Archive of SID

Nucleic Acid Aptamers: New Tools in Diagnosis and Therapy

Ghasemi D[1], Farokhi-Fard A[2], Sankian M[3]

Abstract

Aptamers are short single-stranded nucleotides (or peptide) folded into particular three-dimensional structure which can bind to their targets with high specificity and affinity. Small size, inexpensive and rapid production process, low immunogenicity and high stability, made them very attractive biomolecules in some investigational fields especially in planning of innovative diagnostic and therapeutic approaches. In this review, we have described the process of nucleic acid aptamers development, advantages and disadvantages of aptamers compared to antibodies, and potential applications of these new agents in medicine. Limitations of aptamers and existing answers to overcome this limitations has also been discussed.

Key words: Nucleic acid aptamer, Antibody, Aptamer selection, Pegaptanib

Received:2017.06.19; Accepted: 2018.03.06

آپتامرهای نوکلئیک اسیدی: ابزارهای نوین در تشخیص و درمان

داود قاسمی[۱] ؛ عارف فرخی-فرد[۲]؛ مجتبی سنکیان[۳]

چکیده

آپتامرها توالی های کوتاه تک رشته‌ای اسید نوکلئیکی (DNA یا RNA) یا پپتیدی با ساختار سه بعدی ویژه‌ای هستند که قادرند با اختصاصیت و تمایل بالایی به اهداف خود متصل شوند. اندازه کوچک، فرایند تولید سریع و ارزان، ایمنی زایی اندک و پایداری بالا، آن ها را به مولکول های جذابی در برخی زمینه های پژوهشی به ویژه در طراحی مسیرهای تشخیصی و درمانی جدید تبدیل کرده است. در این مقاله مروری، فرآیند تولید آپتامرهای اسید نوکلئیکی، مزایا و معایب آن ها در مقایسه با آنتی‌بادی ها و پتانسیل های کاربردیشان در پزشکی بحث می شود. همچنین محدودیت های آپتامرها و راه‌کارهای غلبه بر آن نیز مورد بررسی قرار می‌گیرد.

کلمات کلیدی: آپتامر نوکلئیک اسیدی، آنتی بادی، Pegaptanib

نویسنده مسئول: مجتبی سنکیان،sankianm@mums.ac.ir، ORCID:0000-0003-0602-6431

آدرس: مشهد، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، پژوهشکده بوعلی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۲- دانشجوی دکتری تخصصی بیوتکنولوژی دارویی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳- دانشیار گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

مقدمه

آپتامرها دسته‌ای از مولکوهای پروتئینی یا نوکلئوتیدی هستند که می‌توانند به طور اختصاصی به یک مولکول هدف متصل شوند. اینمولکول‌ها، به عنوان دسته جدیدی از کاوشگرهای مولکولی، جهت تشخیص، تصویربرداری زیستی و درمان هدفمند، در سال‌های اخیر مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته‌اند (۱). نام آپتامر از واژه لاتینی "aptus"، به معنای مناسب و پسوند یونانی"mer" به معنای واحد و یا ذره گرفته شده‌است (۲).آپتامرهای نوکلئیک اسیدی بر علیه اهداف مختلفی مانند رنگ‌های آلی، یون‌های فلزی، داروها، آمینواسیدها، کوفاکتورها، نوکلئوتیدها، پپتیدها، انواعی از پروتئین‌ها و گیرنده‌های سطح سلولی تولید شده اند (۴-۲). در کنار همه این موارد، آپتامرهایی بر علیه ویروس ها، باکتری‌های بیماری زا و سلول‌های سرطانی نیز تولید شده است (۴). اینمولکول ها برای نخستین بار به وسیله یک روش آزمایشگاهی بنام سلکس (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment: SELEX) در سال ۱۹۹۰ تولید شدند. در این روش، مولکول الیگونوکلئوتیدی منحصربه فردی از میان کتابخانه

www.SID.ir

Archive of SID

تصادفی اسید نوکلئیکی انتخاب می شود. با استفاده از این روش، میل پیوندی و اختصاصیت آپتامرها نسبت به مولکول هدف، در محدوده نانو مولار[1] تا پیکومولار[2] است (۵) که با میل پیوندی آنتی بادی برای مولکول هدف خود رقابت می کند (۲) و حتی در مواردی بهتر از آن عمل نمایند (۶). میانکنش آپتامر به مولکول هدف به دو صورت امکان پذیر است؛ دربرگرفتن مولکول های هدف کوچک یا اتصال به مولکول های بزرگ مانند پروتئین ها (ایفای نقش به عنوان لیگاند یک درشت مولکول) (۷).

تاریخچه

ایده اتصال اسیدهای نوکلئیک به پروتئین‌ها در دهه ۱۹۸۰ با تحقیق بر روی ویروس نقص سامانه ایمنی انسان[3]و آدنوویروس ها[4] آغاز شد. این ویروس ها [5]RNA-های عملکردی را رمز می‌کنند که با اختصاصیت بالایی به پروتئین های میزبان و یا خود ویروس متصل می شوند (۸). در ویروس HIV یک عنصر RNA سنجاق سری[6] به نام TAR[7] وجود دارد که با اتصال به پروتئین تغییر دهنده فعالیت رونویسی[8](TAT)، موجب تکثیر ویروس می‌شود (۹). آدنوویروس ها نیز دارای یک آپتامر کوچک از جنس ریبونوکلئیک اسید (RNA aptamer) هستند که "RNA همراه ویروس" نامیده می شود و فرایند رونویسی را تنظیم می‌کنند (۱۱، ۱۰). فرایند انتخاب آزمایشگاهی[9] آپتامر به نام "تکامل روشمند لیگاند بوسیله غنی سازی تصاعدی" یا"سلکس" نخستین بار به وسیله Gold و Szostak در سال ۱۹۹۰ معرفی گردید (۲). با استفاده از فناوری سلکس که اکنون روش پایه برای جداسازی آپتامرهاست، بسیاری از آپتامرها را می توان در آزمایشگاه بر علیه اهداف مختلف، از مولکول های زیستی کوچک تا پروتئین ها و حتی سلول ها انتخاب نمود (۱۲). در ابتدا، بیشتر از مولکول RNA برای تولید آپتامر استفاده می‌شد، زیرا این مولکول توانایی تشکیل ساختارهای سه بعدی بیشتری را داشت(۱۳). اما هم اکنون از مولکول DNA تک رشته[10] هم می‌توان برای این منظور استفاده کرد. DNA تک رشته ای نیز می‌تواند ساختارهایی مانند ساقه[11]، حلقه[12] و حلقه های درونی را تشکیل دهد که البته از ساختارهایی که مولکول RNA تشکیل می‌دهد ناپایدارتر است (۱۴).

تولید آزمایشگاهی آپتامرها

همانطور که گفته شد، روش معمول تولید آزمایشگاهی آپتامرها سلکس است. سلکساز سه مرحله تشکیل شده است که با تکرار آن، بهترین آپتامر برای اتصال به مولکول هدف، از میان انبوه توالی های غیراختصاصی موجود درکتابخانه، انتخاب می شود (۱۵).

۱. اتصال: کتابخانه با مولکول هدف مورد نظر مجاور می‌شود تا توالی هایی که قادر به اتصال هستند به مولکول مورد نظر متصل شوند.

۲. جداسازی: توالی‌های اتصال یافته از اتصال نیافته ها جدا می‌شوند. این مرحله معمولاً با روش‌های مختلفی انجام می‌شود تا فرایند انتخاب آپتامرها به مولکول هدف سریع تر و آسان‌تر صورت پذیرد.

تکثیر: ترکیب توالی‌های متصل شده به مولکول هدف، جهت ایجاد کتابخانه جدید برای استفاده در دور بعدی به وسیله روش‌های تکثیر توام با جهش مانند تکنیک "واکنش زنجیره‌ای پلیمر از مستعد جهش[13] تکثیر می شود (۱۷، ۱۶، ۱). سپس این توالی های دورشته ای به وسیله روش های مانند استفاده از آنزیم اگزونوکلئاز لامبدا [14](۱۸)، PCR نامتقارن[15](۱۹) و جداسازهای مغناطیسی استرپتاویدینی[16]تکرشته‌ای می‌شوند (۲۰).

