

Aptamers: Isolation, modification, characteristics, and applications

Noor Mohammad Danesh¹, Farzaneh Yousefi², Morteza Alinezhad Nameghi³,
Khalil Abnous⁴, Seyed Mohammad Taghdisi⁵

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

آپتامرها، جداسازی، اصلاحات، خصوصیات و کاربردها

نورمحمد دانش^۱، فرزانه یوسفی^۲، مرتضی علی نژاد نامقی^۳، خلیل آبنوس^۴، سید محمد تقدیسی^۵

چکیده

آپتامرها الیگونیوکلوئیدیهای 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 می توانند در حوزه پزشکی کاربرد داشته باشند، مورد بررسی قرار خواهد گرفت. این مطالعه نشان می دهد که آپتامرها به واسطه برخورداری از خصوصیات برجسته ای مانند: میل پیوندی و اختصاصیت بالا برای اهداف خود، سنتز ارزان و برون تنی، پایداری بالا و اندازه کوچک، گزینه های بسیار مناسبی در علوم پزشکی برای کاربرد در زیست حسگرها و سامانه های انتقال هدفمند هستند.

واژه های 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 سم شناسی، 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

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^۲ (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. نوکلئیک اسیدها ترکیبات بسیار جذابی در این شاخه از علم شیمی به حساب می آیند؛ زیرا همان طور که گفته شد، می توانند به شکل ساختار دوم و سوم درآمده و توسط PCR^۳ در محیط آزمایشگاهی تکثیر یابند.

تعداد زیادی از رشته های الیگونوکلوئیدی (۱۰^{۱۵}) با توالی های تصادفی، از طریق سنتز شیمیایی، تولید شده و غربالگری می شوند؛ سپس برای انتخاب لیگاندهایی با میل ترکیبی بالا (Aptamer) و یا برای کاربردهای کاتالیزوری (Ribozyme, DNAzymes) مورد استفاده قرار می گیرند. مخلوط این توالی ها را کتابخانه ی الیگونوکلوئیدی می نامند.

در سال ۱۹۹۰، در یک روش جدید، از یک کتابخانه الیگونوکلوئیدی برای انتخاب آپتامرهای RNA با میل ترکیبی و اختصاصیت بالا برای اتصال به اهداف غیر اسیدنوکلئیکی استفاده شد. Tuerk و Gold، میانکنش بین gp43 T4 DNA Polymerase (۱) و بکتریوفاجی و محل

آپتامر، از دو بخش لاتین Aptus به معنای Fitting و کلمه یونانی Meros به معنای ذره تشکیل شده است؛ در واقع معنای دقیق تر آن «ذره ی قابل تطبیق» می باشد (۱). اگر بخواهیم به معنای گسترده تر آپتامر بنگریم، آپتامر در واقع قطعات کوچک از توالی های پپتیدی یا اسیدنوکلئیکی هستند که با تشکیل ساختارهای سه بعدی، توانایی اتصال اختصاصی به مولکول هدف را دارند (درست مانند آنتی بادی های بلند زنجیر، اما این بار با اندازه ای ده ها بار کوچک تر از یک مولکول آنتی بادی)؛ اگرچه در بیشتر مواقع، اصطلاح آپتامر به آپتامرهای اسیدنوکلئیکی اطلاق می گردد که از طریق فرآیند SELEX^۱ انتخاب شده اند (۲). بر اساس این تعریف، آپتامر در سال های اخیر به عرصه های گوناگونی ورود کرده است.

حال نکته قابل تأمل اینجاست که چه عاملی موجب ایجاد تفاوت میان آپتامرهای مختلف یا حتی میان آپتامر و مهم ترین رقیب آن یعنی آنتی بادی می شود؟ خصوصیات شیمیایی و فرآیند انتخاب آپتامرها چه اثری بر عملکرد آنها می گذارد؟

همان طور که اشاره شد، آپتامرها اولیگومرهای تک رشته ای اسیدنوکلئیک (ssDNA و RNA) هستند که می توانند ساختارهای دو و سه بعدی خاصی از جمله: Stems, Loops, Bulges (شکم ها)، Hairpins (سجاق سر)، Pseudoknots (شبه گره ها)، Triplexes یا Quadruplexes را تشکیل دهند. بر اساس همین ساختارهای چندبعدی، آپتامر می تواند به مولکول های کوچک، کمپلکس ها و یا حتی ارگانیسم ها متصل شود. اتصال آپتامر به هدف، نتیجه مطابقت ساختاری این دو، تجمع حلقه های آروماتیک، میان کنش های الکتروستاتیک، واندروالس، باندهای هیدروژنی و یا حتی ترکیبی از اینهاست (۳).

