

آپتامرها و مزایای آن نسبت به آنتی‌بادی‌ها

غلامرضا ایدری - دانشجوی دکتری تخصصی بیوشیمی بالینی - دانشگاه علوم پزشکی مشهد

چکیده:

آپتامرها یک کلاس از لیگاندهای اسیدنوکلئیکی و یا پپتیدی هستند که به یک هدف یا آنتی‌ژن با میل ترکیبی و اختصاصیت بالا باند می‌شوند. همانند آنتی‌بادی‌ها، آپتامرها به اهداف خود با تغییر ساختار سه‌بعدی متصل می‌شوند، بنابراین به آن‌ها آنتی‌بادی‌های شیمیایی (سنتتیک) نیز گفته می‌شود.

آپتامرها جهت اتصال به یک مولکول یا آنتی‌ژن با میل ترکیبی و اختصاصیت بالا از طریق یک فرآیند انتخابی که تحت عنوان سلکس (SELEX) معروف است، طراحی می‌شوند.

آپتامرها دارای موارد کاربرد گسترده‌ای هستند که عبارتند از:

تشخیص بیماری‌ها، درمان بیماری‌ها، پزشکی قانونی و دفاع بیولوژیکی میزبان

اهداف آپتامرها عبارتند از: فلزات سنگین، مواد آلی، پپتیدها، پروتئین‌ها، بافت‌ها و اندام‌ها

امروزه صدها توالی آپتامری شناسایی شده‌اند که در صورت تقاضا به صورت شیمیایی در آزمایشگاه با هزینه کمتر و در مدت زمان کمتری نسبت به تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب سنتز می‌شوند.¹

در این مقاله تکنولوژی تهیه آپتامرها، مزایا و محدودیت‌ها و تعدادی از کاربردهای آن‌ها در علوم زیستی و پزشکی مرور خواهد شد.

کلمات کلیدی: لیگاند، آپتامر، سلکس

مقدمه:

تجارت جهانی آپتامرها (در سال 2012) تقریباً 99 میلیون دلار برآورد شده است؛ و پیش‌بینی می‌شود، برای 5 سال آینده یک رشد سالیانه 106/3 درصدی داشته باشد و در سال 2017 به رقم 3/17 میلیارد دلار در سال برسد. امروزه توسعه روزافزون درمان‌های هدفمند و روش‌های تشخیص اختصاصی بیماری‌هایی نظیر

¹- systematic evolution of Ligands by exponential enrichment.

سرطان، بیماری‌های قلبی، عروقی و عفونت‌ها به‌طور چشمگیری در حال گسترش است. مولکول‌هایی مانند آنتی‌بادی‌ها و پپتیدها به‌عنوان انواعی از رویکردهای مورد استفاده در هدف‌گیری^۲ می‌باشند، اگرچه در بعضی از موارد درمان‌های هدفمندی^۳ که با استفاده از آنتی‌بادی‌ها صورت می‌گیرد بسیار اختصاصی عمل می‌کنند، اما ایمونوژنیسیته و هزینه‌های بالای تولید، کاربرد بالینی آن‌ها را محدود کرده است. برای غلبه بر این مشکلات، درمان‌های هدفمند بر پایه آپتامرها در سال‌های اخیر توسعه یافته است. از آپتامرها تحت عنوان آنتی‌بادی شیمیایی (آنتی‌بادی سنتتیک) نام برده می‌شود.

آپتامرها مولکول‌های پپتیدی و یا اولیگونوکلوئوتیدی هستند، که به یک مولکول هدف یا آنتی‌ژن با میل ترکیبی و اختصاصیت بالا باند می‌شوند. واژه‌های آپتامر و تکامل سیستمی از طریق غنی‌سازی نمایی (SELEX) به‌وسیله دو گروه مستقل در سال 1990 معرفی شدند و پس از معرفی SELEX، در سال 2001 این روش بهینه‌سازی شده و زمان انجام آن از سه هفته به سه روز تقلیل یافت. مهم‌ترین ویژگی یک آپتامر که از کلمه آپتوس^۴ به معنی «مناسب بودن»^۵ گرفته شده است، اختصاصیت بالا برای اتصال به هدف می‌باشد. آپتامرها همانگونه که گفته شد، ترکیبات سنتتیک هستند، ولی ترکیباتی نیز در داخل سلول‌ها یافت شده است که به آن‌ها ریبوسویچ^۶ گفته می‌شود که جزء آپتامرهای طبیعی محسوب می‌شوند.