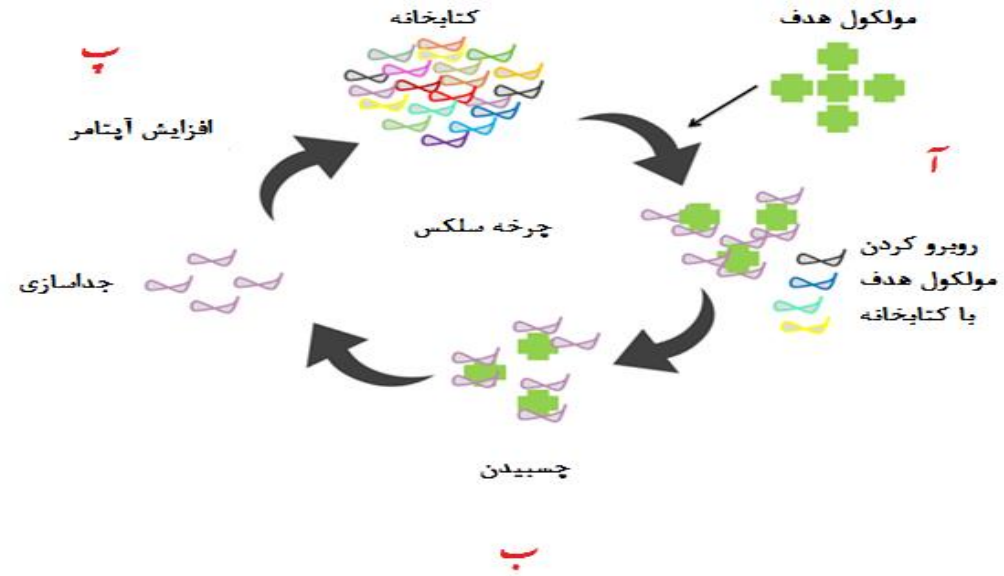
این چرخه سه مرحله ای آنقدر تکرار می شود تا ترکیب کتابخانه‌ای مملو از توالی هایی گردد که با میل پیوندی بالا قادر به اتصال با پروتئین هدف باشند که به این مرحله در اصطلاح غنی سازی می‌گویند (شکل۱). بر اساس مرحله انتخاب آپتامر که در واقع همان مرحله جداسازی

1 Nanomolar
2 Picomolar
3 Human Immunodeficiency Virus
4 Adenovirus
5 RiboNucleic Acid
6 Hairpin
7 Trans-Activation Response
8 Transactivator of Transcription
9 in vitro selection

[10]Single Stranded DeoxyriboNucleic Acid
[11] Stem
[12] Loop
[13]Error-prone Polymerase Chain Reaction
[14]Lambda Exonuclease
[15]AsymmetricPCR
[16]Stepto avidin magnetic separator

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۱: فرایند انتخاب آزمایشگاهی آپتامر (SELEX). سلکس از سه مرحله تشکیل شده است. آ) انکوباسیون کتابخانه نوکلئیک اسیدی با مولکول هدف. ب) جداسازی: جداسازی آپتامرهای متصل شده به مولکول های هدف از توالی هایی که متصل نشده اند و یا ضعیف متصل شده اند. پ) افزایش توالی های متصل شده به مولکول هدف با تکنیک PCR.

است، روش‌های مختلفی از سلکس ابداع شده است که در قسمت زیر به برخی از مهم ترین آن ها اشاره کرده و نقاط ضعف و قدرت آن را بیان می‌کنیم (۲۱).

سلکس برپایه غشاهای نیتروسلولزی

غشاهای نیتروسلولزی[1]غالبا برای تثبیت پروتئین ها در Western blotو نیز در میکروسکوپ نیروی اتمی[2] (AFM) استفاده می شوند. چون باعث تثبیت سریع، آسان و البته غیر اختصاصی آمینواسیدها می‌گردند. زمانی که روش سلکس نخستین بار به وسیله گروه Gold پایه ریزی شد، جداسازی آپتامر بر علیه DNA پلی مراز باکتریوفاژ T۴ با استفاده از غشای نیتروسلولزی انجام شد (۳). از جمله نقاط قوت این روش آسان بودن فرایند انتخاب آپتامر، عدم نیاز به تجهیزات اختصاصی و توانایی انتخاب همزمان آپتامر برای چندین هدف می‌باشد (۲۱). البته استفاده از غشاها دارای محدودیت هایی از جمله عدم توانائی اتصال به مولکول های کوچک و پپتیدها و نیز طولانی بودن دورهای انجام سلکس حتیتا ۱۲ باراست(۲۳،۲۲).

سلکس برپایه الکتروفورز مویینه

تا کنون دو نوع روش (Kinetic Capillary Electrophoresis; KCE) به نام های (Equilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures; ECMME) و (Non-equilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures; NECEEM). برای انتخاب آپتامرها مورد استفاده قرار گرفته اند. اساس جداسازی با KCE، حرکت متفاوت آپتامرهای متصل شده به مولکول هدف نسبت به آپتامرهای اتصال نیافته است (۲۴). یکی از فواید استفاده از روش الکتروفورز مویینه برای انتخاب آپتامرها، قابلیت این روش در استفاده از اهداف موجود در محلول است، در حالی که در روش‌های مرسوم، مولکول هدف، باید به فاز ساکن متصل شود. به طور کلی قدرت تفکیک سلکس بر پایه الکتروفورز مویینه، حداقل ۲ برابر انواع مرسوم (فیلتراسیون و کروماتوگرافی ستونی) است (۲۵). الکتروفورز مویینه نسبت به دیگر روش های جداسازی دارای مزیت های سرعت بالا، دقت زیاد، سادگی انجامو حجم کم نمونه مورد نیاز است. علت اصلی استفاده از این روش برای سلکس این است که می‌توان با کمترین تعداد چرخه سلکس (۲-۴دور) به بیشترین میل پیوندی دست یافت (۱). از ایرادهای این روش که استفاده از آن را

[1] Nitrocellulose Membrane
[2] Atomic Force Microscopy

www.SID.ir

Archive of SID

محدود می‌کند، می‌توان به ظرفیت پایین کتابخانه آپتامری و همچنین نیاز به وسایل و تجهیزات اختصاصی اشاره کرد (۲۱).

سلکس سلولی

در سلکس بر پایه سلول[1]، سلول‌های زنده به عنوان هدف برای انتخاب آپتامرها استفاده می‌شوند. زیرا استفاده از سلول، مراحل پر زحمت تولید خالص پروتئین نوترکیب را ندارد. علاوه بر این، با این روش می‌توان بر علیه اهداف غیر پروتئینی نیز آپتامر ساخت. چنین آپتامرهایی می‌توانند در پزشکی مولکولی، کشف زیست نشانگرها[2] و تشخیص و درمان بدخیمی ها استفاده شوند (۲۶). در این روش، جهت جداسازی آپتامرهای متصل شده، از افزایش درجه حرارت استفاده می‌شود. در مرحله انتخاب منفی، آپتامرهای جدا شده با سلول های تک لایه که فاقد مولکول هدف می‌باشند مجاور می‌شوند (۱). آپتامرها در این روش می‌توانند بر علیه طیف گسترده ای از مولکول-های هدف تولید شوند، زیرا سطح سلول یک مجموعه پویا و پیچیده از مولکول‌های هدف است که در شکل طبیعی خود هستند و به حالت فیزیولوژیک و درون تنی[3] نزدیک تر می‌باشند (۲۷). برای موفقیت در انتخاب آپتامر به روش سلکس بر پایه سلول، دو شرط باید رعایت شود. نخست، استفاده از کشت سلولی با خلوص بالا (دست کم ۹۵ درصد) و دوم، حیات سلول هاست. مرگ سلولی، منجر به تغییر شکل سلول، الگوی بیان مولکول های سطحی آن و حتی گاهی جذب غیر اختصاصی آپتامرها می‌شود (۲۶). در مواردی، فراهم کردن چنین میزانی از خلوص و تراکم از سلول های زنده کار چندان ساده ای نیست. برای نمونه تولید آپتامر علیه شاخص های سطحی سلول های دندریتیک می تواند چالش برانگیز باشد زیرا تعداد سلول‌های دندریتیک در بافت ها اندک است. ولی راه حل هایی مانند استفاده از رده‌های سلولی با خصوصیات مشابه وجود دارد (۲۸).