آپتامرها از نظر اقتصادی اهمیت بالایی دارند و پیش بینی می شود که تا سال ۲۰۱۸، ارزش بازار آنها به حدود ۲/۱ میلیارد

^۲ Combinatorial Chemistry به ساخت تعداد زیادی از مولکول ها یا مواد مختلف در یک فرآیند شیمیایی گفته می شود. در سنتز ترکیبی، تعداد ترکیبات ساخته شده به صورت نمایی با تعداد مراحل شیمیایی افزایش می یابد. تولید مولکول های کوچک نظیر الیگوپپتیدها یا الیگونوکلوئیدها یکی از مباحث مهم در شیمی ترکیبی می باشد.

^۳ Polymerase Chain Reaction

^۱ Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment

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 الیگونوکلیوتیدهای 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، الیگونوکلیوتیدهای متصل‌شده به هدف، از هدف جداسازی شده (شستشو داده می‌شوند) 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 تک‌رشته‌ی باقیمانده، وارد چرخه دوم SELEX شده و به‌طور مجدد در مجاورت هدف قرار می‌گیرد. به‌دلیل تکرارشونده بودن این چرخه‌ی انتخاب و تکثیر الیگونوکلیوتیدها در هر مرحله، استخر توالی در هر مرحله دستخوش کاهش تنوع الیگونوکلیوتید قرار می‌گیرد؛ در حالی که میل ترکیبی الیگونوکلیوتیدهای باقیمانده، رفته‌رفته افزایش می‌یابد.

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

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

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 می‌گردد. آنها نام فرآیند انتخاب توالی خود را «SELEX» به معنای انتخاب هدفمند لیگاند به‌روش غنی‌سازی نمایی، گذارند (۵).

Ellington و Szostak، به‌طور جداگانه فرآیند انتخاب مشابهی را برای جداسازی مولکول‌های RNA از کتابخانه‌ی تصادفی RNA، به‌منظور اتصال قوی به مولکول‌های کوچک سیباکروم‌بلو و ریاکتیو بلو^۴ (رنگ‌های آلی)، به‌کار بردند و نام توالی‌های RNA خود را آپتامر نهادند (۶). حدود دو سال بعد اولین توالی ssDNA از کتابخانه‌ی 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 دارویی را یادآور می‌شود که به سمت انتخاب توالی‌هایی با میل ترکیبی بیشتر به مولکول هدف، پیش می‌رود.

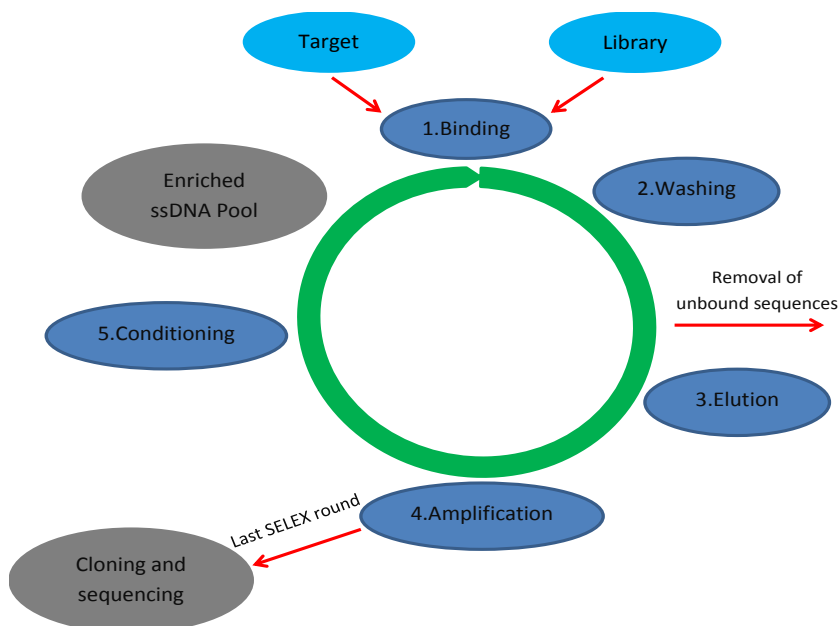
نقطه آغاز فرآیند SELEX، سنتز شیمیایی کتابخانه تصادفی الیگونوکلیوتیدی DNA است که حاوی ^{۱۳} تا ^{۱۵} موتیف^۴ با توالی‌های متفاوت ۲۰ تا ۸۰ نوکلئوتیدی است. دو نوع اصلی آپتامر وجود دارد: ssDNA و RNA. حال اگر هدف، تولید آپتامر DNA باشد، می‌توان از همین