انواع آپتامرها:

بطور کلی آپتامرها به دو گروه تقسیم می‌شوند:

الف) آپتامرهای پپتیدی:

پروتئین‌هایی هستند، که برای ایجاد تداخل با برهمکنش‌های پروتئینی در داخل سلول طراحی می‌شوند. این مولکول‌ها حاوی یک لوپ پپتیدی متغیر متشکل از 10-20 آمینواسید هستند که در دو انتها به یک پروتئین داریست^۷ متصل می‌شوند. آپتامرهای پپتیدی از یک کتابخانه پپتیدی که توسط یک فاز ایجاد می‌شود، می‌توانند انتخاب شوند.

ب) آپتامرهای نوکلئیک اسیدی:

2- Targeting
3- targeting therapies
4- aptus
5- fit
6- riboswitches
7- Scaffold

اولیگونوکلئوتیدهای تک رشته‌ای DNA یا RNA هستند که جهت اتصال به مولکول هدف یا آنتی‌ژن با میل ترکیبی و اختصاصیت بالا از طریق یک فرآیند انتخابی بنام SELEX طراحی می‌شوند. اهداف این آپتامرها عبارتند از: فلزات سنگین، مواد آلی، پروتئین‌ها، پپتیدها، مولکول‌های کوچک مانند اسیدهای آمینه، بافت‌ها و سلول‌ها و داروها

سنتز آپتامرها:

همانطور که قبلاً گفته شد، تولید آپتامرها از طریق فرآیندی بنام SELEX انجام می‌گیرد. این فرآیند که در سال 1990 توسط گروه گلد و شوستاک معرفی شد، در واقع یک ابزار مناسب برای پیدا کردن نوکلئیک اسیدی با افینیتی بالا برای هدف مشخص از میان یک کتابخانه⁸ تصادفی تحت شرایط خاص می‌باشد. این فرآیند شامل سه مرحله اصلی Selection, Partitioning و Amplification است.

الف) مرحله Selection:

قدم اول در این روش انتخاب کتابخانه‌های اولیگونوکلئوتیدی سنتز شده بصورت تصادفی است. یک کتابخانه تصادفی متشکل از 10^{14} الی 10^{15} توالی اولیگونوکلئوتیدی می‌باشد که در آن هر توالی حاوی یک ناحیه مرکزی متغیر 30-70 جفت بازی است که توسط دو ناحیه ثابت در انتهای 3' و 5' احاطه شده است. نواحی متغیر مرکزی آپتامرها متشکل از توالی‌های منحصر بفردی است که اغلب در اتصال به مولکول‌های هدف با ایجاد ساختارهای سه‌بعدی نقش دارند، در حالی که نواحی ثابت مکمل پرایمرهایی است که برای تکثیر به‌وسیله PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد.

عوامل مهمی در این مرحله مؤثر هستند که عبارتند از:

خواص کتابخانه، ویژگی‌های بافر اتصال، زمان و دمای انکوباسیون

ب) مرحله Partitioning:

عبارت است از جداسازی آپتامرهای اتصال یافته به هدف از آپتامرهای اتصال نیافته. در مرحله دوم، بعد از انکوباسیون کتابخانه با هدف مورد نظر، می‌بایست آپتامرهایی که دارای میل ترکیبی پائین و غیراختصاصی هستند از سیستم خارج و آپتامرهای اختصاصی و متصل‌شونده باقی می‌مانند و در چرخه تکثیر داده شده و در چرخه‌های بعدی انتخاب مورد استفاده قرار می‌گیرند. در حال حاضر برای این منظور روش‌های مورد استفاده در

⁸- Library

این مرحله شامل سانتریفیوژ کردن، شستشوی سطح سلولی، الکتروفورز کاپیلاری و غیره می‌باشد. این مرحله با توجه به نوع هدف متفاوت است.

