Aptamers: Isolation, modification, characteristics, and applications

Noor Mohammad Danesh[1], Farzaneh Yousefi[2], Morteza Alinezhad Nameghi[3], Khalil Abnous[4], Seyed Mohammad Taghdisi[5]

As synthetic oligonucleotides with high affinity and selectivity, aptamers have an outstanding potential for medical diagnosis and treatment. This manuscript enquires into the generation, characteristics and applications of aptamers. The role of aptamers in medicine is also discussed. The study shows that aptamers stand as great candidates in medical sciences for development of biosensors and targeted drug delivery systems because of their unique properties such as high affinity and selectivity towards their targets, inexpensiveness and *in vitro* synthesis, high stability, and small size.

Key Words: Aptamer; Generation; Modification; Application; Characteristic

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2018; 24 (4): 243-253.

Received: December 9, 2017 Accepted: January 21, 2018

[1] *Research Institute of Sciences and New Technology, Mashhad, Iran.*
[2] *MSc of Nursing, Ghaem Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*
[3] *School of Pharmacy, Department of Medicinal Chemistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*
[4] *Professor, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*
[5] ***Corresponding Author;*** *Assistant Professor, School of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Biotechnology , Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*
Email: taghdisihm@mums.ac.ir Tel: 05131801203 Fax: 05138823251

مقاله مروری

آپتامرها، جداسازی، اصلاحات، خصوصیات و کاربردها

نورمحمد دانش[۱]، فرزانه یوسفی[۲]، مرتضی علی‌نژاد نامقی[۳]، خلیل آبنوس[۴]، سید محمد تقدیسی[۵]

چکیده

آپتامرها الیگونوکلئوتیدهایی سنتتیک، با میل پیوندی و اختصاصیت بالا هستند که برای کاربردهای درمانی و تشخیصی از پتانسیل بالایی برخوردارند. در این مقاله به بررسی آپتامرها، نحوه تهیه، ویژگی‌ها و کاربردهای آنها خواهیم پرداخت؛ همچنین این نکته که آپتامرها چقدر می‌توانند در حوزه پزشکی کاربرد داشته باشند، مورد بررسی قرار خواهد گرفت. این مطالعه نشان می‌دهد که آپتامرها به‌واسطه برخورداری از خصوصیات برجسته‌ای مانند: میل پیوندی و اختصاصیت بالا برای اهداف خود، سنتز ارزان و برون‌تنی، پایداری بالا و اندازه کوچک، گزینه‌های بسیار مناسبی در علوم پزشکی برای کاربرد در زیست‌حسگرها و سامانه‌های انتقال هدفمند هستند.

واژه‌های کلیدی: آپتامر، تولید، اصلاحات، کاربرد، ویژگی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۶؛ ۲۴ (۴): ۲۴۳-۲۵۳.

دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱۸ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱

[۱] پژوهشکده علوم و فناوری نوین، مشهد، ایران.

[۲] کارشناس پرستاری، بیمارستان قائم، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

[۳] کارشناسی ارشد، گروه سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

[۴] استاد، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

[۵] **نویسنده مسئول؛** استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

آدرس: دانشگاه علوم پزشکی مشهد-دانشکده داروسازی

تلفن: ۰۵۱۳۱۸۰۱۲۰۳ نمابر: ۰۵۱۳۸۸۲۳۲۵۱ پست الکترونیکی: taghdisihm@mums.ac.ir

مقدمه

آپتامر، از دو بخش لاتین Aptus به‌معنای Fitting و کلمه یونانی Meros به‌معنای ذرّه تشکیل شده است؛ در واقع معنای دقیق‌تر آن «ذرّه‌ی قابل تطبیق» می‌باشد (۱). اگر بخواهیم به معنای گسترده‌تر آپتامر بنگریم، آپتامر در واقع قطعات کوچک از توالی‌های پپتیدی یا اسیدنوکلوئیکی هستند که با تشکیل ساختارهای سه‌بعدی، توانایی اتصال اختصاصی به مولکول هدف را دارند (درست مانند آنتی‌بادی‌های بلند زنجیر، اما این‌بار با اندازه‌ای ده‌ها بار کوچک‌تر از یک مولکول آنتی‌بادی)؛ اگرچه در بیشتر مواقع، اصطلاح آپتامر به آپتامرهای اسیدنوکلئیکی اطلاق می‌گردد که از طریق فرآیند SELEX[1] انتخاب شده‌اند (۲). بر اساس این تعریف، آپتامر در سال‌های اخیر به عرصه‌های گوناگونی ورود کرده است.

حال نکته قابل تأمّل اینجاست که چه عاملی موجب ایجاد تفاوت میان آپتامرهای مختلف یا حتی میان آپتامر و مهم‌ترین رقیب آن یعنی آنتی‌بادی می‌شود؟ خصوصیات شیمیایی و فرآیند انتخاب آپتامرها چه اثری بر عملکرد آن‌ها می‌گذارد؟

همان طور که اشاره شد، آپتامرها اولیگومرهای تک‌رشته‌ای اسیدنوکلئیک (RNA وssDNA) هستند که می‌توانند ساختارهای دو و سه بعدی خاصی از جمله: Stems، Loops، Bulges (شکم‌ها)، Hairpins (سنجاق سر)، Pseudoknots (شبه‌گره‌ها)، Triplexes یا Quadruplexes را تشکیل دهند. بر اساس همین ساختارهای چندبعدی، آپتامر می‌تواند به مولکول‌های کوچک، کمپلکس‌ها و یا حتی ارگانیسم‌ها متصل شود. اتصال آپتامر به هدف، نتیجه مطابقت ساختاری این دو، تجمع حلقه‌های آروماتیک، میان‌کنش‌های الکتروستاتیک، واندروالس، باندهای هیدروژنی و یا حتی ترکیبی از اینهاست (۳).

