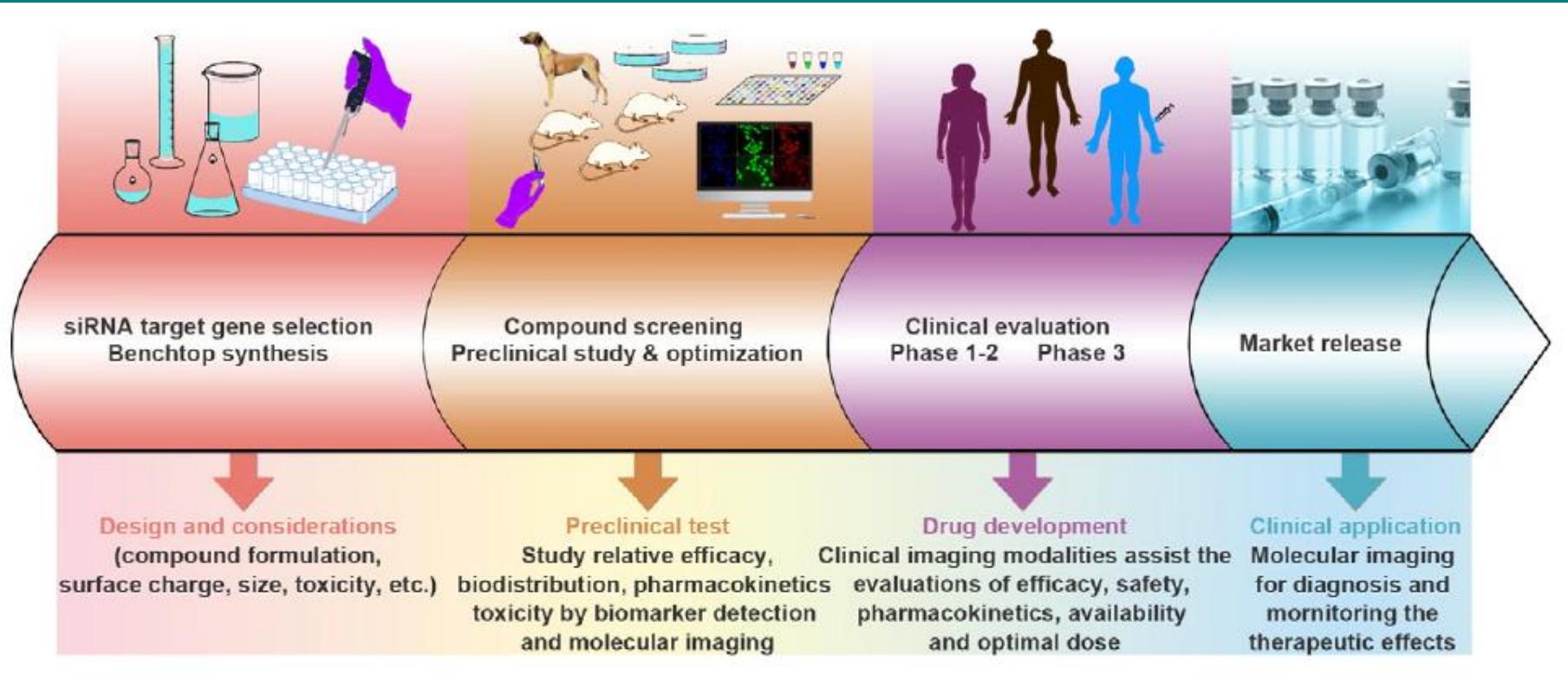
**The chemical universe is expansive, and only a very limited number of the possible ON modifications have been investigated to date, with even fewer in the clinic. In spite of this, essentially each level of the extended central dogma has already been targeted by these medicines, and the recent clinical successes bode well for their future development. It is evident that the promise of ON medicines is beginning to be fulfilled, but these are still just the early days of this era, and much more is to come.**

**Annual Review of Pharmacology and Toxicology Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art**  
**Edvard Smith and Rula Zain Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2019. 59:25.1–25.26**

## small molecules that enhance oligonucleotide effectiveness

- ... it is becoming clear that small molecules can play a helpful role both in understanding and in improving the pharmacological effects of oligonucleotides. The events of endocytosis and intracellular trafficking present a complex drama supported by a cast of hundreds if not thousands of proteins. Each of those proteins provides a potential target for a small molecule that may influence the trafficking process. Thus conceivably it may be possible to find small molecules that enhance the actions of oligonucleotides by affecting their endocytosis and trafficking in many different ways...





## Nanocapsules in drug delivery