سلکس با به کارگیری سطوح یا دنباله های تمایلی

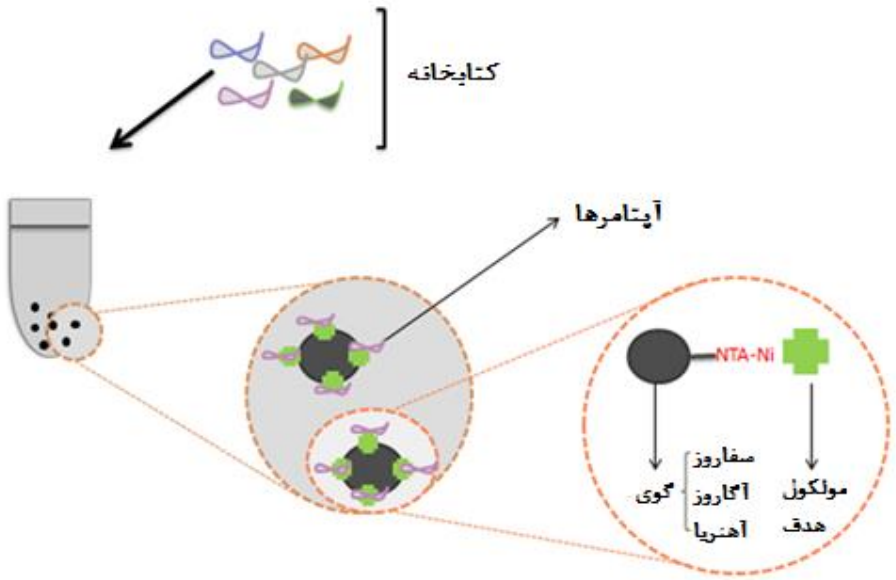
کروماتوگرافی بر پایه میل پیوندی[4]، روشی برای جداسازی یک هدف از یک مخلوط بیوشیمیایی است. این روش در ابتدا برای تخلیص پروتئین های نوترکیب استفاده می‌شد، میانکنش هایی چون میانکنش گیرنده - لیگاند[5] و یا آنتی ژن - آنتی بادی[6]، اساس جداسازی در این روش است. در مورد مولکول های آلی کوچک، مولکول هدف به صورت کووالانسی روی گوی[7] ثابت می‌شود (۲۹). استفاده از دنباله های تمایلی[8] موجب کاربردی شدن این روش برای انواعی از مولکول های هدف شده است. به عنوان مثال پروتئین‌های تولید شده با دنباله هیستیدینی (6x His) را می‌توان به وسیله تمایل ذاتی هیستیدین ها به نیکل نیتریلوتری استیک اسید (Ni-NTA) جدا کرد. نمونه های دیگر عبارت اند: از رزین[9]های Amylose، پروتئینمتصل شونده به مانوز[10](MBP)، Glutathione S-Transferase(GST)، و همچنین گروه های شیمیایی مانند Amine، Thule و Carboxyl. سهولت تنظیم دقیق شرایط انتخاب و سادگی وسایل مورد نیاز، موجب علاقه مندی به استفاده از این روش در سلکس شده است (شکل ۲). با استفاده از این روش می‌توان آپتامرهای متصل شده به اهدافی که بر روی ستون افینیتی کروماتوگرافی ثابت شده‌اند جدا نمود (۳۱-۲۹). به وسیله کروماتوگرافی تمایلی می‌توان تنها در یک چرخه، میزان خلوص را به ۹۵٪ رساند. از محدودیت های استفاده از این روش، نیاز به انجام تعداد دورهای بالا (۱۲ تا ۱۵ دور) برای رسیدن به یک آپتامر با حداکثر اختصاصیت و همچنین طولانی شدن مرحله تکثیر هنگام استفاده از کتابخانه های ریبونوکئیک اسیدی است (۳۲). محدودیت دیگر این روش آن است که نمی‌تواند برای اهدافی که فاقد دنباله تمایلی و یا گروه های عملکردی[11] مورد نیاز برای اتصال به گوی‌ها هستند استفاده شود (۱۷). انتخاب بر پایه کروماتوگرافی تمایلی معمولاً به دو روش مختلف انجام می‌شود (۳۲).

[1] Cell-SELEX
[2] Biomarker
[3] In vivo

[4] Affinity Chromatography
[5] Receptor- Ligand
[6] Antigen- Antibody
[7] Bead
[8] Affinity tags
[9] Resin
[10] Mannose Binding Protein
[11] Functional group

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: سلکس بر پایه کروماتوگرافی تمایلی: در این روش ابتدا مولکول هدف مورد نظر را بر روی گوی ها ثابت می‌کنند و سپس با شستشوی گوی‌ها، ترکیبات و مولکول‌های متصل نشده را خارج می‌نمایند. در پایان، کتابخانه نوکلئیک اسیدی را با گوی‌هایی که دارای مولکول هدف مورد نظر هستند روبرو می‌کنند.

الف: در حالت دسته‌ای[1]، حداکثر ۲۰۰ میکرولیتر[2] از رزین متصل به هدف، با توالی های کتابخانه مواجه می‌شود و یا در حالت دیگر مولکول های رزین خالی با مخلوطی از مولکول های هدف و توالی های کتابخانه روبه‌رو می‌شوند. توالی های اتصال نیافته، حذف و توالی-های متصل شده به هدف روی رزین، برای ادامه فرایند با محلول های دیگر مواجه می‌شوند. حالت دسته ای، به ویژه برای اهداف چندگانه، فرایند پر زحمتی است زیرا باید به صورت دستی انجام و چندین بار تکرار شود (۳۲).

ب: در حالت جریانی[3] از ستون‌های کوچک حداکثر ۳/۵ میلی لیتری که با رزین پر شده‌اند، استفاده می شود. فایده اصلی این روش، محدود بودن رزین‌ها به ستون است که موجب خودکار شدن فرایند با کمک پمپ و یا سانترفیوژ، می‌شود. در مطالعه ای، پژوهشگران از ریز ستون‌های چند بار مصرفی که حداکثر ۵۰ میکرولیتر رزین را می توانست در خود جای دهد برای تولید آپتامرهای با تمایل بالا علیه عوامل شوک حرارتی انسانی[4]استفاده کردند (۳۲).

مزایای آپتامرها نسبت به آنتی بادی ها

بزرگترین مزیت آپتامرها نسبت به آنتی بادی‌ها، عدم نیاز به گونه حیوانی برای تولید است. برای تولید آنتی بادی بر علیه یک هدف، نخست باید سامانه ایمنی[5] حیوان برعلیه آن تحریک شود. اما تولید آپتامرها آزمایشگاهی است و همچنین مسایل اخلاقی کار با حیوان را ندارد (۳۴). ممکن است مولکول هدف، خاصیت سمی داشته باشد و نتوان با ایمن کردن حیوان بر علیه آن، آنتی بادی تهیه کرد. از طرفی درصورتی که پروتئین هدف، به پروتئین-های آن حیوان شبیه باشد، ممکن است سامانه ایمنی برانگیخته نشود. هزینه پایین و سهولت، دیگر مزیت آپتامرهاست. همچنین آپتامر نسبت به آنتی بادی کامل، اندازه بسیار کوچکتری دارد و می تواند به جایگاه هایی که محدودیت فضایی دارند متصل شود (۳۵). حداقل جرم مولکولی یک هدف برای تولید آنتی بادی بر ضد آن، ۱۰۰۰ دالتون است و جرم مولکولی ایمونوژن‌ها معمولاً بیش از ۶۰۰۰ دالتون می باشد (۳۶). در حالی که حتی برای اندازه‌هایی به کوچکی یون‌ها نیز می توان آپتامر ساخت (۵). از آنجایی که آنتی بادی ها مولکول هایی گلیگوزیله[6] هستند و عمدتاً توسط کشت های سلولی

[1] Batch mode
[2] Microliter
[3] Flow mode
[4] Human Heat Shock Factor
[5] Immune system
[6] Glycosylated

www.SID.ir

Archive of SID

یوکاریوتی[1] تولید می‌شوند، حفظ ثبات تولید بسیار دشوار است. زیرا اندکی تغییر در متغیرهای رشد این سلول ها نظیر ترکیبات محیط کشت، باعث تغییر در الگوی گلیکوزیله شدن آنتی بادی می‌شود (۳۸، ۳۷). این مسئله می‌تواند کارایی درمانی (به دلیل تغییر در تمایل آنتی بادی به گیرنده‌های Fc[2]) و ایمنی یک آنتی بادی (به دلیل ایمنی زا بودن بسیاری از الگوهای قندی) را به راحتی زیر تاثیر قرار دهد (۳۵). اما تولید آپتامرها، آزمایشگاهی است و این مشکلات را دست کم در صورتی که تغییرات اضافی بر روی آن اعمال نشود ندارند.