آپتامرها از نظر اقتصادی اهمیت بالایی دارند و پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۱۸، ارزش بازار آنها به حدود ۲/۱میلیارد دلار تا سال ۲۰۱۸ برسد. همچنین از نظر پزشکی نیز در سال ۲۰۰۴، داروی Pegaptanib با ماهیت آپتامری، توسط سازمان غذا و داروی آمریکا برای درمان بیماری تباهی لکه زرد تأیید شد.

در این مقاله آپتامرها از نظر فرآیند جداسازی، خصوصیات، اصلاحات و کاربردهایشان، مورد بررسی قرار خواهند گرفت.

فناوری SELEX، فرآیند انتخاب آپتامر

تاریخچه:

شیمی ترکیبی[2] (۴)، یک فناوری کاربردی در صنعت، تحقیقات بیوتکنولوژی و فارماسیوتیکس است که برای کشف مولکول‌های جدید با خصوصیات مطلوب، داروهای جدید و کاتالیزورها کاربرد دارد. نوکلئیک‌اسیدها ترکیبات بسیار جذابی در این شاخه از علم شیمی به‌حساب می آیند؛ زیرا همان‌طور که گفته شد، می‌توانند به شکل ساختار دوم و سوم درآمده و توسط PCR[3] در محیط آزمایشگاهی تکثیر یابند.

تعداد زیادی از رشته‌های الیگونوکلئوتیدی (10^{15}) با توالی‌های تصادفی، از طریق سنتز شیمیایی، تولید شده و غربالگری می‌شوند؛ سپس برای انتخاب لیگاندهایی با میل ترکیبی بالا (Aptamer) و یا برای کاربردهای کاتالیزوری (Ribozyme, DNAZymes) مورد استفاده قرار می‌گیرند. مخلوط این توالی‌ها را کتابخانه‌ی الیگونوکلئوتیدی می‌نامند.

در سال ۱۹۹۰، در یک روش جدید، از یک کتابخانه الیگونوکلئوتیدی برای انتخاب آپتامرهای RNA با میل ترکیبی و اختصاصیت بالا برای اتصال به اهداف غیر اسیدنوکلوئیکی استفاده شد. Tuerk و Gold، میانکنش بین T4 DNA Polymerase (gp43) باکتریوفاژی و محل

[1] *Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*

[2] *Combinatorial Chemistry به ساخت تعداد زیادی از مولکول‌ها یا مواد مختلف در یک فرایند شیمیایی گفته می‌شود. در سنتز ترکیبی، تعداد ترکیبات ساخته‌شده به صورت نمایی با تعداد مراحل شیمیایی افزایش می‌یابد.تولید مولکول‌های کوچک نظیر الیگوپپتیدها یا الیگونوکلئوتیدها یکی از مباحث مهم در شیمی ترکیبی می‌باشد.*

[3] *Polymerase Chain Reaction*

اتصال mRNA کدکننده این آنزیم به ریبوزوم را مورد مطالعه قرار دادند. آنها از طریق کتابخانه تصادفی RNA، توالی‌ای را کشف کردند که به T4 DNA Polymerase متصل شده و مانع اتصال این آنزیم به ریبوزوم و اعمال بازخورد منفی می‌گردید. آنها نام فرآیند انتخاب توالی خود را «SELEX» به‌معنای انتخاب هدفمند لیگاند به‌روش غنی‌سازی نمایی، گذاردند (۵).

Ellington و Szostak، به‌طور جداگانه فرآیند انتخاب مشابهی را برای جداسازی مولکول‌های RNA از کتابخانه ی تصادفی RNA، به‌منظور اتصال قوی به مولکول‌های کوچک سیباکروم‌بلو و ریاکتیو بلو۴ (رنگ های آلی)، به‌کار بردند و نام توالی‌های RNA خود را آپتامر نهادند (۶). حدود دو سال بعد اولین توالی ssDNA از کتابخانه ی تصادفی DNA، انتخاب گردید (۷).

از آنجایی که خصوصیات آپتامر نظیر: میل ترکیبی و اختصاصیت آن، به مراحل انتخاب آن یعنی SELEX وابسته است، در ادامه به شرح مختصر این فرآیند و نکات کلیدی آن خواهیم پرداخت.

انتخاب هدفمند لیگاند، به روش غنی‌سازی نمایی (SELEX):

اصلی‌ترین گام‌های پروسه SELEX، در شکل یک نمایش داده شده است. چرخه‌های تکرارشونده در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی و انتخاب مولکول‌هایی با میل ترکیبی بالاتر به مولکول هدف در هر چرخه، یک پروسه داروینی را یادآور می‌شود که به سمت انتخاب توالی‌هایی با میل ترکیبی بیشتر به مولکول هدف، پیش می‌رود.

نقطه آغاز فرآیند SELEX، سنتز شیمیایی کتابخانه تصادفی الیگونوکلئوتیدی DNA است که حاوی 10^{13} تا 10^{15} موتیف[1] با توالی‌های متفاوت ۲۰ تا ۸۰ نوکلئوتیدی است. دو نوع اصلی آپتامر وجود دارد: ssDNA و RNA. حال اگر هدف، تولید آپتامر DNA باشد، می‌توان از همین کتابخانه‌ی تولیدشده استفاده کرد؛ اما در صورتی که هدف تولید آپتامر RNA باشد، باید پیش از آغاز فرآیند SELEX، کتابخانه DNA به RNA تبدیل شود (از طریق فرآیند *in vitro* transcription).

در مرحله بعدی، این کتابخانه تصادفی DNA یا RNA در مجاورت مستقیم مولکول هدف قرار گرفته و در ادامه، کمپلکس‌های ایجادشده با هدف، از الیگونوکلئوتیدهای باندنشده جدا می‌شوند (مرحله Partition). این مرحله یکی از سخت‌ترین مراحل SELEX است و به‌طور قابل ملاحظه‌ای بر خصوصیات اتصالی آپتامر به هدف، اثر می‌گذارد.