^۴ Motif

باعث اتصال رقابتی قوی‌ترین الیگونوکلوئوتیدها می‌گردد (۸).
پروسه SELEX، پس از مرحله تکثیر، در آخرین راند متوقف شده و الیگونوکلوئوتیدهای 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 حدی اختصاصیت را نیز افزایش می‌دهد. چنین فرآیندهایی در کنار سایر موارد از جمله جایگزین کردن نوکلئوتیدهای اصلاح‌شده (جایگزین کردن گروه‌های NH_2 به جای OH قند نوکلئوتیدها) که موجب افزایش پایداری آپتامر در کارهای آنالیزی و خالص‌سازی ترکیبات می‌شود، تحت عنوان فرآیندهای Post-SELEX مشهور هستند.

باقی بماند. (بدین منظور 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 به منظور انتخاب آپتامر برای یک اپیتوپ خاص از یک هدف، حتماً فرآیند انتخاب منفی به کار گرفته می‌شود. در این راستا به عنوان راند اول، ابتدا هدف‌های مشابه هدف اصلی و یا اپیتوپ‌هایی که مدّ نظر نیستند، در مجاورت کتابخانه قرار می‌گیرند تا الیگونوکلوئوتیدهایی که به آنها تمایل دارند، حذف شوند. میل ترکیبی و اختصاصیت الیگونوکلوئوتیدها 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



شکل-۵ پنج مرحله انتخاب هدفمند لیگاند، به روش غنی‌سازی نمایی (SELEX) (۱: Binding: اتصال الیگونوکلوئوتیدهای کتابخانه به هدف. ۲: Partition (Washing): جداسازی الیگونوکلوئوتیدهای متصل نشده به هدف. ۳: Elution: جداسازی الیگونوکلوئوتیدهای متصل شده از هدف. ۴: Amplification: تکثیر الیگونوکلوئوتیدهای انتخاب‌شده در مرحله Elution به وسیله 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 NH_2 و OH است. در موارد نادری حتی از ترکیبات اسیدنوکلئیکی 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. هدف قراردادن 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^۱، فناوری SELEX برای مخلوطی از هدف‌های پیچیده مانند: کل سلول، بافت‌ها و ارگانیسم‌ها هم کارایی 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 آرژنین) 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 اصلاح شده در ساخت کتابخانه‌ی الیگونوکلئوتیدی

علاوه بر اسیدنوکلئیک‌های مرسوم، کتابخانه‌ی الیگونوکلئوتیدی اصلاح شده به روش شیمیایی (با هدف افزایش پیچیدگی کتابخانه به منظور معرفی برخی خصوصیات جدید مثل گروه‌های عاملی جدید که امکان برقراری میان کنش 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 اصلاح شده 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 NH₂ یا گروه F که RNA را در مقابل تجزیه نوکلئازها 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 نوکلئیک به وسیله اصلاح کربن C-5 بازهای پیریمیدین و کربن C-8 بازهای پورین می‌توان ایجاد نمود. نویسندگان مختلف اشاره کرده‌اند که این نوکلئوتیدهای اصلاح شده، در انتخاب DNA برای هدف‌های آنیونی به کار برده می‌شوند؛ به عنوان مثال قرار دادن گروه آمین در کربن شماره ۵ باز آلی و همچنین آپتامرهای اصلاح شده توسط کاتیون‌ها، به ترتیب برای هدف قراردادن سیالیل لاکتوز^۱ و ATP^۲ به کار می‌روند (۱۶).