کاربردهای تشخیصی آپتامرها

می توان آپتامرها را به وسیله تغییرات شیمیایی با لومینوفورها و یا اتصال به نانوذرات مختلف، در زیست ها[3] استفاده کرد (۳۹). برای نمونه در یک مطالعه، به منظور تشخیص اسپور آنتراکس، DNA آپتامر علیه اسپور Bacillus Anthracis، در شکل یک ساندویچ (آپتامر- گوی مغناطیسی-الکتروکمیلومینسانس) تولید شد (۴۰). آپتامر ضد اسپور، بر روی گوی مغناطیسی Dynal M-280 سوار شده بود.جزء گزارشگریک آپتامر متصل بیوتین و مبدل سیگنال[4] در این زیست حسگر، streptavidin Ru(bpy)32+ ECL بود (۴۰). اندازهکوچک آپتامرها نسبت به آنتی بادی ها امکان ایجاد تراکم های بالاتری را در تثبیت آن ها می‌دهد که می تواند در تهیه زیست آرایه ها [5] و ریزتراشه‌های زیستی[6] اهمیت زیادی داشته باشد. برای اطلاعات بیشتر از انواع زیست‌حسگرهای آپتامر محور به مرجع شماره (۵) مراجعه کنید. مشکلی که استفاده بالینی از زیست حسگرهای آپتامری وجود دارد، حساسیت نوکلئازی آپتامرها است. زیرا نوکلئازها در مایعات بدن حضور دارند (۴۱). یکی دیگر از کاربردهای تشخیصی، کشف زیست شاخص های سلول های سرطانی و تهیه آپتامر بر علیه این شاخص ها جهت تشخیص و عکس برداری از بافت های سرطانی است. برای اطلاع از این کاربردها به مرجع (۴۱) رجوع کنید.

آپتامرها به عنوان راهبردهای درمانی

یکی از کاربردهای آپتامرها استفاده از آن ها به عنوان مولکول های کوچک درمانی است. به طور کلی آپتامرها در دو مسیر برای کاربردهای درمانی استفاده می شوند:

الف: آپتامرها می توانند میانکنش های پروتئین- پروتئین را مهار کنند، به این صورت که به پروتئین هدف خود متصل شده و مانع از اتصال آن با لیگاند خود می شوند (نقش آنتاگونیستی یا مهارگر) (۴۱).

ب: آپتامرها می توانند به عنوان آگونیست (تقلیدکننده) عمل کنند به این معنی که با اتصال به پروتئین هدفشان، موجب افزایش فعالیت آن شوند (۴۱).

اگرچه آپتامرها در این دو راه، شبیه آنتی بادی ها عمل می‌کنند ولی ایمونوژن نبودن آن ها سبب برتری نسبت به آنتی بادی ها شده است، هرچند که اندازه کوچک شان در مقایسه با آنتی بادی ها موجب شده که آسان تر به وسیله بافت ها برداشته شوند (۴۱).آنتی‌بادی ها نخستین مولکول‌های ایمونولوژیکی بودند که بر ضد آن ها آپتامر تولید شد (۴۶-۴۲). آپتامری ضد IgE تولید شده که مانع از اتصال این آنتی بادی به گیرنده FCεR-I و بنابراین مانع از برقراری برخوردهای پاتوژنیک IgE و گیرنده آن می شود، در نتیجه می تواند در بیماری های آلرژیک مانند آلرژی و آسم به کار رود (۲۸). همچنین این آپتامر می تواند در موارد تشخیصی برای آشکار نمودن IgE استفاده شود (۴۷).

سایتوکاین‌ها که بر روی تکثیر، فعالیت و مهار سلول-های سامانه ایمنی اثر گذارند، همچنین نقش مهمی در تنظیم مدت زمان پاسخ و شدت پاسخ ایفا می‌کنند (۲۵). برای نمونه اینترفرون گاما[7](IFN-γ) که به وسیله لنفوسیت های فعال، سلول های دندریتیک و NK-Cell -ها تولید می شود، فعالیت سلول های ایمنی را افزایش داده و همچنین موجب افزایش پاسخ های ضد توموری می شود. بنابراین اینترفرون گاما می تواند برای درمان تومورها مفید باشد (۴۸). اما این سایتوکاینا‌ز طرفی می-تواند موجب بروز بیماری های خودایمن[8] شود (۴۹). آپتامری بر علیه این سایتوکاین تولید شده که مانع از اتصال اینترفرون گاما به گیرنده اش شده و بنابراین در درمان بیماری های التهابی می تواند مفید باشد (۴۹).

[1] Eukaryote cell
[2] Fragment Crystallizable
[3] Biosensor
[4] Transducer
[5] Bioarray
[6] Micro bioarray
[7] Gamma Interferon
[8] Auto immune

www.SID.ir

Archive of SID

انکوستاتین M، عضوی از خانواده سایتوکاینی IL-6 می‌باشد. این سایتوکاین نیز همانند اینترفرون گاما می‌تواند موجب تشدید بیماری های خود ایمن شود. ساخت آپتامری که آنتاگونیست این سایتوکاین باشد می‌تواند در انتقال پیام بوسیله گیرنده این سایتوکاین رقابت کند و موجب کاهش این پیام رسانی گردد (۵۰). فاکتور تغییر دهنده رشد[1]β1 وβ2 (TGF-β1 و-TGF β2) می تواند موجب القای رشد و یا مرگ برنامه ریزی شده سلول (آپپتوز) گردد. فعالیت مهاری TGF-β می‌تواند در درمان سرطان مفید باشد. آپتامرهای آنتاگونیست برای هر دو هدف توسعه پیدا کرده اند (۵۲ ،۵۱).

کاربردآپتامرها برای هدایت هدفمند داروها

توانایی آپتامرها برای شناسایی اختصاصی یک هدف و توانایی ایجاد تغییر در آن، آن ها را به عنوان ابزاری برای هدایت هدفمند مطرح کرده است. DNA آپتامرها به دو روش برای دارورسانی[2] هدفمند استفاده می شوند:

۱) اتصال مستقیم به مولکول های دارو

۲) ترکیب با نانوذرات برای ایجاد یک بستر[3] دارو رسانی

هدایت هدفمند داروها با آپتامرها یک مسیر بالقوه برای دارورسانی اختصاصی فراهم می‌کند و عوارض ناشی از استفاده عمومی داروها را به حداقل می‌رساند (۴۱). DNA آپتامرهای بسیاری برای هدایت موثر داروهای شیمی درمانی مانند دوکسوروبیسین، فلورویوراسیل و اپی روبیسین مطالعه شده‌اند(۵۴، ۵۳). علاوه بر هدایت دارو، آپتامرها می توانند به عنوان یک وسیله هدایت ژن برای si RNA (RNAهای تداخلگرکوچک)،micro RNA (miRNA) وshRNA (RNA سنجاق سری کوچک) عمل کنند (۵۷-۵۵). ژن درمانی برای سرطان حوزه بسیار جذابی را در زمینه تحقیقات فراهم آورده است و دو سوم تمام کارآزمایی های ژن درمانی بر روی درمان سرطان متمرکز شده‌اند. آپتامرهای هدایتگر اسیدنوکلئیک می توانند از طریق داخل توموری، درون رگی و زیرپوستی تزریق شده و به محض تزریق، آپتامرها با DNA و یا RNA سلول میزبان و یا سلول سرطانی برای تغییر بیان ژن وارد عمل می شوند (۵۸). محدودیت آپتامرها در بکارگیری برای ژن درمانی نیمه عمر پایین آن ها در گردش خون (حذف از طریق سیستم کلیوی) و حساسیت به نوکلئازهای موجود در مایعات بیولوژیک است که می-توان با ایجاد تغییراتی در اسکلت اسیدنوکلیئیکی و یا همراه کردن با پلی اتیلن گلیکول[4] (PEG) بر این محدودیت ها فایق آمد (۶۱-۵۹،۵۵).