در ادامه، الیگونوکلئوتیدهای متصل‌شده به هدف، از هدف جداسازی شده (شستشو داده می شوند) و توسط PCR (برای DNA SELEX) و RT-PCR (برای RNA SELEX) تکثیر می‌یابند.

خروجی فرآیند PCR، dsDNA است و می‌بایست به ssDNA تبدیل شود و توالی مکمل آپتامر انتخاب‌شده، حذف گردد. حال توالی تک‌رشته ی باقیمانده، وارد چرخه دوم SELEX شده و به‌طور مجدد در مجاورت هدف قرار می‌گیرد. به‌دلیل تکرارشونده بودن این چرخه ی انتخاب و تکثیر الیگونوکلئوتیدها در هر مرحله، استخر توالی در هر مرحله دستخوش کاهش تنوع الیگونوکلئوتید قرار می‌گردد؛ در حالی که میل ترکیبی الیگونوکلئوتیدهای باقیمانده، رفته‌رفته افزایش می‌یابد.

تعداد دفعات چرخه‌ی (راند) مورد نیاز در SELEX، به پارامترهای مختلفی از جمله: خصوصیات هدف و غلظت آن، طراحی کتابخانه اولیگونوکئوتیدی آغازگر، شرایط محیطی انتخاب، نسبت مولی هدف به اولیگونوکلئوتیدها و کارآیی روش جداسازی (Partitioning) وابسته است. راندهای اضافی منحصراً با توجه به‌میزان اختصاصیت اولیگونوکلئوتیدها امکان‌پذیر است.

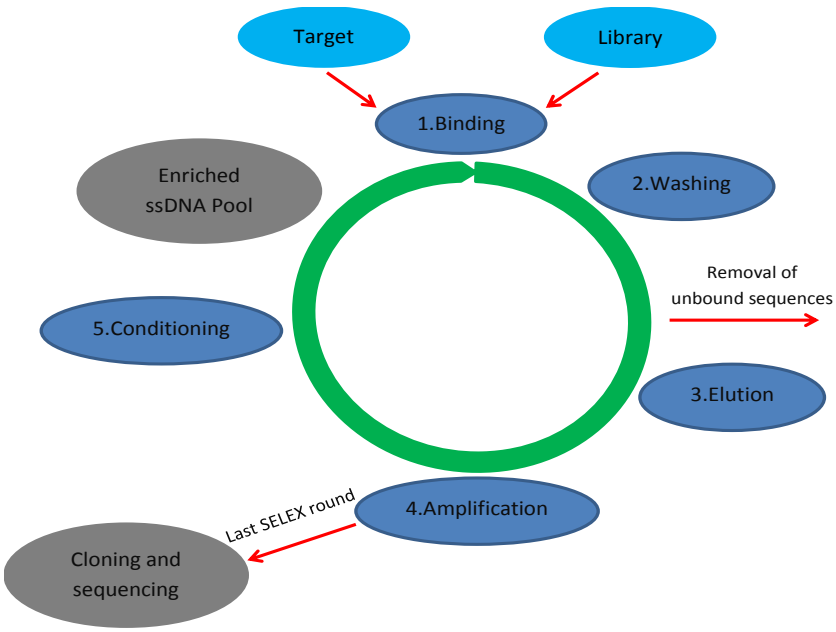
حداکثر تعداد راند، زمانی تعیین می‌گردد که سیگنال فلورسانس یا رادیواکتیو دریافتی در دو یا سه راند آخر، ثابت

[4] *Motif*

باقی بماند. (بدین‌منظور می‌بایست آپتامر را با مواد رادیو اکتیو یا فلورسانس متصل کنند).

انتخاب منفی (Negative Selection) در SELEX، به فرآیندی گفته می‌شود که در آن توالی‌هایی که توانایی اتصال به مولکول‌های مشابه هدف اصلی (مثلاً اپیتوپ مولکول هدف) را دارند، حذف می‌گردند. پس به‌منظور انتخاب آپتامر برای یک اپیتوپ خاص از یک هدف، حتماً فرآیند انتخاب منفی به‌کار گرفته می‌شود. در این راستا به‌عنوان راند اول، ابتدا هدف‌های مشابه هدف اصلی و یا اپیتوپ‌هایی که مدّ نظر نیستند، در مجاورت کتابخانه قرار می‌گیرند تا الیگونوکلئوتیدهایی که به آنها تمایل دارند، حذف شوند. میل ترکیبی و اختصاصیت الیگونوکلئوتیدها به هدف‌هایشان، می‌تواند تحت تأثیر چنین سخت‌گیری‌هایی افزایش یابد. از جمله سخت‌گیری‌های دیگر می‌توان به کاهش غلظت هدف در راندهای آخر، تغییر شرایط اتصال و تغییر شرایط شستشو (حجم و ترکیب بافر و یا زمان شستشو) اشاره کرد که این باعث اتصال رقابتی قوی‌ترین الیگونوکلئوتیدها می‌گردد (۸).

پروسه SELEX، پس از مرحله تکثیر، در آخرین راند متوقف شده و الیگونوکلئوتیدهای انتخاب‌شده برای کلون‌شدن و تعیین خصوصیات، مورد استفاده قرار می‌گیرند. سپس کلون‌های آپتامر انتخاب‌شده، برای سنجش اتصال و تعیین خصوصیات جزئی اتصال از قبیل: تعیین میل ترکیبی و اختصاصیت، استفاده می‌شوند. در ادامه آزمایش‌هایی برای ایجاد انواع جهش و کوتاه‌سازی آپتامر انتخاب‌شده صورت می‌گیرد؛ زیرا کارکردن با یک توالی کوتاه نه‌تنها ساده‌تر است، بلکه تا حدّی اختصاصیت را نیز افزایش می‌دهد. چنین فرآیندهایی در کنار سایر موارد از جمله جایگزین‌کردن نوکلئوتیدهای اصلاح‌شده (جایگزین‌کردن گروه‌های NH_2 به‌جای OH قند نوکلئوتیدها) که موجب افزایش پایداری آپتامر در کارهای آنالیزی و خالص‌سازی ترکیبات می‌شود، تحت عنوان فرآیندهای Post-SELEX مشهور هستند.