ج) مرحله Amplification:

عبارت است از تکثیر آپتامرهای بدست آمده. اولیگونوکلئوتیدهای اتصال یافته به هدف خاص، از طریق PCR تکثیر داده شده و سپس کلون می‌شوند و پس از تخلیص توالی‌یابی می‌شوند.

سیکل‌های SELEX حداقل 7 تا 15 دور تکرار می‌شوند تا توالی‌های اختصاصی برای هدف تغلیظ گردند.

آپتامرها براساس نوع هدف، خود دارای اشکال فضایی مختلفی هستند که عبارتند از:

1- شبه گروه (سودونات): که لیگاند برای ترانس کریپتاز معکوس HIV1 است.

2- G-quartet: لیگاند برای ترومبین

3- سنجاق سری: لیگاند برای پلیمرز باکتروفاژ T4

4- مارپیچ - حلقه یا برآمدگی: لیگاند برای آدنوزین 5' تری فسفاتاز (ATP)

مزایای استفاده از آپتامرها نسبت به آنتی‌بادی‌ها:

آپتامرها مزایای گسترده‌ای نسبت به آنتی‌بادی‌ها دارند که عبارتند از:

1- عدم آسیب‌رسانی به سلول‌های مجاور سلول هدف:

با قابلیت اتصال به هدف خاص، آپتامرها به زودی قادر خواهند بود که همانند یک «گلوله جادویی» بدون اینکه آسیبی به سلول‌های اطراف سلول هدف خود وارد کنند، عمل کنند و در تشخیص و درمان بیماری‌ها، موارد کاربرد زیادی خواهند داشت. هم‌اکنون آپتامرهای بیولوژیک زیادی با کاربردهای گسترده تحت بررسی هستند، مانند مارکرهای تشخیص متاستاز سرطان سینه و سیستم‌های ارسال دارو جهت هدف‌گیری و درمان بیماری عروق.

2- تمایل اتصال فراوان به هدف:

درحالی‌که لیگاندهای مشابه زیادی ممکن است به یک جایگاه گیرنده متصل شوند، ولی در بسیاری از موارد مشاهده شده است که آپتامرها قابلیت اتصال بالایی نسبت به آنتی‌بادی‌های منوکلونال، پپتیدها، مولکول‌های کوچک و شیرآبه‌های طبیعی دارند. بطور کلی تمایل اتصال بالا موجب می‌شود که مقدار کمتری از یک آپتامر و

یا آنتی‌بادی لازم باشد که خود باعث کاهش هزینه تولید و افزایش درآمد می‌شود. تمایل اتصال آپتامر (افینیتی) براساس ضریب تفکیک (Kd) بیان می‌شود. ثابت‌های تفکیک آپتامرها نسبت به اهداف گوناگون برحسب میکرومول (μm) تا نانومول (nm) و در بعضی موارد پیکومول (pm) گزارش شده است. آپتامرها همچنین نسبت به آنتی‌بادی‌ها اندازه کوچک‌تری دارند، بنابراین توانایی زیادی جهت ورود به بخش‌های مختلف سلول و اتصال به اهداف خود دارند.

3- اختصاصیت بالا نسبت به هدف:

آپتامرها قابلیت تمایز خوبی نسبت به اهداف خود دارند؛ مثلاً آپتامرهایی تولید شده‌اند که تمایل اتصال آن‌ها به تئوفیلین 10000 بار بیشتر از تمایل اتصال آن‌ها به کافئین است. در صورتی که تئوفیلین و کافئین از نظر ساختمانی فقط در یک گروه متیل با هم اختلاف دارند. همچنین آنتی‌بادی‌ها واکنش متقاطع بیشتری در مقایسه با آپتامرها از خود نشان می‌دهند (جواب مثبت کاذب).