پگاپتانیب، اولین آپتامر دارای تائیدیه سازمان غذا و دارو[5]

بیماری AMD نئوواسکولار[6]، قسمت میانی شبکیه (ماکولا) را درگیر می کند. ماکولا، دید مرکزی را برای انسان فراهم می کند و برای دیدن جزئیات بسیار ضروری است. در AMD، رگ‌زایی غیر طبیعی در این ناحیه از چشم، با نشت مایعات و خونریزی، باعث تورم می شود و دید مرکزی به صورت تدریجی از بین می رود (۸۷). بسیاری از مطالعات نشان داده اند که فاکتور رشد اندوتلیال عروقی[7](VEGF)، در پاتوژنز این بیماری نقش اساسی دارد (۶۳، ۶۲). یک RNA آپتامر۲۸ نوکلئوتیدی با نام پگاپتانیب[8] که به طور اختصاصی ایزوفرم[9] ۱۶۵ آمینواسیدی VEGF (VEGF165) را هدف می‌گیرد و از اتصالش به گیرنده آن (VEGFR) بر روی سلول‌های اندوتلیال و در نتیجه رگ‌زایی پاتولوژیک جلوگیری می‌کند در سال ۱۹۹۸ وارد کارآزمایی بالینی[10] شد (۶۳). قندهای موجود در این آپتامر جهت افزایش مقاومت به نوکلئازها، تغییر داده شده اند و نیز برای بالا بردن نیمه عمر آن، دو زنجیره پلی اتیلن گلیکول به آن متصل شده است (۶۳). مطالعات نشان داده اند که تجویز این دارو می‌تواند از رگ‌زایی نابجای چشمی ممانعت نماید. نهایتاً این دارو در سال ۲۰۰۴ میلادی، توانست تائیدیه سازمان غذا و دارو (FDA) را برای درمان نوع مرطوب یا همان AMD نئوواسکولار به دست آورد. برند تجاری این

[1] Transforming Growth Factor
[2] Drug delivery
[3] Platform
[4] Polyethylene Glycol
[5] Food and Drug Administration
[6] Neovascular Age-Related Macular Degeneration
[7] Vascular Endothelial Growth Factor
[8] Pegaptanib
[9] Isoform
[10] Clinical trial

www.SID.ir

Archive of SID

محصول، Macugen یک محلول تزریق چشمی است که ماده مؤثره آن پگاپتانیب است (۸۷).

محدودیت های آپتامرها درکاربردهای درمانی

یکی از محدودیت های درمانی آپتامرها نسبت به آنتی-بادی ها، ناتوانی آپتامر در راه اندازی آبشار کمپلمان[1] و نیز ناتوانی در به خدمت گرفتن سلول های سامانه ایمنی برای حذف عامل بیماری زا است. آنتی بادی های درمانی که اکثراً از کلاس IgG می باشند (۳۵)، این مزیت بزرگ را دارند که به واسطه قطعه ثابت خود (Fc) قادرند با به کارگیری برخی سلول های ایمنی، کشتار با واسطه آنتی-بادی[2] (ADCC) را انجام دهند و نیز قادرند کمپلمان را فعال کنند (۶۵، ۶۴). آنتی بادی ها نه تنها توانایی خنثی یا مسدود کردن یک مولکول/عامل بیماری زا را دارند، بلکه با این دو سازوکار قادرند عامل بیماری زا را با اپسونیزه کردن[3]، به طور مستقیم حذف کنند و نیز با افزایش برداشت آن توسط سلول های عرضه کننده آنتی-ژن[4]، شکل گیری یک ایمنی خاطره بر علیه عامل بیماری زا را تقویت کنند (۶۵). این ویژگی آنتی بادی ها، در بسیاری از مطالعات، برای افزایش پاسخ ایمنی نسبت به یک ایمونوژن به کار گرفته شده است؛ به این صورت که ایمونوژن مربوطه، جهت افزایش برداشت توسط سلول-های عرضه کننده آنتی ژن (همچون سلول های دندریتیک)، به قطعه Fc از IgG متصل می‌شود تا به کمک گیرنده Fc[5] که روی سطح این سلول هاست برداشت شود (۶۶). دیگر محدودیت درمانی مهم آپتامرها به ویژه RNA آپتامرها، حساسیت آن ها به نوکلئازها می باشد (۶۷). خوشبختانه راه حل‌های زیادی برای مقاوم کردن آپتامرها به تجزیه نوکلئازی ارائه شده است. ایجاد تغییرات در نوکلئوتیدها یا استفاده از نوکلئوتیدهای تغییر یافته، کلاهک گذاری آپتامرها[6]، اشپیگلمر[7] و استفاده از آنالوگ های صناعی اسیدهای نوکلئیک از جمله راه کارهای ارایه شده برای مقابله با هضم نوکلئازی آپتامرها است (۴۱). در ادامه به طور مشروح به این راه حل‌ها پرداخته خواهد شد.

ایجاد تغییرات شیمیایی بر روی نوکلئوتیدها

می‌توان با ایجاد تغییرات شیمیایی روی بخش های مختلف نوکلئوتیدها، حساسیت الیگونوکلئوتیدها به هضم نوکلئازی را کاهش داد. تغییرات می‌تواند روی بخش قندی، گروه فسفات یا باز آلی نیتروژن دار اعمال شود.

۱. از آنجایی که بیشتر نوکلئازهای موجود در مایعات زیستی، نوکلئازهای ویژه پیریمیدین هستند، می توان با ایجاد تغییر در کربن ۲ حلقه ریبوز پیریمیدین (´۲) از طریق افزودن آمینو (NH2) یا فلوئور (F)، متوکسی (OCH3) به کربن ۲ ریبوزو به وجود آمدن ´۲-آمینو ریبونوکلئوتید و ´۲-فلورو ریبونوکلئوتید و نیز افزودن یداید (I)، کلراید (Cl)، بروماید (Br)، آمینو و یا آزید (N3) به موقعیت پنجم ریبوز (۶۹، ۶۸) مقاومت الیگونوکلئوتیدهای RNA در برابر تخریب به وسیله نوکلئازها را بالا برد و نیمه عمر آنها را تا ۱۵ ساعت افزایش داد (۷۰).

۲. تغییرات می‌توانند روی بخش فسفات نیز انجام شوند. جایگزین کردن یک یا دو اتم اکسیژن فسفات متصل به ریبوز (گروه فسفاتی که نهایتاً در ساختار اسیدنوکلئیک باقی می ماند) با اتم گوگرد و به ترتیب ایجاد فسفوروتیوآت و فسفورو دی تیوآت، همچنین جایگزین کردن این اکسیژن، با گروه متیل و ایجاد متیل فسفونات، حساسیت الیگونوکلئوتیدها به نوکلئازها را تا حدی کاهش می دهد (۷۱، ۶۸).

۳. افزودن گروه آمین یا بروم به کربن شماره ۵ باز پیریمیدین (C-5 position) و یا افزودن گروه‌های متیل، تری فلورومتیل و فنیل، به باز نیتروژن دار مقاومت نوکلئازی آپتامرها را بالا می برد (۷۱، ۶۹).

اشپیگلمر

واژه اشپیگلمر(Spiegelmer) از ریشه آلمانی اشپیگل (Spiegel) به معنی آینه، به آپتامر هایی اطلاق می‌شود که از انانتیومر[8] (ایزومر نوری) نوع L اسید های نوکلئیک (به جای شکل طبیعی اسید های نوکلئیک که از

[1] Complement
[2] Antibody Dependent Cell Cytotoxicity
[3] Opsonization
[4] Antigen Presenting Cell
[5] Fc Receptor
[6] Capping
[7] Spiegelmer
[8] Enantiomer

www.SID.ir

Archive of SID

واحدهای نوع D ترکیب یافته اند) ساخته شده‌اند و بنابراین توسط نوکلئازهای موجود در طبیعت، شناسایی و تجزیه نمی شوند و ایمنی‌زایی پایینی دارند. به دلیل زیست پایداری[1] بسیار بالا، اشپیگلمرها مولکول های جذابی برای توسعه داروهای جدید می‌باشند. فرایند تولید اشپیگلمر، درست مانند تولید آپتامرهای طبیعی است با این تفاوت که کتابخانه های طبیعی RNA یا DNA با تصویر آینه ای مولکول هدف، مورد انتخاب/غربالگری آزمایشگاهی قرار می‌گیرند. به عنوان مثال برای تولید یک آپتامر اشپیگلمر بر علیه یک مولکول پروتئینی (مثلا یک آنتی ژن)، باید ابتدا تصویر آینه ای از هدف پروتئینی(با واحد های نوع D) ساخته شود. در پایان کار، یک توالی آپتامری بر علیه تصویر آینه ای آن هدف پروتئینی به دست می آید. بنابر قانون تقارن، تصویر آینه ای آپتامر انتخاب شده (یعنی توالی آپتامر به دست آمده از سلکس، این بار از نوکلئوتید های نوع L ساخته شود نه از نوع طبیعی D)، می‌تواند با همان تمایل و اختصاصیت، به شکل طبیعی پروتئین هدف متصل شود. معمولاً در تولید اشپیگلمرها، هم مولکول/ اپی توپ هدف و هم توالی اشپیگلمر، با روش سنتز شیمیایی ساخته می‌شوند (۷۵-۷۲).

