

· 新技术 · 新方法 ·

NEW TECHNOLOGY AND NEW METHOD



核酸适配体技术及其在肿瘤诊断和治疗中的应用

孙红光¹, 张金三¹, 吴建波², 祖幼立^{3*}, 朱迅^{4**}

(1. 温州医科大学附属第一医院精准医学中心, 浙江 温州 325000; 2. 温州医科大学附属第一医院中心实验室, 浙江 温州 325000; 3. 美国康奈尔大学医学院休斯敦 Methodist 医院, 德克萨斯州 休斯敦 77030; 4. 吉林大学白求恩医学部基础医学院免疫学系, 吉林 长春 130021)

[摘要] 核酸适配体是一类通过指数富集的配体系统进化 (SELEX) 技术获得的具有独特三维构象的小分子 RNA 或单链 DNA。核酸适配体能高亲和力和高特异性与靶点结合, 同时具有自身分子质量小、免疫原性低、热/化学稳定性高、靶标分子范围广等特点, 广泛应用于疾病诊断、治疗、生物传感器、生物标志物筛选、新药研发等领域。综述近年来核酸适配体在肿瘤诊断和治疗方面的应用, 并对核酸适配体的临床研究现状、市场前景及面临挑战和发展趋势作简要分析。

[关键词] 核酸适配体; 基于指数富集的配体系统进化; 肿瘤诊断; 肿瘤治疗

[中图分类号] R730.4; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094 (2016) 08-0583-13

Aptamer Technology and Its Applications in Tumor Diagnosis and Therapy

SUN Hongguang¹, ZHANG Jinsan¹, WU Jianbo², ZU Youli³, ZHU Xun⁴

(1. Center of Precision Medicine, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; 2. Central Laboratory, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; 3. Houston Methodist Hospital, Weill Medical College of Cornell University, Houston 77030, USA; 4. Department of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Jilin University, Jilin 130021, China)

[Abstract] Aptamers are a class of small-sized RNA or single-stranded DNA oligonucleotides with characteristic 3D structures that are developed by SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) technology. Functionally similar to antibodies, aptamers can recognize and bind to their cognate targets with high affinity and specificity. Moreover, aptamers have many unparalleled properties that are suitable for clinical applications and industrialization, such as smaller molecular weight, low immunogenicity, thermal stability, ease of conjugation or modification with different functional moieties, simple and low-cost chemical synthesis, and a wide range of potential biological targets. Currently, aptamer technology has been extensively used in various biomedical fields, including diagnostics, therapeutics, biosensors, biomarker screening, and drug discovery. In this article, the advances of aptamer technology and its applications in tumor diagnosis and therapy in the past few years were reviewed. Additionally, the clinical status, market prospect, current challenges and future directions of this rapidly advancing technology were briefly introduced.

[Key words] aptamer; SELEX; tumor diagnosis; tumor therapy

核酸是遗传信息的载体, 也是生物体内具有生物活性的重要功能分子, 其具有像蛋白质一样复杂的三级结构, 可进行配体结合、催化、基因表达调控等化学反应^[1]。因发现 RNA 分子具有催化功能, Sidney Altman 和 Thomas Cech 于 1989 年共同获得了诺贝尔化学奖。

但针对一个特定的靶点如何找到能与之结合的功能性核酸分子, 在当时仍是一项技术难题。1990 年, 两个里程碑式的概念——核酸适配体 (aptamer) 和基于指数富集的配体系统进化 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 技术被引入核酸研究领域 (Ellington 等, *Nature*, 1990 年; Tuerk 等, *Science*, 1990 年)。Gold 及其学生 Tuerk (*Science*, 1990 年) 利用大容量的随机核酸库及体外 PCR 扩增技术, 筛选到能特异结合噬菌体 T4 DNA 多聚酶的 RNA 分子, 并将这一技术命名为 SELEX。而 Szostak 和 Ellington (*Nature*, 1990 年) 利用类似的技术筛选到能

接受日期: 2016-06-24

* 通讯作者: 祖幼立, 博士, 教授;

研究方向: 肿瘤病理学, 转化医学;

Tel: 001-7134414460; E-mail: yzu@HoustonMethodist.org

** 通讯作者: 朱迅, 博士, 教授, 博士生导师;

研究方向: 免疫学;