شکل-0 پنج مرحله انتخاب هدفمند لیگاند، به روش غنی‌سازی نمایی (SELEX):۱) Binding: اتصال الیگونوکلئوتیدهای کتابخانه به هدف. **۲) Partition (Washing):** جداسازی الیگونوکلئوتیدهای متصل‌نشده به هدف. **۳) Elution:** جداسازی الیگونوکلئوتیدهای متصل‌شده از هدف. **۴) Amplification:** تکثیر الیگونوکلئوتیدهای انتخاب‌شده در مرحله‌ی Elution به‌وسیله‌ی واکنش PCR. **۵) Conditioning:** نسخه‌برداری in vitro برای باز تولید آپتامر RNA و تک‌حلقه‌ای کردن dsDNA (زیرا تنها خروجی مرحله PCR، dsDNA است).

تنوع اهداف قابل شناسایی توسط آپتامر

از سال ۱۹۹۰ تاکنون هدف‌های متنوعی از جمله مواد آلی و غیر آلی کوچک، پپتیدها، پروتئین‌ها، آنتی‌بادی‌ها، کربوهیدرات‌ها و همچنین مخلوطی از هدف‌ها و حتی کل سلول در SELEX مورد استفاده قرار گرفته است.

آپتامرها می‌توانند برای مولکول‌های مرتبط با اسیدنوکلئیک‌ها مانند: کوفاکتورها، نوکلئوتیدها، پروتئین‌های متصل‌شونده به اسیدهای نوکلئیک، آنزیم‌ها (پلیمرازها) و پروتئین‌های تنظیم‌کننده نیز مورد استفاده قرار گیرند. در کنار چنین مولکول‌های درشتی، یون‌هایی نظیر Zn^{2+}، هدف انتخاب آپتامر قرار گرفته‌اند؛ روشی که در آن، یک ماتریکس ثابت توسط این یون‌ها باردار شده و سپس کتابخانه الیگونوکلئوتیدی در مجاورت آن قرار داده می‌شود (۹).

از کوچک‌ترین هدف‌های مولکولی استفاده‌شده، اتانول‌آمین است که حاوی دو گروه عاملی OH و NH_2 است. در موارد نادری حتی از ترکیبات اسیدنوکلوئیکی هم به‌عنوان هدف، استفاده شده است (۱۰). ساختار سوم RNAها باعث شده است که آنها در چندین فرآیند بیولوژیکی مهم ازجمله تنظیم بیان ژن (از طریق هدف قراردادن mRNA) هم نقش داشته باشند. هدف‌قراردادن تنظیم بیان ژن و پروتئین‌سازی باعث شده است که آپتامرها به‌عوامل درمانی‌ای برای پاتوژن‌ها و حتی برخی از سرطان‌ها، تبدیل شوند (۵).

علاوه بر آپتامرهایی که تنها یک مولکول را هدف قرار می‌دهند[1]، فناوری SELEX برای مخلوطی از هدف‌های پیچیده مانند: کل سلول، بافت‌ها و ارگانیزم‌ها هم کارآیی دارد. در این چنین مواردی استخر نهایی آپتامر، از پیچیدگی بالایی برخوردار خواهد بود. این روش در SELEX، اغلب پروسه را به سمت انتخاب مخلوطی از آپتامرهایی می‌برد که پروتئین‌های سطح سلول را هدف قرار می‌دهند؛ از این رو فرآیند انتخاب آپتامر می‌تواند در تشخیص تغییرات ایجادشده در ساختمان سلول بر اثر تغییر شرایط محیطی و یا بیماری، مورد استفاده قرار گیرد. هنگامی که به‌دنبال آپتامر برای یک هدف هستیم (Single target)، باید خلوص و غلظت مولکولی هدف کافی باشد. این موضوع به کم‌شدن تعداد الیگونوکلئوتیدهای غیراختصاصی و افزایش اختصاصیت آپتامر منتخب، کمک می‌کند (۱۱).

از جمله خصوصیات هدف که انتخاب آپتامر را ساده می‌کند، حضور گروه‌هایی با شارژ مثبت (آمین نوع اول)، حضور دهنده‌ها و گیرنده‌های پیوند هیدروژنی و ترکیبات آروماتیک است. انتخاب آپتامر برای هدف‌هایی با خصوصیات آب‌گریز زیاد و یا مولکول‌های دارای شارژ منفی (مانند گروه فسفات)، بسیار مشکل‌تر است؛ زیرا آپتامرها از طریق ترکیبی از: مکمل بودن شکل آنها با هدف، میان‌کنش بین ترکیبات آروماتیک، بازهای آلی آپتامرها، میان‌کنش‌های الکتروستاتیک بین گروه‌های باردار و یا باندهای هیدروژنی، به هم متصل می‌شوند (۱۲).

در حضور هدف و تشکیل کمپلکس اتصال، آپتامرها دستخوش تغییرات کنفورماسیونی قرار می‌گیرند. تاخوردن آپتامر به ساختارهای سه‌بعدی، اجازه می‌دهد تا آپتامر، مولکول‌های هدف کوچک را به‌وسیله ساخت یک محفظه کپسول‌مانند، در خود نگه دارد. در هدف‌هایی با وزن مولکولی بالا مانند پروتئین‌ها، زیرساخت‌های متفاوتی در سطح مولکول وجود دارند که در اتصال به آپتامر نقش دارند. به‌عنوان مثال زنجیره جانبی آمینواسیدهای بازی (لیزین و آرژینین) معمولاً عامل ایجاد پیوند هیدروژنی داخل مولکولی هستند (۳، ۱۳).

