

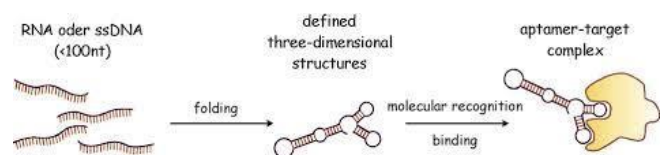
## Aptameri

Il DNA è flessibile e permette il legame di proteine. Gli RNA sono in grado di assumere strutture complesse che gli permettono di interagire con delle proteine.

Gli aptameri sono brevi catene oligonucleotidiche a singolo filamento. Può trattarsi di ssDNA o RNA lunghe fino a 100 nucleotidi. Questi vengono selezionati mediante un processo di selezione ed amplificazione in vitro chiamato SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment).

Queste molecole presentano strutture tridimensionali stabili, che permettono di legare con elevata specificità ed affinità molecole bersaglio quali proteine o cellule intere (??).

Le interazioni tra aptamero e la molecola bersaglio sono di tipo non covalente, come legami ad idrogeno, interazioni elettrostatiche e forze di van der Waals. Grazie alla facilità di sintesi sono molto studiati come agenti anticancro, e possono essere usati sia nella prevenzione che nella diagnosi.



Proprietà caratteristiche degli aptameri sono la possibilità di produzione in vitro, con lunga shelf-life ed elevata riproducibilità tra lotti di produzione. Sono molecole stabili e possono essere denaturati in maniera reversibile. Hanno costi di produzione contenuti e possono essere modificati con traccianti o fluorofori.

Il principale svantaggio degli aptameri è la sensibilità all'attacco delle nucleasi, specialmente per quanto riguarda gli aptameri ad RNA. Il gruppo 2'OH è quello maggiormente soggetto all'attacco delle nucleasi, per cui spesso vengono inserite delle modificazioni che mascherano il gruppo 2'OH. Queste modificazioni sono le stesse viste precedentemente, come 2'-fluoro, 2'-ammino e 2'-O-metile.

## Il processo SELEX

Il metodo SELEX nasce dall'evoluzione della sintesi in vitro di acidi nucleici, che permette di ottenere innumerevoli sequenze degenerate di nucleotidi e dalla disponibilità della PCR che permette di amplificare le sequenze di DNA.

Nel 1990 due gruppi di ricerca indipendenti hanno posto le basi per questa tecnologia, che permette di identificare delle molecole di RNA in grado di legare in modo specifico un target.

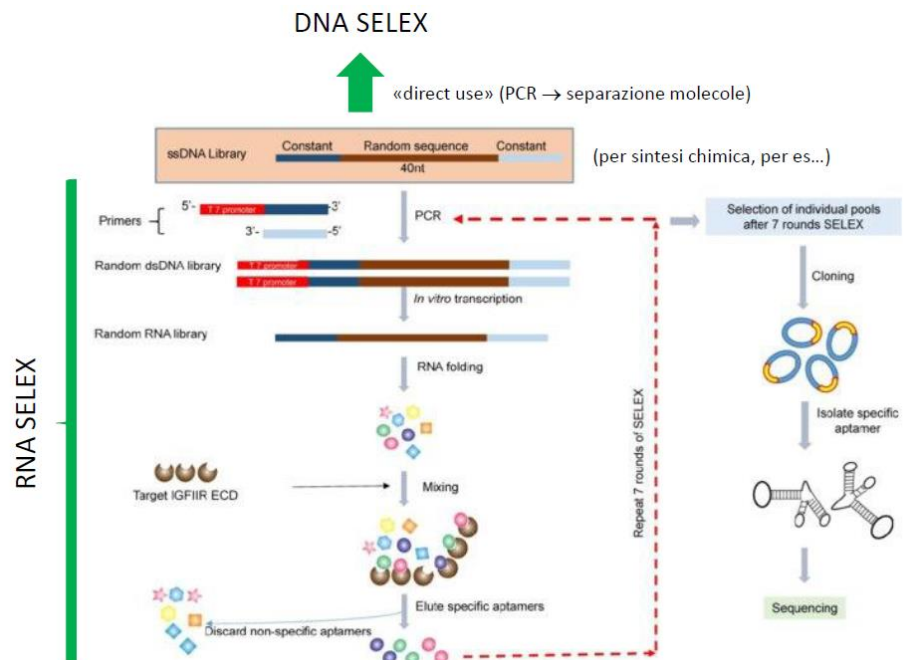
## RNA SELEX

Il punto di partenza della reazione consiste nella sintesi chimica di una library di molecole di DNA di grandi dimensioni, oltre  $10^{13}$  molecole.