از دیگر اصلاحات آپتامر می‌توان به ایجاد تغییر در بدنه فسفات‌ی اسیدنوکلئیک 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 تیوات^۳ می‌شود که در نهایت، اولیگونوکلئوتیدهای فسفورو تیوات در برابر هضم توسط نوکلئازها مقاوم‌تر می‌شوند. نمونه‌ای از این تیوآپتامرها^۴ در کار Jhaveri گزارش شده است (۱۷).

برخی از سایر کتابخانه‌های الیگونوکلئوتیدی اصلاح شده، برای سنجش کمی الیگونوکلئوتیدهای انتخاب شده در طول پروسه SELEX (تشخیص استخر غنی شده) استفاده می‌شوند (مانند نشاندار کردن 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 به منظور افزایش پایداری آپتامرهای انتخاب شده و هم به منظور بهینه کردن پارامترهای اتصال به هدف انجام می‌شود. اصلاحات اغلب توسط گروه‌های عاملی و به منظور 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 NH₂ یا متیل استفاده کرد. پوشاندن انتهای 3' آپتامر با بیوتین-استرپتاویدین، 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).

اسیدنوکلئیک‌های قفل شده^۶، پایداری آپتامرها را به دلیل افزایش پایداری در برابر حرارت و عدم انطباق در هنگام مخلوط شدن با RNA یا DNA، افزایش می‌دهند؛ علاوه بر این، در برابر تجزیه با نوکلئازها نیز مقاومت ایجاد می‌کنند (در

³ Phosphorothioate

⁴ Thioaptamer

⁵ PolyEthylene Glycol

⁶ locked nucleic acids- LNA

^۱ اولیگوساکارید موجود در شیر انسان (Sialyllactose)

^۲ مولکولی سرشار از بار منفی

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

همانطور که پیش از این نیز اشاره شد، کوتاه‌سازی (Truncation) توالی‌ها به منظور باریک‌ساختن ناحیه اتصال به هدف، صورت می‌گیرد. نواحی‌ای که به طور 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. بدین منظور آپتامر کلون شده، برای بار دوم وارد مرحله انتخاب شده، آن هم در حالی که توالی‌های آپتامر موجود توسط نوکلئوتیدهای 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 به شدت 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 به عنوان مثال هنگامی که آنتی‌بادی‌ها را به ترکیبات رادیواکتیو سیتوتوکسیک متصل می‌کنیم، طول عمر پلاسمایی بالای آنها موجب بروز سمیت مغز استخوان می‌گردد (۲۱).

۲- در مقایسه با آنتی‌بادی‌ها، آپتامر، ورود آزادانه‌تری به بافت‌های مختلف دارد؛ اما همین مزیت گاهی موجب حذف بیشتر آنها از مسیر کلیه می‌گردد. گاهی به منظور افزایش نیمه عمر پلاسمایی آپتامر، از اتصالات کلاسترول، PEG^۱، لود آپتامرها در لیپوزوم و یا بیوتینیل‌کردن کربن ۳' (کربن قند) استفاده می‌گردد (۲۲).

۳- آنتی‌بادی‌ها عموماً موجب تحریک سیستم ایمنی می‌شوند؛ در حالی که طی تحقیقات اخیر، آپتامرها هیچ‌گونه سمیت یا ایمونوژنسیتی در پستانداران نشان نداده‌اند. حتی در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴ بر روی سمیت نانوذرات طلای جای داده شده در آپتامری با ساختار G-کوادرابلکس نیز هیچ‌گونه سمیت حادی، حتی در دوزهای بالا، گزارش نشد^۲ (۲۳).

۴- آپتامرهای اگزونیک، بسیار به آنزیم اگزونوکلئاز حساس می‌باشند. افزایش مقاوت به این آنزیم از طریق بلاک کردن 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

^۱ PolyEthylene Glycol

^۲ استفاده از نانوذرات طلای ستاره‌ای در نقش درمانی و استفاده از آپتامر در نقش شناساگر سلول‌های سرطان سینه در موش.