آپتامر؛ اصلاحات و خصوصیات

ساخت آپتامرها ابتدا با RNAهای اصلاح‌نشده آغاز گردید (۵، ۶)؛ سپس با ساخت آپتامرهای ssDNA برای اهداف مختلف (۷) و همچنین ساخت آپتامر به‌وسیله نوکلئوتیدهای اصلاح‌شده (۱۴)، ادامه یافت. اصلاح شیمیایی می‌تواند ترکیبات جدیدی از آپتامرها را معرفی کند که توانایی اتصال و پایداری بالاتری از خود نشان می‌دهند.

[1] *Single target*

کاربرد نوکلئوتیدهای اصلاح‌شده در ساخت کتابخانه‌ی الیگونوکلئوتیدی

علاوه بر اسیدنوکلئیک‌های مرسوم، کتابخانه‌ی الیگونوکلئوتیدی اصلاح‌شده به روش شیمیایی (با هدف افزایش پیچیدگی کتابخانه به‌منظور معرفی برخی خصوصیات جدید مثل گروه‌های عاملی جدید که امکان برقراری میان‌کنش با هدف را فراهم می‌کنند تا پایداری کنفورماسیون الیگونوکلئوتیدها را افزایش دهند یا مقاومت آپتامر را به نوکلئاز زیاد کنند و ...) نیز در SELEX استفاده می‌گردد. تنها مشکل اصلاح اسیدهای نوکلئیک، ناسازگاری نوکلئوتیدهای اصلاح‌شده با آنزیم‌های مورد استفاده در SELEX است.

نقطه اصلی و مرسوم در اصلاح نوکلئوتیدها، جایگاه 2′ قند RNA است. گروه OH جایگاه 2′ نوکلئوتید پیریمیدین، با یک گروه NH_2 یا گروه F که RNA را در مقابل تجزیه نوکئازها حفاظت می‌کند، جایگزین می‌شود. همچنین کتابخانه‌های RNA حاوی نوکلئوتیدهایی هستند که در آن گروه o-methyl، جایگزین OH جایگاه 2′ می‌شوند (۱۵).

کاربردهای جدیدی برای اسیدهای نوکلوئیک به‌وسیله اصلاح کربن C-5 بازهای پیریمیدین و کربن C-8 بازهای پورین می‌توان ایجاد نمود. نویسندگان مختلف اشاره کرده‌اند که این نوکلئوتیدهای اصلاح‌شده، در انتخاب DNA برای هدف‌های آنیونی به‌کار برده می‌شوند؛ به‌عنوان مثال قرار دادن گروه آمین در کربن شماره ۵ باز آلی و همچنین آپتامرهای اصلاح‌شده توسط کاتیون‌ها، به ترتیب برای هدف قراردادن سیالیل‌لاکتوز[۱] و ATP[۲] به کار می روند (۱۶).

از دیگر اصلاحات آپتامر می‌توان به ایجاد تغییر در بدنه فسفاتی اسیدنوکلوئیک اشاره نمود. یکی از اصلاحات رایج و محبوب، جایگزینی یکی از اکسیژن‌های غیر پیوندی در پیوند فسفودی‌استر با سولفور است. این عمل باعث تولید اتصال فسفورو تیوآت[۳] می‌شود که در نهایت، اولیگونوکلئوتیدهای فسفورو تیوآت در برابر هضم توسط نوکلئازها مقاوم‌تر می‌شوند. نمونه‌ای از این تیوآپتامرها[۴] در کار Jhaveri گزارش شده است (۱۷).

برخی از سایر کتابخانه‌های الیگونوکلئوتیدی اصلاح‌شده، برای سنجش کمّی الیگونوکلئوتیدهای انتخاب‌شده در طول پروسه SELEX (تشخیص استخر غنی شده) استفاده می‌شوند (مانند نشاندارکردن نوکلئوتیدها با عوامل فلورسانس یا رادیو اکتیو). معمولاً این نوکلئوتیدهای نشاندار، به انتهای 5′ آپتامرها متصل می‌شوند.

اصلاح آپتامرها پس از فرآیند SELEX

اصلاحات پس از SELEX، هم به‌منظور افزایش پایداری آپتامرهای انتخاب‌شده و هم به‌منظور بهینه‌کردن پارامترهای اتصال به هدف انجام می‌شود. اصلاحات اغلب توسط گروه‌های عاملی و به‌منظور بهبود کارهای تشخیصی و تثبیت آپتامرها در سطح ماتریکس‌های مختلف نیز صورت می‌گیرد.

همانطور که گفته شد، برای افزایش پایداری آپتامرها به نوکلئازها می‌توان از جایگزینی گروه OH کربن شماره ۲ قند با گروه‌های F و NH_2 یا متیل استفاده کرد. پوشاندن انتهای 3’ آپتامر با بیوتین–استراپتاویدین، تیمیدین معکوس و یا پوشاندن انتهای 5’ با آمین، فسفات، PEG[۵]، کلسترول، اسیدهای چرب، پروتئین‌ها و ...، آپتامرها را در برابر اگزونوکلئازها محافظت می‌کند (۱۴).

اسیدنوکلوئیک‌های قفل‌شده[۶]، پایداری آپتامرها را به‌دلیل افزایش پایداری در برابر حرارت و عدم انطباق در هنگام مخلوط‌شدن با RNA یا DNA، افزایش می‌دهند؛ علاوه بر این، در برابر تجزیه با نوکلئازها نیز مقاومت ایجاد می‌کنند (در

[۱] اولیگوساکارید موجود در شیر انسان (Sialyllactose)
[۲] مولکولی سرشار از بار منفی

[3] *Phosphorothioate*
[4] *Thioaptamer*
[5] *PolyEthylene Glycol*
[6] *locked nucleic acids- LNA*

LNA، کربن '2 هر نوکلوئتید با کربن '4، یک اتصال برقرار کرده و نوکلئوتید دوحلقه‌ای ایجاد می‌کند)(۱۸).