La sequenza delle molecole sintetizzate è casuale e la lunghezza varia tra i 20 ed i 100 nucleotidi. Alle estremità della sequenza sono inserite sequenze note della lunghezza di circa 18-21 nucleotidi, per l'attacco dei primer per l'amplificazione.

Il DNA così sintetizzato viene amplificato mediante PCR. Uno di questi due primer porta la sequenza riconosciuta dalla RNA polimerasi del fago T7. Questo perché dopo l'amplificazione via PCR della libreria si effettua un passaggio di trascrizione in vitro. In questo modo si crea una library di RNA random, dove ciascuna molecola ha una sua struttura tridimensionale caratteristica, dipendente dalla sequenza.

Effettuata la trascrizione si effettua un passaggio di selezione, in cui si vuole selezionare le molecole di RNA che legano uno specifico target. Alcune molecole di RNA avranno una conformazione tale da essere affini alla molecola target, per cui vi si legheranno (Szostak usa cromatografia per affinità a colonna). Si effettua in seguito un lavaggio, che permette di eliminare le molecole di RNA che non si sono legate. Successivamente si eluiscono le molecole di RNA che si sono legate al bersaglio.



Le molecole selezionate ed estratte con l'eluizione vengono retrotrascritte in cDNA ed amplificate mediante PCR. Dopo la PCR si riparte col ciclo di trascrizione ad RNA, selezione, retrotrascrizione ed amplificazione. Si fanno in genere tra i 5 ed i 10 cicli di amplificazione e selezione.

Lo scopo è quello di selezionare ad ogni ciclo le molecole di RNA che legano con maggiore affinità al target. Alla fine dei cicli le molecole selezionate vengono clonate in un vettore e sequenziate.

Importante retrotrascrizione.

## DNA SELEX

Si parte da una library di DNA a singolo filamento sintetizzata per via chimica, come nella RNA SELEX. Si effettua l'amplificazione della library di DNA mediante PCR. Sul prodotto della PCR si effettua una denaturazione, e le molecole di ssDNA così ottenute vengono usate per i cicli di selezione.

Ellington e Szostak hanno selezionato RNA che legavano l'oligo(dT) Sepharosio in una colonna di separazione. Hanno visto che nei primi due cicli meno dell'1% dell'RNA totale caricato veniva legato, mentre al terzo ciclo oltre il 50% dell'RNA caricato si legava al bersaglio.

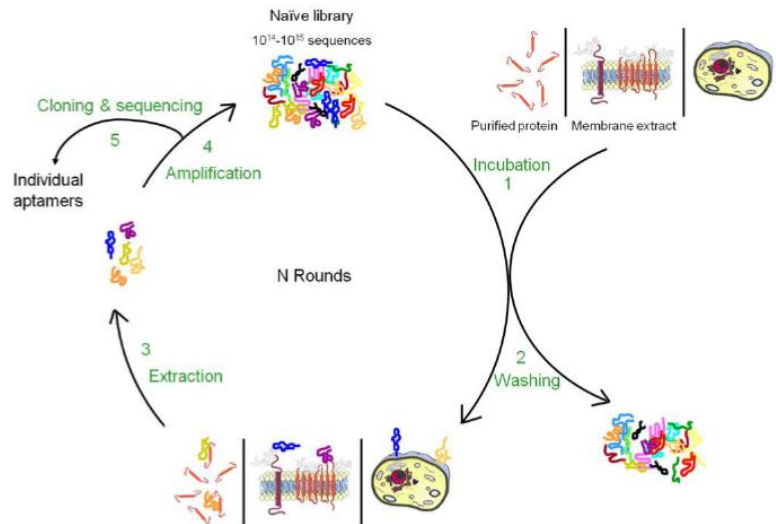
Durante il passaggio di amplificazione possono essere introdotte mutazioni nella sequenza, che possono o meno migliorare l'affinità al target dell'aptamero mutato.

### Applicazioni degli aptameri

Le applicazioni degli aptameri sono molte e vanno dal bio-imaging al drug delivery.