آپتامرهای با آنالوگ های اسیدهای نوکلئیک

اسید نوکلئیک قفل شده[2](LNA)، که نام دیگر آن 2′-O,4′-C-methylene-β-Dribonucleic) BNA acids) می‌باشد، در اواخر دهه ۱۹۹۰، به طور جداگانه توسط دو گروه تحقیقاتی، یکی "Jesper Wengel" و همکاران او در دانشگاه کپنهاگ دانمارک و دیگری، گروه "Takeshi Imanishi" در دانشگاه اوساکای ژاپن ابداع گردید (۷۷، ۷۶). مولکول LNA، شبیه RNA می باشد با این تفاوت که کربن ۲ و ۴ ریبوز توسط یک پل متیلنی به هم قفل شده است. پلیمر حاصل از این واحد ها، می تواند هیبرید بسیار پایداری با اسیدنوکلئیک دارای توالی مکمل خود به وجود آورد. این پلیمر چون در طبیعت یافت نمی شود، مقاومت نوکلئازی بالا و سمیت اندکی دارد (۷۸). بنابراین اگر آپتامری از این مولکول ایجاد شود قاعدتاً پایداری بالاتری نسبت به آپتامرهای طبیعی خواهد داشت. مولکول اسیدنوکلئیک پپتیدی یا (Peptide Nucleic Acid; PNA) از دیگر آنالوگ های پرکاربرد اسیدهای نوکلئیک است و در سال ۱۹۹۱ توسط "Nielsen" در کپنهاگ دانمارک ایجاد شد (۷۹). این پلیمر نیز از واحدهای غیر طبیعی به وجود آمده است. هر یک از واحدهای PNA که متناظر با یک نوکلئوتید در اسیدهای نوکلئیک می‌باشد، از یک باز آلی طبیعی و یک واحد "اِن-(۲-آمینواتیل) گلایسین" تشکیل شده است. پلیمر PNA می تواند به صورت بسیار اختصاصی، با تمایل بالایی به ناحیه مکمل خود در RNA یا DNA هیبرید شود. ستون فقرات این پلیمر، قند فسفاتی نیست بلکه شبیه پلی پپتیدها، آمیدی می باشد، لذا به دلیل نبود دافعه بین گروه های فسفات، پایداری بسیار بالاتری نسبت به هیبرید های طبیعی نشان می دهد (۸۰). این پلیمر نیز به علت غیر طبیعی بودن، به حملات نوکلئازها[3] و پروتئازها[4] مقاوم است و نیمه عمر بالایی دارد. هم LNA و هم PNA در بسیاری از مطالعات به عنوان آنتی سنس، آنتی ژن و پروب تشخیصی مورد استفاده قرار گرفته اند(۸۱، ۷۸). مشکل اساسی تولید آپتامر با این آنالوگ ها، در دسترس نبودن آنزیمی است که بتواند آن ها را تکثیر کند. تلاش های بسیاری در دهه گذشته برای درج نوکلئوتیدهای آنالوگ در ساختار اسیدهای نوکلئیک صورت گرفته است (۷۸).

در سال ۲۰۱۲ یک گروه تحقیقاتی، با مهندسی نسخه-ای از پلیمراز همانندسازی کننده ترموکوکوس گورگوناریوس، موسوم به TgoT، پلیمرازهایی تولید کردند که قادرند ۶ نوع از آنالوگ های نوکلئیک اسیدی را پلیمریزه کنند. دو تا از این پلیمرازهای مهندسی شده با نام PolC7 و PolD4K سنتتازهای کارایی برای LNA بودند و پلیمراز RT521K قادر به رونویسی معکوس LNA بود (۸۲). این گروه تحقیقاتی سپس توانستند با یکی از این ۶ پلیمر (1,5Anhydrohexitol Nucleic Acid: HNA) و با بهره گیری از پلیمراز مهندسی شده، آپتامرهایی با ثابت تفکیک در محدوده نانومولار بسازند. این HNA آپتامرها علیه TARو (Hen Egg Lysozyme; HEL) و با استفاده از سلکس گوی های مغناطیسی به وجود آمدند. با این حال، تاکنون

[1] Bioavailable
[2] Locked Nucleic Acid
[3] Nuclease
[4] Protease

www.SID.ir

Archive of SID

هیچ LNA آپتامری با استفاده از انتخاب آزمایشگاهی به وجود نیامده است. در سال ۲۰۱۳، گروه تحقیقاتی کوواهارا، موفق به تولید آپتامر ضد ترومبینی باتمایل بالا(ثابت تفکیک برابر ۱۰ نانومولار) با استفاده از روش CE-SELEX شدند که در توالی خود واحدهای LNA را داشت. این آپتامر از کتابخانه های DNA تغییر یافته (دارای واحدهای LNA) و با استفاده از پلیمرازهای پذیرنده نوکلئوتیدهای LNA(-'5-B/L nucleoside triphosphate) تولید گردید (۸۳). برای تکامل مولکولی PNA نیز، چالش اصلی، توسعه سامانه‌ای است که بتوان با آن PNA را تکثیر نمود. یکی از روش های غیر آنزیمی که برای تکثیر PNA ارایه شده است، آمیناسیون احیائی با الگوی DNA می باشد. در این روش توالی های کوچک PNA که در یک انتهای خود یک گروه عاملی مثلا آلدهید دارند، به توالی مکمل خود در DNA الگو هیبرید می‌شوند و در حضور سدیم سیانوبوروهیدرید (NaBH3CN) پلیمریزه می شوند (۸۵، ۸۴). در زمینه PNA آپتامرها، یک مورد ثبت اختراع نیز وجود دارد (WO 2012108675 A3).

بحث و نتیجه گیری

در این مقاله، برخی از روش های تولید و انتخاب آپتامرها به همراه فهرستی از مزایا و کاستی های این عوامل ارائه شد. آپتامرها نسبت به آنتی بادی ها دارای مزایایی هستند که موجب ایجاد چشم انداز جدیدی برای استفاده از آن ها در روش های تشخیصی و درمانی گردیده است. سامانه ایمنی حیوان، جایگاه هایی از پروتئین هدف را به منظور اتصال به مولکول آنتی بادی، برمی گزیند، اما فرایند انتخاب آپتامر را می توان به گونه ای برنامه ریزی کرد که مولکول آپتامر به جایگاه های ویژه و از پیش تعیین شده-ای از مولکول هدف متصل گردد. آنتی بادی تولیدی بر علیه مولکول هدف، تنها در شرایط فیزیولوژیک (محدوده باریکی از دما، اسیدیته و قدرت یونی) به پروتئین هدف متصل گردد اما آپتامرها این محدودیت را ندارند. پس از گذشت نزدیک به ۳ دهه از معرفی آپتامر، شاهد پیشرفت های بزرگی در این زمینه از علم بوده ایم. تولید آپتامر، از فرایندی دستی و زمان بر، به فرایندی بسیار سریع و خودکار تبدیل شده است. گرچه آپتامرها توانسته اند جایگاه خود را در تشخیص (دست کم در بعد تحقیقاتی) به دست آورند، اما به جز یک مورد یعنی داروی ماکوژن، هیچ آپتامری نتوانسته است فاز سوم کارآزمایی بالینی را با موفقیت پشت سر بگذارد. همان طور که گفته شد یکی از دلایل این مسئله، کوتاه بودن نیمه عمر آپتامرها در محیط بدن به دلیل تجزیه نوکلئازی است. به نظر می رسد اشپیگلمر، راه حل مناسبی برای این منظور باشد. اما نیاز به ساخت آنتی ژن یا پروتئین هدف با واحدهای نوع D، یک محدودیت محسوب می شود زیرا دستگاه های سنتز صناعی پپتید[1]، محدودیت طول دارند. البته می‌توان این مشکل را با سنتز اپیتوپ خاصی از مولکول هدف مرتفع کرد که نیازمند طراحی های قبلی است (۸۶). همچنین با روش های اتصال پپتیدی می‌توان طول های بزرگتری را نیز ساخت (۸۷). با توسعه روش های آنزیمی و شیمیایی برای تکثیر آنالوگ هایی چون LNA و PNA، به نظر می رسد مشکل تجزیه نوکلئازی در آینده حل شود. علت دیگر نیمه عمر پایین آپتامرها، حذف سریع از خون توسط کلیه هاست زیرا آپتامرها اندازه کوچکی دارند. همان طور که در مورد ماکوژن گفته شد این مشکل را می توان تاحدودی با اتصال زنجیره های پلی اتیلن گلیکول، حل نمود. برای مثال نیمه عمر ماکوژن در تزریق زیرپوستی به میمون، ۱۲ ساعت است که این در مقایسه با نیمه عمر حداکثر چند دقیقه ای آپتامرهای تغییر نیافته قابل توجه است (۸۸، ۸۶). با توجه به موارد گفته شده، امید می‌رود آپتامرهای اسید نوکلئیکی در آینده ای نه چندان دور، به تنهایی یا به صورت ترکیب با سامانه های دارویی دیگر بتوانند جایگاه واقعی خود را در صنعت دارو به دست آورند.