همانطور که پیش از این نیز اشاره شد، کوتاه‌سازی (Truncation) توالی‌ها به‌منظور باریک‌ساختن ناحیه اتصال به هدف، صورت می‌گیرد. نواحی‌ای که به‌طور مستقیم در اتصال به هدف نقش ندارند و همچنین نواحی‌ای که در ایجاد ساختار مورد نیاز برای اتصال به هدف نیز نقشی ندارند، حذف خواهند شد. گاهی اوقات فرآیند کوتاه‌سازی حتی تمایل آپتامر به هدف را بیشتر می‌کند.

یکی دیگر از اصلاحات بعد از SELEX، انجام Reselection است که موجب افزایش اختصاصیت و تمایل آپتامر به هدف می‌گردد. بدین‌منظور آپتامر کلون‌شده، برای بار دوم وارد مرحله انتخاب شده، آن هم در حالی که توالی‌های آپتامر موجود توسط نوکلوئتیدهای اصلاح شده و یا جهش‌یافته مجدداً متنوع شده‌اند. این انتخاب مجدد، به نوعی اتصال آپتامر به هدف را تضمین می‌کند (۱۹).

یک مثال موفق از فرآیند انتخاب مجدد، آپتامر Rous sarcoma virus (RSV) است. در ابتدا یک کتابخانه RNA اصلاح‌نشده برای انتخاب آپتامر این ویروس استفاده شد. پس از پایان مرحله انتخاب، آپتامرها با نوکلئوتید -'2 fluoropyrimidines اصلاح شدند که این عمل میل اتصال آنها را به RSV کاملاً از بین برد. پس از گذشت چند راند از مرحله Reselection، به آپتامرهایی خواهیم رسید که همانند آپتامرهای قبلی به RSV تمایل دارند و علاوه بر آن پایداری آنها به‌شدّت نیز افزایش یافته است.

انواع اصلاحات با گروه‌های آمین و فلورسنت نیز پیش از این شرح داده شد که به پایداری کاربردهای تشخیصی آپتامرها بسیار کمک می‌کند (۲۰).

برخی خصوصیات و معایب آپتامر

اندازه بسیار کوچک (7-15 kD) آپتامرها و اتصالات فسفودی استری در آنها، باعث می‌شود که این مولکول‌ها از نظر خصوصیات و رفتار، در جایگاهی بین مولکول‌های دارویی کوچک و آنتی‌بادی‌های درشت‌مولکول قرار گیرند.

۱- آنتی‌بادی‌ها اندازه بسیار بزرگی (150 kDa) دارند و همین امر موجب نفوذ بافتی کم و طول عمر پلاسمایی بالای آنها شده است. در کاربردهای درمانی به‌عنوان مثال هنگامی که آنتی‌بادی‌ها را به ترکیبات رادیواکتیو سیتوتوکسیک متصل می‌کنیم، طول عمر پلاسمایی بالای آنها موجب بروز سمیّت مغز استخوان می‌گردد (۲۱).

۲- در مقایسه با آنتی‌بادی‌ها، آپتامر، ورود آزادانه‌تری به بافت‌های مختلف دارد؛ اما همین مزیّت گاهی موجب حذف بیشتر آنها از مسیر کلیه می‌گردد. گاهی به‌منظور افزایش نیمه‌عمر پلاسمایی آپتامر، از اتصالات کلسترول، PEG[1]، لود آپتامرها در لیپوزوم و یا بیوتینیله‌کردن کربن ۳′ (کربن قند) استفاده می‌گردد (۲۲).

۳- آنتی‌بادی‌ها عموماً موجب تحریک سیستم ایمنی می‌شوند؛ در حالی که طی تحقیقات اخیر، آپتامرها هیچ‌گونه سمیّت یا ایمونوژنسیتی در پستانداران نشان نداده‌اند. حتی در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴ بر روی سمیّت نانوذرّات طلای جای داده شده در آپتامری با ساختار G-کوادراپلکس نیز هیچ‌گونه سمیّت حادی، حتی در دوزهای بالا، گزارش نشد[2] (۲۳).

۴- آپتامرهای اگزوژنیک، بسیار به آنزیم اگزونوکلئاز حساس می‌باشند. افزایش مقاوت به این آنزیم از طریق بلاک‌کردن انتهای آپتامر صورت می‌گیرد.

۵- بزرگترین مزیت آپتامر نسبت به آنتی‌بادی، اندازه و غیر پروتئینی بودن آن است و در اکثر موارد آپتامرها، بسیار پایدارتر از آنتی‌بادی‌ها هستند.

یکی از معایب اصلی آپتامرها، تجزیه سریع آنها توسط نوکلئازها می‌باشد که همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، با

[1] *PolyEthylene Glycol*

[2] *استفاده از نانوذرّات طلای ستاره‌ای در نقش درمانی و استفاده از آپتامر در نقش شناساگر سلول‌های سرطان سینه در موش.*

انجام اصلاحات شیمیایی بر روی آپتامرها می‌توان این عیب را برطرف کرد.

کاربرد آپتامرها

به‌خاطر خصوصیات جالبی که آپتامرها دارند، امروزه به‌طور گسترده‌ای در طراحی بیوسنسورها (آپتاسنسورها)، به‌عنوان عامل شناساگر، به‌کار رفته‌اند؛ از جمله: در طراحی سنسورهای رنگ‌سنجی، فلورسانس و الکتروشیمیایی برای طیف گسترده‌ای از اهداف مانند: داروها، سم‌ها و فلزات سنگین که در تمامی این موارد، نتایج مطلوبی به‌دست آمده است و سنسورهای ساخته‌شده دارای حدّ تشخیصی در حد نانومولار و پیکومولار بوده و اختصاصیت بسیار خوبی برای اهدافشان نشان داده‌اند (۲۴–۲۹).