Tel: 0431-85619476; E-mail: zxunzhux@vip.sohu.com

特异结合染料分子的 RNA 分子,并将这类功能性核酸分子命名为 aptamer。利用 SELEX 技术使核酸适配体的筛选效率大大提高,极大地拓展了核酸适配体在生物及医学领域的应用空间。本文就近年来核酸适配体在肿瘤诊断和治疗方面的应用作一综述,并对核酸适配体的临床研究现状、市场前景及面临挑战和发展趋势进行简要分析。

1 核酸适配体与 SELEX 技术

1.1 核酸适配体

核酸适配体是一类具有特定三维构象的小分子 RNA 或单链 DNA,其长度一般为 20~80 个碱基,相对分子质量(M_r)为 6 000~30 000。同抗原-抗体反应一样,核酸适配体以构象互补模式(shape complementarity)特异性识别靶点,并以高亲和力与之结合,解离常数(K_d)一般在皮摩尔至纳摩尔之间(见图 1)^[2]。基于该特异性、高亲和力与靶点结合的特点,核酸适配体可用作与抗体类似的激动剂、拮抗剂或分子靶向工具。另外,因具有小分子核酸的理化性质,核酸适配体在临床应用和生产方面具有诸多优势:无/低免疫原性、

快速的组织穿透力和细胞内化能力、可识别更广泛的靶点等,提升了核酸适配体的临床应用潜能;较高的热/化学稳定性、易于化学修饰或偶联不同的功能基团、简单且成本低廉的固相合成技术等,使核酸适配体的生产易于实现(见表 1)。此外,一些构象可变型核酸适配体(switchable aptamer)在与靶点结合和解离状态下其结构发生改变,可与药物直接结合形成靶向药物传递体系,也可作为靶向基团修饰到药物载体表面,从而实现药物的靶向传递,为提高药物的临床疗效提供了一种可行的方法^[3-4]。

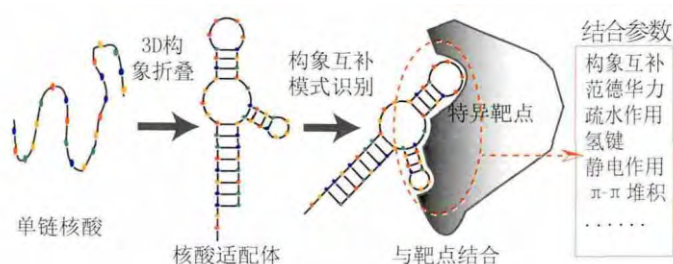


图 1 核酸适配体以构象互补模式与靶点形成复合体示意图

Figure 1 Schematic diagram of conformational recognition of target by aptamer to form an aptamer-target complex

表 1 核酸适配体与抗体的特性比较

Table 1 Comparison of characteristics between aptamers and antibodies

特性	核酸适配体	抗体
亲和力/特异性	高(K_d 在皮摩尔至纳摩尔)	高(K_d 在皮摩尔至纳摩尔)
M_r	小,约 6 000 ~ 30 000	大,约 150 000
免疫原性	无/低	高
组织穿透能力	快速,易被细胞内化	穿透和内化效率低
热/化学稳定性	高	不稳定,易发生不可逆变性
修饰难易程度	容易修饰或偶联功能基团	修饰困难
生产方式	固相合成技术	哺乳动物细胞系统
批间差异	批间差异小,产品均一性高	批间差异大
生产时间	数小时	数天至数月
生产成本	低	高
可识别靶点	广泛,可识别离子、多肽、小分子化合物、蛋白质、核酸、病毒、细菌、细胞和组织等	仅识别具有免疫原性的靶点

然而,作为小分子核酸,核酸适配体的某些理化性质,如易被核酸酶降解、分子量小易被肾脏过滤清除等,也使其临床应用受到一定限制。为提高核酸适配体的核酸酶抗性,两种有效策略目前被广泛采用:对 RNA 核酸适配体进行化学修饰,如用 2'-氟、2'-氨基、或 2'-O-甲氧基替代 RNA 分子上的 2'-OH 基^[5](又见 Proske 等,

Chembiochem, 2002 年;Ruckman 等, *J Biol Chem*, 1998 年),和/或用硼磷酸酯或硫代磷酸酯修饰磷酸二酯键等^[6-7]、3'端加帽^[8]、锁核酸(locked nucleic acids, LNAs)技术^[9]、镜像构象的核酸适配体(Spiegelmers[®], NOXXON Pharm 公司)(Eulberg 等, *Chembiochem*, 2003 年)等;筛选生物稳定性更高的 DNA 核酸适配体。