#### Selezione di marcatori di superficie

La procedura SELEX può essere utilizzata allo scopo di selezionare degli aptameri in grado di legare dei marcatori espressi sulla superficie cellulare. Molti biomarcatori sono espressi sulla superficie cellulare, e la loro presenza può essere associata a diverse patologie. Le proteine di membrana sono infatti il target di oltre il 50% dei farmaci finora approvati, c'è quindi forte necessità di avere ligandi specifici che hanno come target proteine espresse sulla superficie cellulare.



Bisogna tenere presente che la struttura tridimensionale di un marcatore di membrana purificato può essere diversa da quella dello stesso marcatore nel contesto della membrana plasmatica.

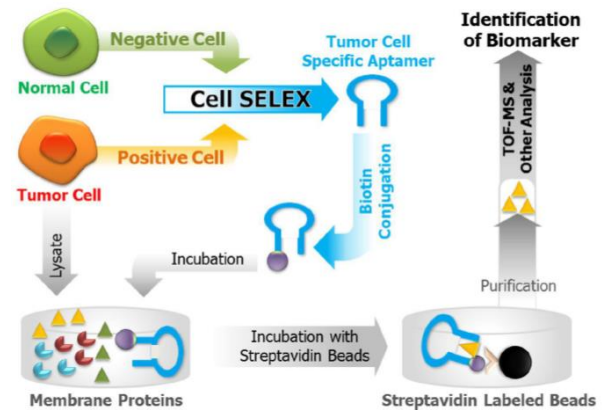
Sono stati messi a punto dei protocolli basati sulla SELEX allo scopo di selezionare aptameri in contesti che mimino il più possibile il contesto cellulare. La library di oligonucleotidi random viene incubata con cellule intere o con estratto di membrana cellulare. Nel passaggio di selezione alcune molecole della library si legheranno, le altre vengono allontanate mediante lavaggio. Le molecole legate al target vengono recuperate mediante eluizione e sono sottoposte ad un passaggio di amplificazione. L'amplificato ricomincia il ciclo di selezione ed espansione. Durante questi cicli la popolazione di molecole evolve, per cui vengono ottenuti aptameri con buona affinità, che verranno sequenziati e caratterizzati.

Aptameri specifici possono essere selezionati usando come target virus, microorganismi, frammenti di membrana, proteine purificate, organismi (??) ed altro.

### SELEX per la ricerca di biomarcatori

La procedura SELEX può essere utilizzata per la ricerca di nuovi biomarcatori. La procedura di selezione degli aptameri può essere utilizzata per selezionare aptameri specifici diretti verso proteine di membrana presenti sulle cellule tumorali.

Le cellule sane e le cellule normali vengono sottoposte a SELEX, in modo di poter individuare aptameri specifici sulle cellule tumorali. L'aptamero specifico per la cellula tumorale può essere coniugato con la biotina, allo scopo di indentificare il niomarcatore ignoto. L'aptamero marcato viene incubato con un lisato di membrana di cellule tumorali, e l'aptamero si legherà in modo specifico ad una proteina presente nel lisato. A questo punto si separa il complesso aptamero/proteina dalla soluzione, usando palline magnetiche coniugare alla streptavidina. La streptavidina si lega alla biotina presente sull'aptamero, che a sua volta è legato al biomarcatore bersaglio ignoto.



Si procede quindi all'identificazione del biomarcatore legato all'aptamero.

Diversi aptameri sono già stati testati in trials clinici ed uno è stato approvato, il Macugen, diretto verso il VEGF ed approvato per l'uso nella terapia della degenerazione maculare.