همچنین از آپتامرها به‌طور گسترده در انتقال هدفمند عوامل شیمی‌درمانی به سلول‌های سرطانی استفاده شده است. برای این منظور، از آپتامرها به‌عنوان عامل شناساگر و واردشونده و طیف وسیعی از نانوذرات مانند: کربن نانوتیوب‌ها، نانوذرّات طلا، نانوذرّات سلیکا، نانوساختارهای DNA، کیتوسان و نانوپلیمروزوم‌ها به‌عنوان حامل استفاده شده است. در تمامی این مطالعات، سیستم‌های انتقال هدفمند طراحی‌شده، به‌خوبی توانسته‌اند سلول‌های سرطانی هدف را شناسایی کرده و وارد آنها شوند و در آنها سمیت ایجاد کنند؛ ولی بر خلاف داروهای شیمی‌درمانی توانسته‌اند میزان سمیّت را در سلول‌های سالم و کنترل به‌طور چشمگیری کاهش دهند (۳۰–۳۶). جدول زیر خلاصه‌ای از این کاربردها را نشان می‌دهد (جدول ۱).

تمامی آنچه که در بالا گفته شد، به‌خوبی نشان‌دهنده پتانسیل و کاربرد بسیار بالای آپتامرها در حوزه پزشکی و حتی سایر حوزه‌ها می‌باشد. با این وجود، برای ورود بهتر و سریع‌تر آپتامرها به این حوزه‌ها باید گام‌هایی در جهت ایجاد روش‌های سریع‌تر و ارزان‌تر برای جداسازی آپتامرها برای اهدافشان، بررسی مطالعات بیشتر بر روی پایداری آپتامرها و مطالعات حیوانی بیشتر بر روی آنها انجام شود.

جدول0 -کاربردهای آپتامر

کاربردهای ابزاری	۱- کشف و ردیابی مسیرهای انتقال سیگنال	اتصال اختصاصی و غیر اختصاصی آپتامرها برای مهار یا فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ سلولی، پرونئین‌های پیامبر و گیرنده‌های داخل سلولی (مانند گیرنده‌های G–پروتئین).
	۲- بیان یا عدم بیان ژن	این آپتامرها با اتصال به بخش‌هایی از ژن، موجب بیان آن می‌گردند. اما اتصال یا عدم اتصال این آپتامرها، تحت کنترل لیگاندهای خاصی است؛ به این مفهوم که در حضور این لیگاند و اتصال آن به آپتامر، آپتامر توانایی اتصال به ژن و بیان آن را ندارد.
	۳- کاربردهای آنتی‌بیوتیکی	طبیعی‌ترین آپتامرهای موجود در بدن، RNAهای ریبوزومی هستند. آمینوگلیکوزیدها در نقش لیگاند این آپتامرها می‌توانند موجب از بین بردن فعالیت آنزیمی RNAهای باکتریایی شده و پروتئین‌سازی را مختل نمایند.
	۴- کاربردهای تشخیصی درون‌تنی و برون‌تنی	شناسایی ترکیبات مختلف از یون تا ماکرومولکول‌هایی نظیر پروتئین، دقت اندازه‌گیری گاهی تا حد زِپتومول (40×10^{-20}) مشاهده شده است.
کاربردهای درمانی (آپتامرها می‌توانند از طریق اتصال به جایگاه فعال پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های فعال، در درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرند) (۳۷)	۵- آپتامرهای فاکتور رشد	فاکتور رشد اندوتلیال عروق و همچنین فاکتور رشد پلاکتی، همواره از اهداف مورد علاقه در درمان توسط آپتامرها بوده‌اند.
	۶- آپتامرهایی با هدف‌های درون‌سلولی	آپتامرهایی با خاصیت مهار فاکتورهای رونویسی پروتواونکوژنیک (*Protooncogenic factors transcription*)، نظیر NFκB (مهار آپوپتوز در سلول‌های سرطانی) و یا فاکتورهای رونویسی چرخه سلولی (transcription factor Cell cycle) E2F
	۷- هدف قرار دادن فاکتورهای التهابی و فاکتورهای دخیل در بیماری‌های خود ایمنی	به‌دلیل ایمونوژنسیتی پایین آپتامرها، استفاده از آنها در بیماری‌های خود ایمنی امکان‌پذیر است. آپتامرهای متصل‌شونده به آنتی‌بادی‌هایی که رسپتورهای استیل‌کولسترین (Acetylcholesterin-receptor) را در بیماری میاستنی گراویس هدف قرار می‌دهند، از این دسته به حساب می‌آیند.
	۸- نقش تنظیمی آپتامرها در بیماری	انتخاب آپتامر بر ضدّ فاکتورهای انعقادی نظیر ترومبین IXa و VIIa.

منابع:

1- Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX—a (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. Biomol Eng. 2007;24(4):381-403.

2- Blank M, Blind M. Aptamers as tools for target validation. Curr Opin Chem Biol. 2005; 9(4): 336-42.

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

4- Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Science. 1991; 251(4995): 767-73.

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

6- Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature. 1990; 346(6287): 818-22.

7- Ellington AD, Szostak JW. Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. Nature. 1992; 355(6363): 850-2.

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

9- Ciesiolka J, Yarus M. Small RNA-divalent domains. RNA. 1996; 2(8): 785-93.

10- Mann D, Reinemann C, Stoltenburg R, Strehlitz B. In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine. Biochem Biophys Res Commun. 2005; 338(4): 1928-34.

11- Blank M, Weinschenk T, Priemer M, Schluesener H. Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels: Selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen. J Biol Chem. 2001; 276(19): 16464-8.

12- Wilson DS, Szostak JW. In vitro selection of functional nucleic acids. Annu Rev Biochem. 1999; 68: 611-47.

13- Patel DJ. Structural analysis of nucleic acid aptamers. Curr Opin Chem Biol. 1997; 1(1): 32-46.