4- کشف بیومارکرهای ناشناخته:

در این زمینه از فرآیند SELEX استفاده می‌شود. تکنیک‌های گوناگونی در شناسایی بیومارکرهای ناشناخته مورد استفاده قرار می‌گیرد، مثلاً با استفاده از SELEX سلول‌ها می‌توانیم هدف‌هایی که تاکنون بر روی سلول و یا داخل آن کشف نشده‌اند را پیدا کنیم، یا با استفاده از این روش می‌توانیم اهداف ناشناخته ارگانسیم‌های بیماران را شناسایی کنیم.

همچنین با استفاده از SELEX که در محیط *in vivo* انجام می‌گیرد، ما می‌توانیم بیومارکرهای منفرد را در مدل‌های حیوانی انتخاب کنیم و نیز با استفاده از SELEX‌های مختلف هدف خاص را بر روی مخلوط پروتئین‌های مختلف انتخاب کرد.

5- مدت زمان تولید و قیمت تمام‌شده:

از زمانی که توالی آپتامرها شناسایی شده‌اند، تقاضا برای تولید آپتامرها به صورت شیمیایی و با استفاده از دستگاه اتوماتیک که از نظر قیمت و خواص بیولوژیک، قابل رقابت با آنتی‌بادی‌ها باشد، زیاد شده است. آپتازن یکی از شرکت‌های فعال در این زمینه که شهرت جهانی دارد، بروشوری را با بیش از 300 آپتامر با قیمت‌های آن عرضه کرده است. قیمت آن‌ها برای نوع طراحی و میزان خلوص از 1 الی 4 دلار در میکروگرم تغییر می‌کند. در مقیاس تجاری هزینه تولید آپتامرها کمتر از 50 دلار در گرم، در مقایسه با آنتی‌بادی‌های منوکلونال که بطور متوسط 300 دلار در هر گرم برآورد شده است، می‌باشد. بعد از اینکه توالی یک هدف خاص مشخص شد،

برای افزایش نیمه عمر و یا افزایش میزان عملکرد آن‌ها تغییراتی در ساختار آن‌ها داده می‌شود که عبارتند از: اضافه کردن تیمیدین وارونه، اضافه کردن پلی اتیلن گلیکول (PEG)، افزودن گروه آمینو، افزودن عامل '2-0 متیل، اضافه کردن بیونین و یا tag‌های فلورسنت.

6- داشتن حداقل تغییرات در هر سری سنتز نسبت به سری دیگر:

با اینکه آپتامرها به طریق شیمیایی سنتز می‌شوند، ولی در هر سری نسبت به سری قبلی کمترین تغییر را دارند، بعلاوه ماهیت شیمیایی فرآیند تولید موجب می‌شود که خلوص و سمیت آن‌ها از نظر بیولوژیکی در مقایسه با آنتی‌بادی‌های نوترکیب کمتر دچار تغییر شود. همچنین آپتامرها در مسیر تولید خود در مقایسه با آنتی‌بادی‌ها کمتر در معرض آلودگی‌های ویروسی و باکتریایی هستند.

7- قابلیت استفاده بالینی:

بعضی از خصوصاتی که آپتامرها را برای استفاده بالینی مناسب کرده است عبارتند از: کم بودن ایمونوژنیسیته، داشتن سمیت کم، اختصاصیت بالا بر روی هدف و نداشتن اثرات جانبی بر روی هدف.

8- نداشتن اثرات جانبی:

در حالی که آپتامرها دارای اختصاصیت بالایی نسبت به هدف هستند، بعضی از آن‌ها کشف شده‌اند که دارای تمایل اتصالی در حد پیکومول (pm) هستند. مزایای بالای اختصاصیت احتمالی، اثرات جانبی و عوارض ناشی از آپتامرها را جهت استفاده دارویی کاهش می‌دهد، همچنین غیرایمونوژن بودن و داشتن حداقل تغییر ساختاری در هنگام سنتز نیز باعث کاهش اثرات جانبی احتمالی می‌شود.