منابع

1. Sullenger BA, Gallardo HF, Ungers GE, Gilboa E. Overexpression of TAR sequencesrenders cell resistant to human immunodeficiency virus replication. Cell 1990; 63(3): 601-8.

2. Song K-M, Lee S, Ban C. Aptamers and their biological applications. Sensors 2012; 12(1): 612-31.

3. Sullenger BA, Gallardo HF, Ungers GE, Gilboa E. Overexpression of TAR sequencesrenders cell

[1] Peptide

www.SID.ir

Archive of SID

resistant to human immunodeficiency virus replication. Cell 1990; 63(3): 601-8.

4. Song K-M, Lee S, Ban C. Aptamers and their biological applications. Sensors 2012; 12(1): 612-31.

5. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. nature 1990; 346(6287): 818.

6. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. Science 1990; 249(4968): 505-10.

7. Bunka DH, Stockley PG. Aptamers come of age–at last. Nature Reviews Microbiology 2006; 4(8): 588-96.

8. Song S, Wang L, Li J, Fan C, Zhao J. Aptamer-based biosensors. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2008; 27(2): 108-17.

9. Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B. High-resolution molecular discrimination by RNA. Science 1994; 263(5152): 1425-9.

10. Hermann T, Patel DJ. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. Science 2000; 287(5454): 820-5.

11. Dollins CM, Nair S, Sullenger BA. Aptamers in immunotherapy. Human gene therapy 2008; 19(5): 443-50.

12. O'Malley RP, Mariano TM, Siekierka J, Mathews MB. A mechanism for the control of protein synthesis by adenovirus VA RNAI. Cell 1986; 44(3): 391-400.

13. Burgert HG, Ruzsics Z, Obermeier S, Hilgendorf A, Windheim M, Elsing A. Subversion of host defense mechanisms by adenoviruses. Viral Proteins Counteracting Host Defenses. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 269: Springer; 2002: 273-318.

14. Han K, Liang Z, Zhou N. Design strategies for aptamer-based biosensors. Sensors 2010; 10(5): 4541-57.

15. Marshall KA, Ellington AD. In vitro selection of RNA aptamers. Methods in enzymology 2000; 318: 193-214.

16. Harada K, Frankel AD. Identification of two novel arginine binding DNAs. The EMBO journal 1995; 14(23): 5798.

17. Syed MA, Pervaiz S. Advances in aptamers. Oligonucleotides 2010; 20(5): 215-24.

18. Cirino PC, Mayer KM, Umeno D. Generating mutant libraries using error-prone PCR. Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols 2003: 3-9.

19. Bittker JA, Phillips KJ, Liu DR. Recent advances in the in vitro evolution of nucleic acids. Current opinion in chemical biology 2002; 6(3): 367-74.

20. Higuchi RG, Ochman H. Production of single-stranded DNA templates by exonuclease digestion following the polymerase chain reaction. Nucleic Acids Research 1989; 17(14): 5865.

21. Gyllensten UB, Erlich HA. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. Proceedings of the National Academy of Sciences 1988; 85(20): 7652-6.

22. Paul A, Avci-Adali M, Ziemer G, Wendel HP. Streptavidin-coated magnetic beads for DNA strand separation implicate a multitude of problems during cell-SELEX. Oligonucleotides 2009; 19(3): 243-54.

23. Ozer A, Pagano JM, Lis JT. New technologies provide quantum changes in the scale, speed, and success of SELEX methods and aptamer characterization. Molecular Therapy—Nucleic Acids 2014; 3(8): e183.

24. Gopinath SCB. Methods developed for SELEX. Analytical and bioanalytical chemistry 2007; 387(1): 171-82.

25. Tombelli S, Minunni M, Mascini M. Analytical applications of aptamers. Biosensors and Bioelectronics 2005; 20(12): 2424-34.

26. Berezovski MV, Musheev MU, Drabovich AP, Jitkova JV, et al. Non-SELEX: selection of aptamers without intermediate amplification of candidate oligonucleotides. Nature protocols 2006; 1(3): 1359-69.

27. Berezovski M, Drabovich A, Krylova SM, Musheev M, et al. Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures: a universal tool for development of aptamers. Journal of the American Chemical Society 2005;127(9):3165-71.

28. Ganji A, Varasteh A, Sankian M. Aptamers: new arrows to target dendritic cells. Journal of drug targeting 2016; 24(1): 1-12.

www.SID.ir

Archive of SID

29. Guo K-T, Ziemer G, Paul A, Wendel HP. CELL-SELEX: Novel perspectives of aptamer-based therapeutics. International journal of molecular sciences 2008; 9(4): 668-78.

30. Moghadam M, Sankian M, Abnous K, Varasteh A, et al. Cell-SELEX-based selection and characterization of a G-quadruplex DNA aptamer against mouse dendritic cells. International immunopharmacology 2016; 36: 324-32.

31. Song K-M, Cho M, Jo H, Min K, Jeon SH, Kim T, et al. Gold nanoparticle-based colorimetric detection of kanamycin using a DNA aptamer. Analytical biochemistry 2011; 415(2): 175-81.

32. Vianini E, Palumbo M, Gatto B. In vitro selection of DNA aptamers that bind L-tyrosinamide. Bioorganic & medicinal chemistry 2001; 9(10): 2543-8.

33. Lévesque D, Beaudoin J-D, Roy S, Perreault J-P. In vitro selection and characterization of RNA aptamers binding thyroxine hormone. Biochemical Journal 2007; 403(1): 129-38.

34. Latulippe DR, Szeto K, Ozer A, Duarte FM, et al. Multiplexed microcolumn-based process for efficient selection of RNA aptamers. Analytical chemistry 2013; 85(6): 3417-24.

35. Kong HY, Byun J. Nucleic Acid aptamers: new methods for selection, stabilization, and application in biomedical science. Biomol Ther (Seoul) 2013; 21(6): 423-34.

36. Trausch JJ, Shank-Retzlaff M, Verch T. Replacing antibodies with modified DNA aptamers in vaccine potency assays. Vaccine. 2017;4; 35(41): 5495-5502.

37. Freitas Jr RA, Nanomedicine VI. Biocompatibility, Landes Bioscience, Georgetown, TX (2003). See at: http://www. nanomedicine. com/NMIIA. htm.

38. Serrato JA, Hernández V, Estrada-Mondaca S, Palomares LA, et al. Differences in the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by hybridomas cultured in serum-supplemented, serum-free or chemically defined media. Biotechnology and applied biochemistry 2007; 47(2): 113-24.

39. Cabrera G, Cremata JA, Valdés R, García R, et al. Influence of culture conditions on the N-glycosylation of a monoclonal antibody specific for recombinant hepatitis B surface antigen. Biotechnology and applied biochemistry 2005; 41(1): 67-76.

40. Hong P, Li W, Li J. Applications of aptasensors in clinical diagnostics. Sensors 2012; 12(2): 1181-93.

41. Bruno JG, Kiel JL. In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection. Biosensors and Bioelectronics. 1999; 14(5): 457-64.

42. Zhu Q, Liu G, Kai M. DNA aptamers in the diagnosis and treatment of human diseases. Molecules 2015; 20(12): 20979-97.

43. Wiegand TW, Williams PB, Dreskin SC, Jouvin MH, et al. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. The Journal of Immunology 1996; 157(1): 221-30.

44. Lee SW, Sullenger BA. Isolation of a nuclease-resistant decoy RNA that can protect human acetylcholine receptors from myasthenic antibodies. Nature biotechnology. 1997; 15(1): 41-5.