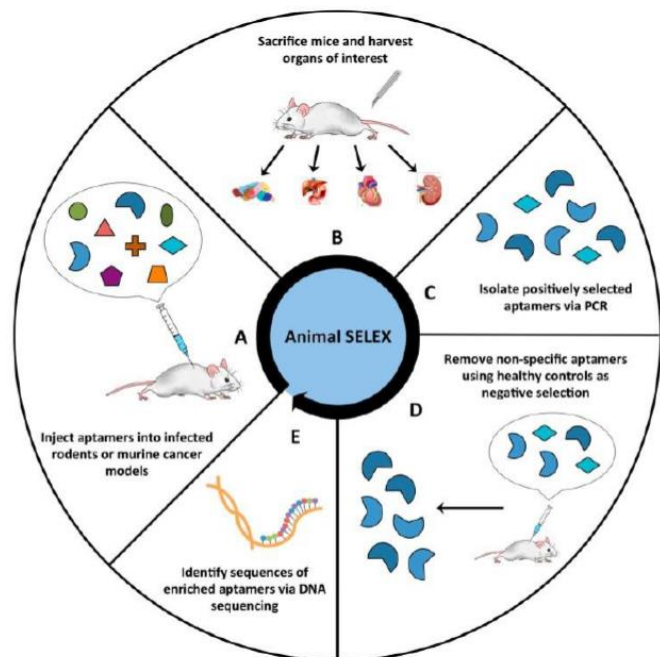
### SELEX su animali

La procedura SELEX può essere utilizzata su animali interi in modo da ottenere aptameri diretti verso tessuti specifici.

Viene preparata una libreria di aptameri, che viene poi iniettata nell'organismo modello, ad esempio per una patologia oncologica. Si sacrifica l'animale e gli organi di interessi vengono isolati, per recuperare gli aptameri che vi si sono legati. Gli aptameri così selezionati vengono isolati ed amplificati mediante PCR. Si effettuano diversi cicli di selezione usando organismi modello.

È necessario effettuare una controselezione, che viene effettuata iniettando gli aptameri selezionati in un organismo modello sano, che quindi non sono selettivi per il tessuto malato.

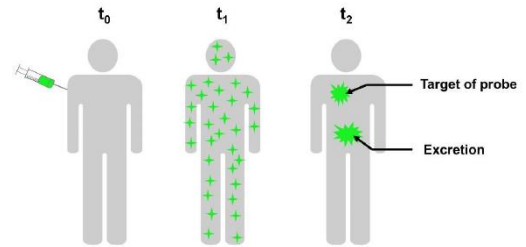
Alla fine gli aptameri selezionati vengono sequenziati ed identificati.



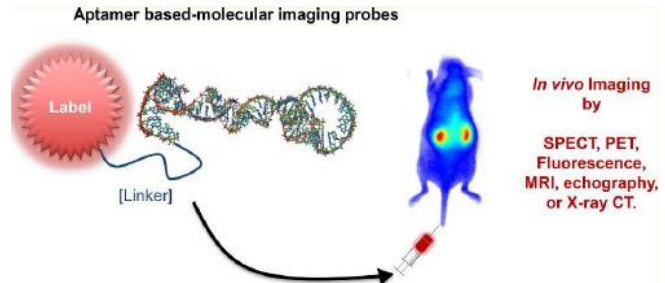
### Aptameri per molecular imaging e theranostics

Gli aptameri possono essere utilizzati per l'imaging molecolare e per la teranostica. Per teranostica si intende l'interazione di un metodo diagnostico con uno specifico intervento terapeutico.

Il molecular imaging consiste nella somministrazione di un agente di contrasto nel paziente. Dopo un lasso di tempo l'agente di contrasto diffonde nell'organismo, e dopo un ulteriore intervallo di tempo viene in parte escreto dall'organismo, mentre una parte si accumula nel sito target della sonda. Un radiotracciante noto nell'imaging dei tumori è un analogo del glucosio marcato con una sonda (isotopo?) radioattiva che si accumula nelle cellule tumorali (ad alta proliferazione). Il vantaggio dell'imaging molecolare permette lo studio di eventi cellulari e molecolari nell'organismo vivente.



Gli aptameri possono essere usati come sonde per l'imaging molecolare. Le sonde sono formate da un aptamero specifico verso un target; l'aptamero lega attraverso un linker una label fluorescente o radiomarcata.



La sonda così costituita può essere somministrata nell'organismo e verrà poi rilevata mediante apposite metodiche di rilevazione, nel caso in cui incontri il suo bersaglio nell'organismo, in prossimità del quale si accumulerà.

Una sonda di questo tipo può essere utilizzata sia per la diagnosi che per la cura. L'aptamero può essere legato, attraverso un linker, ad una nanoparticella che funge da carrier trasportando sulla sua superficie molecole utili all'imaging biomolecolare e farmaci che verranno deliverati nei pressi del sito a cui l'aptamero è affine.

L'uso degli aptameri come sonda è relativamente nuovo, ma il loro uso sta aumentando. Ci sono ancora delle questioni da risolvere, quali la degradazione, la tossicità, la veloce escrezione attraverso la clearance renale e limitazioni legate all'uso di modelli murini.