由于 DNA 分子缺乏 2'-OH 基而不易受 2'-核酸酶攻击, 具有更高的核酸酶抗性。同时, 多数 DNA 核酸适配体具有富鸟嘌呤的四链结构 (G-rich quadruplex), 该四链结构 DNA 分子能显著抵抗核酸酶水解 (Dapić 等, *Nucleic Acids Res*, 2003 年)。AS1411 (Antisoma Research 公司开发) 就是其中一种研究和应用较多的 DNA 核酸适配体, 可特异性与核仁素 (nucleolin, 在肿瘤细胞膜异常表达的核蛋白) 结合从而抑制肿瘤的生长、增殖, 其对急性髓系白血病和肾细胞癌的临床治疗评价正在进行中。作为未经修饰的 DNA 核酸适配体, AS1411 特殊的富鸟嘌呤四链结构使其具有极高的核酸酶抗性, 在含血清培养基中保持其稳定性可达 5 d^[10]。

与大分子生物相容性材料偶联是解决核酸适配体易被肾脏过滤清除的有效手段。聚乙二醇 (PEG) 是目前常用于药物修饰的具有良好生物相容性的大分子材料, 也被广泛应用于核酸适配体的修饰。哌加他尼钠 (pegaptanib sodium, 商品名 Macugen, Pfizer/Eyetech 公司) 为选择性血管内皮生长因子 (VEGF₁₆₅) 抑制剂, 于 2004 年被美国 FDA 批准用于治疗湿性年龄相关的黄斑变性, 也是目前唯一上市的核酸适配体药物。未经修饰的 VEGF₁₆₅ 核酸适配体是一种具有 27 个碱基的 RNA 分子, 其在血液中的半衰期仅为数分钟, 经过 2'-氟、2'-O-甲氧基、3' 端加帽、与

PEG ($M_r = 40\ 000$) 分子偶联等修饰后, 哌加他尼钠 (玻璃体内注射) 在体内的半衰期延长至 10 d^[8, 11]。

1.2 SELEX 技术

影响核酸适配体与靶点结合的参数复杂多样 (见图 1), 故利用生物信息学和分子模拟的方法获得核酸适配体不易实现。目前 SELEX 技术仍是获得核酸适配体的“金标准”。SELEX 技术包含以下几个重复步骤 (见图 2): 设计并合成一个含约 $10^{14} \sim 10^{15}$ 个随机序列的核酸库 (initial oligonucleotide pool), 每个随机序列由两端已知的引物区和中间随机区 (通常 30~50 个碱基) 组成;

将随机核酸库与目标生物靶点孵育 (incubation), 形成核酸适配体-靶点复合物; 将与靶点结合的核酸适配体与其他核酸分子通过合适的方法分离 (partitioning);

将与靶点结合的核酸适配体通过 PCR 或 RT-PCR 扩增 (amplification), 形成一个富集的次级核酸库 (enriched sub-pool), 将其与靶点重新孵育, 进行下一轮筛选;

经过约 8~20 轮筛选, 当富集程度达到饱和后, 对富集的核酸库进行测序分析 (sequencing), 鉴定特异性核酸适配体序列。通常情况下, 为消除非特异核酸分子与靶点的结合, 在 SELEX 过程中引入几轮负向筛选 (counter-selection), 将会显著提高筛选效率和成功率^[2-3]。