14- Green LS, Jellinek D, Bell C, Beebe LA, Feistner BD, Gill SC, et al. Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. Chem Biol. 1995; 2(10): 683-95.

15- Burmeister PE, Lewis SD, Silva RF, Preiss JR, Horwitz LR, Pendergrast PS, et al. Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF. Chem Biol. 2005; 12(1): 25-33.

16- Masud MM, Kuwahara M, Ozaki H, Sawai H. Sialyllactose-binding modified DNA aptamer bearing additional functionality by SELEX. Bioorg Med Chem. 2004; 12(5): 1111-20.

17- Jhaveri S, Olwin B, Ellington AD. In vitro selection of phosphorothiolated aptamers. Bioorg Med Chem Lett. 1998;8(17):2285-90.

18- Darfeuille F, Hansen JB, Orum H, Di Primo C, Toulmé JJ. LNA/DNA chimeric oligomers mimic RNA aptamers targeted to the TAR RNA element of HIV-1. Nucleic Acids Res. 2004; 32(10): 3101-7.

19- Held DM, Greathouse ST, Agrawal A, Burke DH. Evolutionary landscapes for the acquisition of new ligand recognition by RNA aptamers. J Mol Evol. 2003; 57(3): 299-308.

20- Pan W, Craven RC, Qiu Q, Wilson CB, Wills JW, Golovine S, et al. Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(25): 11509-13.

21- Hicke BJ, Stephens AW. Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy. J Clin Invest. 2000; 106(8): 923-8.

22- Healy JM, Lewis SD, Kurz M, Boomer RM, Thompson KM, Wilson C, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions. Pharm Res. 2004; 21(12): 2234-46.

23- Dam DH, Culver KS, Kandela I, Lee RC, Chandra K, Lee H, et al. Biodistribution and in vivo toxicity of aptamer-loaded gold nanostars. Nanomedicine. 2015; 11(3): 671-9.

24- Abnous K, Danesh NM, Alibolandi M, Ramezani M, Sarreshtehdar Emrani A, Zolfaghari R, et al. A new amplified π-shape electrochemical aptasensor for ultrasensitive detection of aflatoxin B1. Biosens Bioelectron. 2017; 94: 374-9.

25- Abnous K, Danesh NM, Alibolandi M, Ramezani M, Taghdisi SM, Emrani AS. A novel electrochemical aptasensor for ultrasensitive detection of fluoroquinolones based on single-stranded DNA-binding protein. Sens Actuators B Chem. 2017; 240: 100-6.

26- Lavaee P, Danesh NM, Ramezani M, Abnous K, Taghdisi SM. Colorimetric aptamer based assay for the determination of fluoroquinolones by triggering the reduction-catalyzing activity of gold nanoparticles. Mikrochim Acta. 2017; 184(7): 2039-45.

27- Ramezani M, Mohammad Danesh N, Lavaee P, Abnous K, Mohammad Taghdisi S. A novel colorimetric triple-helix molecular switch aptasensor for ultrasensitive detection of tetracycline. Biosens Bioelectron. 2015; 70: 181-7.

28- Taghdisi SM, Danesh NM, Ramezani M, Alibolandi M, Abnous K. Voltammetric determination of lead(II) by using exonuclease III and gold nanoparticles, and by exploiting the conformational change of the complementary strand of an aptamer. Mikrochim Acta. 2017; 184(8): 2783-90.

29- Taghdisi SM, Danesh NM, Ramezani M, Ghows N, Mousavi Shaegh SA, Abnous K. A novel fluorescent aptasensor for ultrasensitive detection of microcystin-LR based on single-walled carbon nanotubes and dapoxyl. Talanta. 2017; 166: 187-92.

30- Abnous K, Danesh NM, Ramezani M, Lavaee P, Jalalian SH, Yazdian-Robati R, et al. A novel aptamer-based DNA diamond nanostructure for in vivo targeted delivery of epirubicin to cancer cells. RSC Adv. 2017; 7(25): 15181-8.

31- Abnous K, Danesh NM, Ramezani M, Yazdian-Robati R, Alibolandi M, Taghdisi SM. A novel chemotherapy drug-free delivery system composed of three therapeutic aptamers for the treatment of prostate and breast cancers in vitro and in vivo. Nanomedicine. 2017; 13(6): 1933-40.

32- Alibolandi M, Abnous K, Hadizadeh F, Taghdisi SM, Alabdollah F, Mohammadi M, et al. Dextran-poly lactide-co-glycolide polymersomes decorated with folate-antennae for targeted delivery of docetaxel to breast adenocarcinima in vitro and in vivo. J Control Release. 2016; 241: 45-56.

33- Babaei M, Abnous K, Taghdisi SM, Farzad SA, Peivandi MT, Ramezani M, et al. Synthesis of theranostic epithelial cell adhesion molecule targeted mesoporous silica nanoparticle with gold gatekeeper for hepatocellular carcinoma. Nanomedicine (Lond). 2017; 12(11): 1261-79.

34- Taghavi S, Ramezani M, Alibolandi M, Abnous K, Taghdisi SM. Chitosan-modified PLGA nanoparticles tagged with 5TR1 aptamer for in vivo tumor-targeted drug delivery. Cancer Lett. 2017; 400: 1-8.

35- Taghdisi SM, Danesh NM, Lavaee P, Emrani AS, Hassanabad KY, Ramezani M, et al. Double targeting, controlled release and reversible delivery of daunorubicin to cancer cells by polyvalent aptamers-modified gold nanoparticles. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2016; 61: 753-61.

36- Taghdisi SM, Lavaee P, Ramezani M, Abnous K. Reversible Targeting and controlled release delivery of daunorubicin to cancer cells by aptamer-wrapped carbon nanotubes. Eur J Pharm Biopharm. 2011; 77(2): 200-6.

37- White RR, Sullenger BA, Rusconi CP. Developing aptamers into therapeutics. J Clin Invest. 2000; 106(8): 929-34.