نانوذرات طلا، نانوذرات سلیکا، نانوساختارهای DNA، کیتوسان و نانوپلیمرزومها به عنوان حامل استفاده شده است. در تمامی این مطالعات، سیستم‌های انتقال هدفمند طراحی شده، به خوبی توانسته‌اند سلول‌های سرطانی هدف را شناسایی کرده و وارد آنها شوند و در آنها سمیت ایجاد کنند؛ ولی بر خلاف داروهای شیمی درمانی توانسته‌اند میزان سمیت را در سلول‌های سالم و کنترل به طور چشمگیری کاهش دهند (۳۰-۳۶). جدول زیر خلاصه‌ای از این کاربردها را نشان می‌دهد (جدول ۱).

تمامی آنچه که در بالا گفته شد، به خوبی 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.

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

کاربرد آپتامرها

به خاطر خصوصیات جالبی که آپتامرها دارند، امروزه به طور گسترده‌ای در طراحی بیوسنسورها (آپتاسنسورها)، به عنوان عامل شناساگر، به کار 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 به دست آمده است و سنسورهای ساخته شده دارای حد تشخیصی در حد نانومولار و پیکومولار بوده و اختصاصیت بسیار خوبی برای اهدافشان نشان داده‌اند (۲۴-۲۹).

همچنین از آپتامرها به طور گسترده در انتقال هدفمند عوامل شیمی درمانی به سلول‌های سرطانی استفاده شده است. برای این منظور، از آپتامرها به عنوان عامل شناساگر و واردشونده و طیف وسیعی از نانوذرات مانند: کربن نانوتیوب‌ها،

جدول ۱- کاربردهای آپتامر

۱- کشف و ردیابی مسیرهای انتقال سیگنال ۲- بیان یا عدم بیان ژن ۳- کاربردهای آنتی‌بیوتیکی ۴- کاربردهای تشخیصی درون تنی و برون تنی	اتصال اختصاصی و غیر اختصاصی آپتامرها برای مهار یا فعال سازی مسیرهای سیگنالینگ سلولی، پروتئین‌های پیامبر و گیرنده‌های داخل سلولی (مانند گیرنده‌های G-پروتئین). 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. 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. شناسایی ترکیبات مختلف از یون تا ماکرومولکول‌هایی نظیر پروتئین، دقت اندازه‌گیری گاهی تا حد زپتومول ($10^{-20} \times 40$) مشاهده شده است.	کاربردهای ابزاری
۵- آپتامرهای فاکتور رشد ۶- آپتامرهایی با هدف‌های درون سلولی ۷- هدف قرار دادن فاکتورهای التهابی و فاکتورهای دخیل در بیماری‌های خود ایمنی ۸- نقش تنظیمی آپتامرها در بیماری	فاکتور رشد اندوتلیال عروق و همچنین فاکتور رشد پلاکتی، همواره از اهداف مورد علاقه در درمان توسط آپتامرها بوده‌اند. آپتامرهایی با خاصیت مهار فاکتورهای رونویسی پروتئوونکوژنیک (<i>Protooncogenic factors transcription</i>)، نظیر NFkB (مهار آپوپتوز در سلول‌های سرطانی) و یا فاکتورهای رونویسی چرخه سلولی (<i>E2F transcription factor Cell cycle</i>) به دلیل ایمونوژنسیته پایین آپتامرها، استفاده از آنها در بیماری‌های خود ایمنی امکان‌پذیر است. آپتامرهای متصل‌شونده به آنتی‌بادی‌هایی که رسپتورهای استیل کولسترین (<i>Acetylcholesterin-receptor</i>) را در بیماری میاستنی گراویس هدف قرار می‌دهند، از این دسته به حساب می‌آیند. انتخاب آپتامر بر ضد فاکتورهای انعقادی نظیر ترومبین VIIa و IXa.	کاربردهای درمانی (آپتامرها می‌توانند از طریق اتصال به جایگاه فعال پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های فعال، در درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرند) (۳۷)

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 adenocarcinoma 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.