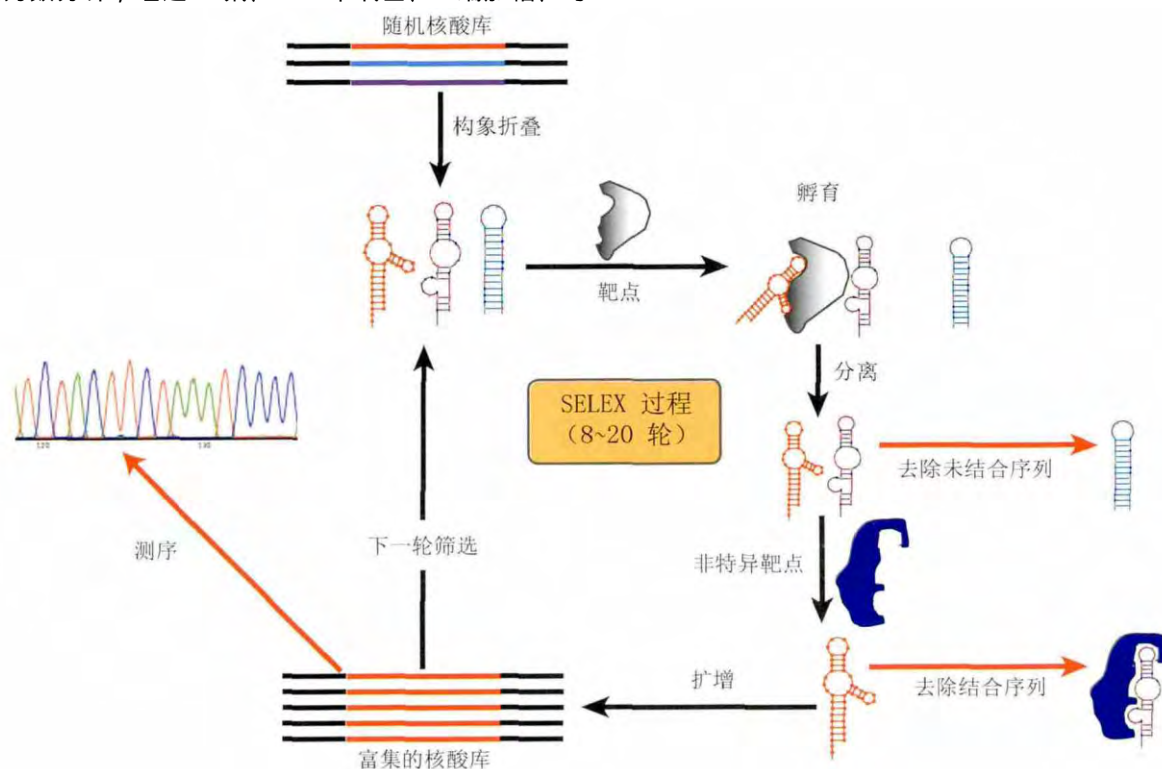


图 2 SELEX 过程示意图

Figure 2 Schematic diagram of the SELEX process

为提高 SELEX 的成功率、缩短筛选周期、赋予核酸适配体特定功能,目前已有数十种改进的 SELEX 技术被建立^[12],并成功筛选到近千个具有应用价值的核酸适配体,靶点范围涵盖离子、多肽、小分子化合物、蛋白质、核酸、病毒、细菌、细胞和组织等,已被广泛应用于基础研究、疾病诊断和靶向治疗、纳米技术、食品安全和环境监测等领域^[2-4]。

2 核酸适配体在肿瘤诊断中的应用

癌症是全球第二大致死病因^[13-14]。高灵敏度、高特异性的肿瘤诊断技术具有积极的临床意义,可帮助医生尽早提出治疗方案、对治疗效果进行评估、监控肿瘤的复发和转移及预后评估等。目前,抗体被广泛应用于肿瘤的临床诊断,如流式分析、肿瘤标志物检测、免疫组化、体内显像等^[15]。但抗体由于具有高免疫原性、稳定性差、化学修饰困难、生产方法有限及生产成本昂贵等缺点,在一定程度上限制了其临床应用。由于同样具有高亲和力、高特异性与靶点结合的能力,且在化学修饰、稳定性和生产成本上更具明显优势,核酸适配体正取代或补充抗体技术的上述不足,已被广泛应用于肿瘤诊断的各个领域,如循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)检测、免疫组化分析和体内成像等。

2.1 用于血液 CTC 检测

目前非侵入性液体活检(liquid biopsy)技术正飞速发展。在肿瘤发生、发展的各个阶段,由肿瘤细胞产生或分泌到血液系统中的一些特异性肿瘤标志物如 CTC,是液体活检的良好靶标^[16]。近年来,结合或偶联不同信号报告技术如荧光法、比色法、磁性技术、电化学技术等,一系列基于核酸适配体的分析方法被应用于 CTC 检测。