9- پایداری محصول و سهولت ذخیره:

آپتامرها قابلیت ذخیره‌سازی بهتری نسبت به آنتی‌بادی‌ها دارند. در حالی که آنتی‌بادی‌ها در حالت فریز شده بمدت 3 تا 6 ماه قابلیت نگهداری در فریز را دارند و بعد از طی این مدت فقط یکبار می‌توان آن‌ها را به حالت ذوب‌شده درآورده و استفاده کرد، ولی آپتامرها بعد از اینکه به صورت خشک‌شده تهیه شدند، می‌توان آن‌ها را در محدوده دمایی تعریف‌شده، ذخیره کرد. وقتی آن‌ها را در داخل محلول بافر می‌ریزیم، می‌توانند در دمای 20- فریز سالم بمانند. گرما نیز مشکلی برای آن‌ها ایجاد نمی‌کند و وقتی می‌خواهیم با آپتامرها کار کنیم ممکن است آن‌ها برخلاف آنتی‌بادی‌ها چند بار دناتوره و رناتوره شوند.

محدودیت‌ها و معایب آپتامرها:

بعضی از محدودیت‌های آپتامرها عبارتند از:

الف) کلیرانس سریع از گردش خون به علت اندازه کوچک آن‌ها

ب) تخریب به وسیله نوکلئازها

راه حل این محدودیت‌ها:

محدودیت‌های مربوط به آپتامرها را می‌توان به آسانی با تغییر شیمیایی آپتامرها حل کرد:

الف) کونژوگ کردن آپتامرها. با استفاده از پلیمرهایی مانند پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) و یا لیپیدهایی مانند کلسترول می‌توان زمان گردش آن‌ها را در جریان خون (نیمه‌عمر) را افزایش داد.

ب) با استفاده از نوکلئوتیدهای تغییر یافته، شامل باز و قند تغییر یافته و در نتیجه گروه‌های اتصال بین نوکلئوتیدها می‌توان آپتامرهایی را سنتز کرد که در برابر نوکلئازها مقاومت زیادی داشته باشند، مثلاً این تغییرات می‌تواند شامل افزودن گروه‌هایی نظیر آمین و یا متیل به موقعیت 2' قند باز جهت افزایش مقاومت در برابر نوکلئازها و افزودن گروه‌های عاملی به موقعیت C5 پیریمیدین برای افزایش اختصاصیت اتصال و ایجاد عملکردهای متفاوت باشد و با این استراتژی می‌توان آپتامرهای تغییر یافته به بازار عرضه کرد.

موارد کاربرد آپتامرها در درمان و تشخیص:

الف) کاربرد بالینی و دارویی:

در دسامبر 2004 یعنی کمتر از 15 سال بعد از نظریه آپتامرها، اولین آپتامرهای دارویی ماکیوژن وارد بازار شد. این دارو از سوی FDA تأییدیه گرفته و بوسیله انستیتوی Eyetech ثبت گردید.

این دارو در درمان یک بیماری چشمی که ناحیه ماکولای چشم را تخریب می‌کند و میدان دید بیمار را تحت تأثیر قرار می‌دهد، مورد استفاده قرار گرفت. ماکیوژن در واقع یک آپتامر ضد VEGF است که با پلیمر PEG جهت افزایش نیمه‌عمر آن کونژوگ شده است. همچنین می‌توان به آپتامر REG1 به عنوان آپتامر اختصاصی ضد فاکتور 9 اشاره کرد. بعد از آن همان طوری که در جدول شماره یک نشان داده شده است، آپتامرهای زیادی به منظور استفاده بالینی در حال بررسی هستند، بطوریکه در سال 2012 نه آپتامر DNA و RNA مورد استفاده بالینی قرار گرفتند.