45. Hwang B, Lee S-W. Improvement of RNA aptamer activity against myasthenic autoantibodies by extended sequence selection. Biochemical and biophysical research communications 2002; 290(2): 656-62.

46. Doudna JA, Cech TR, Sullenger BA. 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): 2355-9.

47. Lee S-W, Sullenger BA. Isolation of a nuclease-resistant decoy RNA that selectively blocks autoantibody binding to insulin receptors on human lymphocytes. Journal of Experimental Medicine 1996; 184(2): 315-24.

48. Lin L, Wang H, Liu Y, Yan H, Lindsay S. Recognition imaging with a DNA aptamer. Biophysical journal 2006; 90(11): 4236-8.

49. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFNγ in protection against tumor development and cancer immunoediting. Cytokine & growth factor reviews 2002; 13(2): 95-109.

50. Kubik MF, Bell C, Fitzwater T, Watson SR, Tasset DM. Isolation and characterization of 2'-fluoro-, 2'-amino-, and 2'-fluoro-/amino-modified RNA ligands to human IFN-gamma that inhibit receptor binding. The Journal of Immunology 1997; 159(1): 259-67.

51. Rhodes A, Deakin A, Spaull J, Coomber B, et al. The generation and characterization of antagonist

www.SID.ir

Archive of SID

RNA aptamers to human oncostatin M. Journal of Biological Chemistry 2000; 275(37): 28555-61.

52. Kang J, Lee MS, Copland III JA, Luxon BA, et al. Combinatorial selection of a single stranded DNA thioaptamer targeting TGF-β1 protein. Bioorganic & medicinal chemistry letters 2008;18(6):1835-9.

53. McCauley TG, Kurz JC, Merlino PG, Lewis SD, et al. Pharmacologic and pharmacokinetic assessment of anti-TGFβ2 aptamers in rabbit plasma and aqueous humor. Pharmaceutical research 2006; 23(2): 303-11.

54. Wang R, Zhu G, Mei L, Xie Y, et al. Automated modular synthesis of aptamer–drug conjugates for targeted drug delivery. Journal of the American Chemical Society 2014; 136(7): 2731.

55. Jalalian SH, Taghdisi SM, Hamedani NS, Kalat SAM, et al. Epirubicin loaded super paramagnetic iron oxide nanoparticle-aptamer bioconjugate for combined colon cancer therapy and imaging in vivo. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2013; 50(2): 191-7.

56. Shigdar S, Ward AC, De A, Yang CJ, et al. Clinical applications of aptamers and nucleic acid therapeutics in haematological malignancies. British journal of haematology 2011; 155(1): 3-13.

57. Thiel KW, Giangrande PH. Intracellular delivery of RNA-based therapeutics using aptamers. Therapeutic delivery 2010; 1(6): 849-61.

58. Cerchia L, Esposito CL, Camorani S, Catuogno S, Franciscis VD. Coupling aptamers to short interfering RNAs as therapeutics. Pharmaceuticals 2011; 4(11): 1434-49.

59. Xiang D, Shigdar S, Qiao G, Zhou S-F, et al. Aptamer-mediated cancer gene therapy. Current gene therapy 2015; 15(2): 109-19.

60. Healy JM, Lewis SD, Kurz M, Boomer RM, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions. Pharmaceutical research 2004; 21(12): 2234-46.

61. Shigdar S, Macdonald J, O'Connor M, Wang T, et al. Aptamers as theranostic agents: modifications, serum stability and functionalisation. Sensors 2013; 13(10): 13624-37.

62. Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. Nature reviews Drug discovery 2010; 9(7): 537.

63. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and age-related macular degeneration: from basic science to therapy. Nature medicine 2010; 16(10): 1107-11.

64. Vinores SA. Pegaptanib in the treatment of wet, age-related macular degeneration. International journal of nanomedicine 2006; 1(3): 263.

65. Cordier G, Samarut C, Brochier J, Revillard J. Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity (ADCC). Scandinavian journal of immunology 1976; 5(3): 233-42.

66. Rother K, Till GO, editors. The complement system. Springer Science & Business Media; 2012 Dec 6.

67. Soleimanpour S, Farsiani H, Mosavat A, Ghazvini K, et al. APC targeting enhances immunogenicity of a novel multistage Fc-fusion tuberculosis vaccine in mice. Applied microbiology and biotechnology 2015; 99(24): 10467-80.

68. Famulok M, Mayer G, Blind M. Nucleic acid aptamers from selection in vitro to applications in vivo. Accounts of Chemical research 2000; 33(9): 591-9.

69. Ulrich H, Martins AHB, Pesquero JB. RNA and DNA aptamers in cytomics analysis. Cytometry Part A 2004; 59(2): 220-31.

70. Kanwar JR, Roy K, Kanwar RK. Chimeric aptamers in cancer cell-targeted drug delivery. Critical reviews in biochemistry and molecular biology 2011; 46(6): 459-77.

71. Heidenreich O, Eckstein F. Hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the long terminal repeat RNA of human immunodeficiency virus type 1. Journal of Biological Chemistry 1992; 267(3): 1904-9.

72. Eckstein F, Gish G. Phosphorothioates in molecular biology. Trends in biochemical sciences 1989; 14(3): 97-100.

73. Klußmann S, Nolte A, Bald R, Erdmann VA, Fürste JP. Mirror-image RNA that binds D-adenosine. Nature biotechnology 1996; 14(9): 1112-5.

74. Williams KP, Liu X-H, Schumacher TN, Lin HY, et al. Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin. Proceedings of the National Academy of Sciences 1997; 94(21): 11285-90.

75. Leva S, Lichte A, Burmeister J, Muhn P, et al. GnRH binding RNA and DNA Spiegelmers: a novel approach toward GnRH antagonism. Chemistry & biology 2002; 9(3): 351-9.

www.SID.ir

Archive of SID

76. Vater A, Jarosch F, Buchner K, Klussmann S. Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: Tailored-SELEX. Nucleic acids research 2003; 31(21): e130-e.

77. Obika S, Nanbu D, Hari Y, Morio K-i, et al. Synthesis of 2′-O, 4′-C-methyleneuridine and-cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C 3,-endo sugar puckering. Tetrahedron Letters 1997; 38(50): 8735-8.

78. Koshkin AA, Singh SK, Nielsen P, Rajwanshi VK, et al. LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. Tetrahedron 1998; 54(14):3 607-30.

79. Kuwahara M, Obika S. In vitro selection of BNA (LNA) aptamers. Artificial DNA: PNA & XNA 2013; 4(2): 39-48.

80. Nielsen PE, Berg RH. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. Science 1991; 254(5037): 1497.

81. Nielsen PE. Peptide nucleic acids: protocols and applications: Garland Science; 2004.

82. Ray A, Nordén B. Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. The FASEB Journal 2000; 14(9): 1041-60.

83. Pinheiro VB, Taylor AI, Cozens C, Abramov M, et al. Synthetic genetic polymers capable of heredity and evolution. Science 2012; 336(6079): 341-4.

84. Kasahara Y, Irisawa Y, Ozaki H, Obika S, et al. 2′, 4′-BNA/LNA aptamers: CE-SELEX using a DNA-based library of full-length 2′-O, 4′-C-methylene-bridged/linked bicyclic ribonucleotides. Bioorganic & medicinal chemistry letters 2013; 23(5): 1288-92.

85. Brudno Y, Birnbaum ME, Kleiner RE, Liu DR. An in vitro translation, selection and amplification system for peptide nucleic acids. Nature chemical biology 2010; 6(2): 148-55.

86. Rosenbaum DM, Liu DR. Efficient and sequence-specific DNA-templated polymerization of peptide nucleic acid aldehydes. Journal of the American Chemical Society 2003; 125(46): 13924-5.

87. Eulberg D, Klussmann S. Spiegelmers: biostable aptamers. Chembiochem 2003; 4(10): 979-83.

88. Borgia JA, Fields GB. Chemical synthesis of proteins. Trends in biotechnology 2000; 18(6): 243-51.

89. Griffin LC, Tidmarsh GF, Bock LC, Toole JJ, Leung L. In vivo anticoagulant properties of a novel nucleotide-based thrombin inhibitor and demonstration of regional anticoagulation in extracorporeal circuits. Blood 1993; 81(12): 3271-6.

90. Tucker CE, Chen LS, Judkins MB, Farmer JA, Gill SC, Drolet DW: Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide-aptamer (NX1838) in rhesus monkeys. I Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1999; 732: 203-12.

www.SID.ir