荧光法是最常用的 CTC 检测方法之一。将荧光分子与核酸适配体通过化学偶联制得一种简单且灵敏的 CTC 检测探针(见图 3a)。为验证核酸适配体荧光探针应用于 CTC 检测的可行性,Zu 领衔的课题组制备了 CD30 核酸适配体偶联 Cy5 荧光探针,并以 CD30 抗体偶联异硫氰酸荧光素(FITC)作为对照探针,用流式细胞术比较了两种探针的灵敏度和特异性。结果显示,CD30 核酸适配体荧光探针对于 CD30 阳性淋巴瘤 CTC 的检出率与 CD30 抗体荧光探针完全一致,但其分析成本远低于 CD30 抗体荧光探针^[17]。

但上述持续发光(signal always-ON)的核酸适配体(或抗体)荧光探针在分析过程中会造成非特异背景干扰。

为了弥补该技术缺陷,Zu 领衔的课题组又建立了一种肿瘤细胞主动激活(signal turn-ON)的核酸适配体荧光报告系统(见图 3b),其技术原理为:核酸适配体的 5' 和 3' 端分别偶联荧光分子和配对的淬灭分子(quencher),在没有特异性 CTC 存在时,荧光分子和淬灭分子因空间距离近,荧光信号通过荧光共振能量转移(fluorescent resonance energy transfer, FRET)被淬灭分子吸收,而不发光(signal-OFF);当遇到特异的 CTC 时,核酸适配体识别并结合 CTC 细胞膜表面的特异靶点,通过受体介导的内化途径进入细胞溶酶体内,在富核酸酶的环境中,核酸适配体被迅速降解,使荧光分子和淬灭分子远离,发出强烈的荧光信号(signal-ON)。例如 Cy3 荧光分子和配对的淬灭分子 BHQ2(black hole quencher 2)分别被偶联在 CD30 核酸适配体的 5' 和 3' 端,在对淋巴瘤细胞系及患者血液样本进行的 CTC 分析中,该荧光报告系统仅在 CD30 阳性细胞中特异发光,而在 CD30 阴性细胞中不发光,且无背景干扰;荧光信号 10 min 即被激活,并稳定存在 120 min 以上,其灵敏度可在 10 000 个非特异细胞中检出一个 CTC^[18]。基于这种细胞激活的核酸适配体荧光系统,可实现在全血样本中对 CTC 进行一步法、高通量、快速检测。

鉴于信号激活的工作模式具有更高的特异性,Zhao 等^[19]利用构象可变型核酸适配体构建了一种靶点激活的荧光报告系统(见图 3c)。在该模型中,3 种不同靶点(MUC1、HER2、雌激素受体)的核酸适配体被分别偶联不同的荧光分子和配对的淬灭分子。在没有特异 CTC 时,由于 FRET 效应,荧光分子处于淬灭状态;当特异 CTC 存在时,核酸适配体发生构象改变并与其靶点结合,使得荧光分子远离淬灭分子而发出强烈的荧光信号。由于该系统可同时检测 3 种肿瘤标志物,具有更高的特异性和灵敏度,检测限值可达 10 个细胞/mL,线性范围为 $10 \sim 10^6$ 个细胞/mL。

比色法和磁性分离技术也常用于 CTC 检测。最近,Wang 等^[20]建立了一种双 aptamer 靶向的高灵敏度 CTC 检测平台,即将 VEGF 核酸适配体与磁珠偶联,用于捕获和浓缩 CTC,继而用 MUC1 核酸适配体偶联的 Pt-Au 纳米颗粒与浓缩的 CTC 孵育,在 TMB(3',3',5',5'-tetramethylbenzidine)和双氧水(H_2O_2)存在条件下,Pt-Au 纳米颗粒迅速催化比色反应,发出灵敏信号。该系统的检测限值可达 10 个细胞/mL,线性范围为 $10 \sim 10^5$ 个细胞/mL。