جدول شماره یک: آپتامرهای مورد استفاده بالینی و درمان

آپتامر	مولکول هدف	نوع کاربرد بالینی	وضعیت فعلی
ARC1779	VWF	بیماری تیپ 1b ون ویلبراند	فاز 2 کامل
ARC19499	TFPI	هموفیلی	فاز یک کامل
AS1411	پروتئین نوکلئین	لوسمی میلوئیدی، سرطان متاستاتیک سلول‌های کلیوی	فاز 2 ناقص
NOX-A12	فاکتور استرومای مشتق سلولی نوع 1	مالتیپل میولما	فاز 2 در حال انجام
NOX-H94	پروتئین هپسیدین	آنمی بیماری مزمن	فاز 2 کامل
NOX-E36	MCP-1	دیابت تیپ 2، آلومینوری	
NU172	ترومبین (فاکتور IIA)	بیماری قلبی	فاز 2 ناقص
REG1	فاکتور انعقادی IX	بیماری شریان کرونری	فاز 3 در حال انجام

MCP-1=Monocyte chemoattractant protein1

ب) کاربرد تشخیصی آپتامرها:

آپتامرها کاربردهای تشخیصی زیادی به‌ویژه در تشخیص بیولوژیکی برای شناسایی بیومارکرهای بیماری دارند. اخیراً یک سری کیت‌های تشخیصی به بازار عرضه شده‌اند که بر پایه استفاده از آپتامرها می‌باشند، مثلاً برای شناسایی میکوتوکسین‌ها و آفلاتوکسین‌ها بکار می‌روند. یکی از تکنولوژی‌های جالبی که توسط آبتازن عرضه شده است، تکنولوژی آپتامر بیگون (آپتا- بیگون) است که می‌تواند برای شناسایی سریع بیومارکر مورد استفاده قرار گیرد. در این روش برای اندازه‌گیری آنالیت، شستشوی چندگانه و انکوباسیون طولانی لازم نیست. همچنین حساسیت روش نیز زیاد است.

ج) موارد کاربرد در حال مطالعه:

اخیراً صدها آزمایش در زمینه کاربرد تشخیص و بالینی آپتامرها گزارش شده است که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از:

- 1) پروب‌های طراحی شده برای اندازه‌گیری مقادیر جزئی جیوه آب
- 2) سیستم‌های تشخیص برای Ecoli
- 3) سیستم انتقال داروی شیمی‌درمانی به‌منظور هدف‌گیری سلول‌های سرطان پانکراس
- 4) استفاده در انگشت‌نگاری‌ها و پزشکی قانونی
- 5) استفاده در دفاع بیولوژیک میزبان

بحث و نتیجه‌گیری:

اگرچه فن‌آوری آپتامرها بحث نوظهوری بشمار می‌رود. و از اولین عرضه آن‌ها حدود 23 سال می‌گذرد، ولی گام‌های پژوهشی زیادی در این زمینه برداشته شده و مقالات علمی و پژوهشی زیادی در این مورد به چاپ رسیده است، بنابراین در آینده نزدیک می‌توان انتظار داشت با پیشرفت‌های سریعی که در این زمینه صورت می‌گیرد، کیت‌های تشخیصی زیادی که بر پایه آپتامرها باشد، وارد بازار شود و با تولید داروهایی که بر پایه آپتامرها باشد، آینده روشنی برای درمان و حتی پیشگیری بسیاری از بیماری‌ها متصور خواهد بود.

References:

1. Suzy KEDZIERSKI, M KHOSHNEJAD and G Thomas Caltagirone. Synthetic Antibodies: The Emerging Field of Aptamers. Bioprocessing Journal 2013:1-4
2. Ganji, A. Varasteh and Sankian, M. Aptamers to target dendritic Cells. Journal of drug targeting 2015:1-12.
3. Sun, H., Zhu, X., Lu, P.Y., Rosat3, R.R., Tan, W. and ZV, y., Oligonucleotide aptamers: New tools for targeted cancer thrapy. Molecular Therapy-Nucleic Acids 2014.3:e182.
4. Keefe.A.D., Pai, S and Ellington, A., Aptamers as therapeutics. Nature Reviews Drug Discovery 2010.9:537-550.