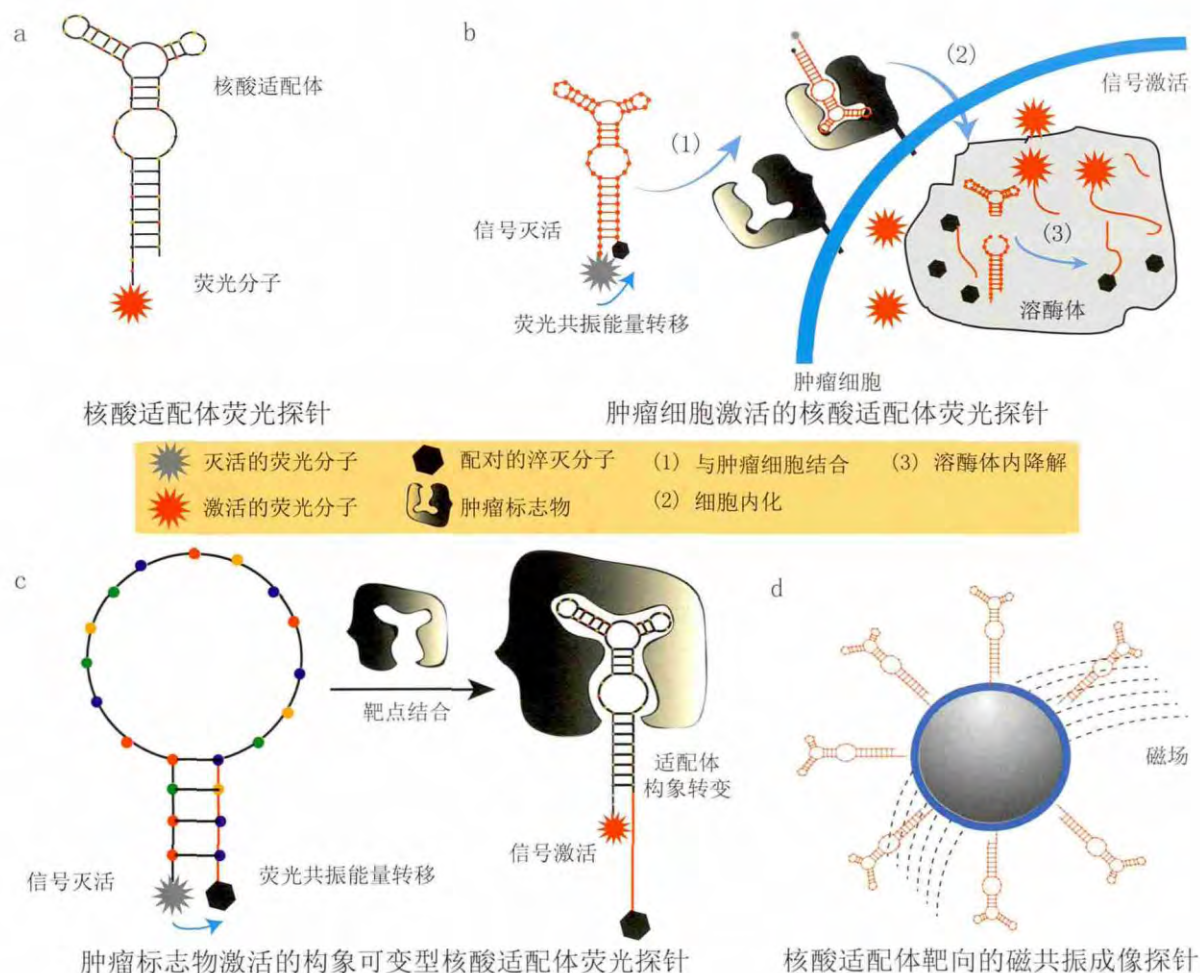


图3 用于肿瘤诊断的核酸适配体探针模型

Figure 3 Schematic diagram of aptamer-targeted imaging probes for tumor diagnosis

电化学技术因具有操作简单、灵敏度高和稳定性好等特点,也常用于CTC检测。最近,Kashefi-Kheyrabadi等^[21]建立了一种核酸适配体结合电化学技术用于肝癌CTC检测的方法,即将肝癌HepG2细胞特异性核酸适配体偶联于金平面电极上,当HepG2细胞被捕获后,还原电极和金平面电极之间的界面电子转移电阻(interfacial electron-transfer resistance)将会增加并与细胞数量成正比,通过测量电阻的灵敏度变化可精确计算出CTC数量。该方法的检测限值可达2个细胞/mL,线性范围为 $10^2 \sim 10^6$ 个细胞/mL。

除上述检测方法外,基于核酸适配体的化学发光法^[22]、电化学发光法^[23]、光电化学法^[24]等技术也广泛应用于CTC检测,具有较高的灵敏度和特异性。除检测CTC外,捕获并分离CTC还具有重要的临床意义,如用于药敏分析、基因突变和靶点分析、肿瘤耐药机制及生物学行为研究等,是目前个体化治疗、精准医学领域的重要研究方向。一系列以核酸适配体为基础的CTC捕获和分离技术已广泛建立,可高效获得高纯度的CTC^[25-26]。

2.2 用于免疫组化分析

近年来,核酸适配体被广泛用于肿瘤组织的免疫组化分析,并表现出一些优于抗体的应用特性。Zu领衔的课题组在对福尔马林固定-石蜡包埋的淋巴瘤样本进行免疫组化分析时发现,CD30核酸适配体表现出与CD30抗体几乎一致的染色模式,但其反应条件更简单,如抗原修复(antigen retrieval)温度仅为37℃(CD30抗体为95℃)、孵育时间仅为20 min(CD30抗体为90 min)。提示,这可能与小分子核酸适配体具有更高的组织穿透效率,可快速与组织标本中特异靶点结合有关。此外,不同于抗体,核酸适配体应用于免疫组化时不会对组织样本的坏死区造成非特异染色^[27]。

肿瘤原发灶附近的淋巴结通常是肿瘤转移过程中最先浸润的组织,因此对可疑淋巴结进行免疫组化分析可有效监控肿瘤的转移。然而,在肿瘤转移的早期阶段,特异肿瘤标志物信息较难获得,故用特异性抗体进行免疫组化分析较难实现。基于SELEX法可在肿瘤标志物信息预先未

知的情况下,筛选到特异性核酸适配体^[28-29]。利用该技术优势,Yang 领衔的课题组筛选到一组可特异识别结肠癌转移淋巴结组织的核酸适配体,即用核酸适配体作为探针,对不同来源的肿瘤组织样本进行免疫组化分析发现,核酸适配体可特异识别淋巴结转移的结肠癌组织和结肠癌转移的淋巴结组织,但在无转移的结肠癌组织样本或其他对照组织中无报告信号,提示该核酸适配体识别的靶点与结肠癌转移过程相关,可作为结肠癌转移淋巴结的早期诊断工具^[30]。

2.3 用于体内成像

用于肿瘤诊断的体内成像技术包括发光成像、计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)、基于放射性核素的正电子发射断层扫描(PET)和单光子发射计算机断层扫描(SPECT)等。联合特异性抗体作分子探针,可提高成像技术的灵敏度和特异性,目前至少有12个放射性核素标记的抗体被批准用于肿瘤体内SPECT成像。但由于高免疫原性和长达数天以上的循环半衰期而造成的不良反应,使抗体体内成像应用受到极大的限制,事实上一些相关产品已退出市场^[31]。核酸适配体因具有快速的组织穿透力、可迅速在肿瘤位点富集、无免疫原性、较短的循环半衰期及更高的安全性等,在肿瘤体内成像应用中更具优势。

核酸适配体偶联荧光分子模型除用于体外CTC检测外,也可用于体内发光成像,如IRD800CW标记的CD30核酸适配体用于淋巴瘤体内成像^[32]、Cy5标记的胰腺癌特异性核酸适配体用于胰腺癌体内成像^[33]、Cy3标记的AS1411核酸适配体与血脑屏障靶向肽偶联用于脑胶质瘤体内成像^[34]等,均显现出快速而特异的肿瘤靶向能力、高信噪比和良好的药代动力学特性等。然而,普通的荧光分子在体内稳定性较差,易发生光漂白(photobleaching)现象,近年来一些发光纳米材料如量子点(quantum dots)等,表现出更高的光稳定性而被广泛关注。但量子点具有一定的细胞毒性,利用核酸适配体与量子点偶联,可提高量子点的生物相容性,并降低细胞毒性。最近,Zhang等^[35]将MUC1核酸适配体与Zn²⁺包被的CdTe量子点偶联,应用于乳腺癌的体内成像,结果显示,核酸适配体偶联的量子点的细胞毒性降低、生物相容性明显提高、肿瘤靶向显像能力的特异性更好。

由于具有较高的时空分辨率、组织对比度和信号穿透能力等特点,基于磁性纳米材料的MRI是目前最常用的肿瘤诊断手段之一。然而,磁性纳米材料的水溶性较差使其生物相容性降低,故将核酸适配体与磁性纳米材料偶联,

不仅可提高肿瘤诊断的特异性,还可增加磁性纳米材料的生物相容性。近年来,一系列核酸适配体偶联的磁性纳米材料被应用于肿瘤MRI成像(见图3d),如血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)核酸适配体偶联磁性纳米晶体应用于胶质瘤MRI成像^[36]、表皮黏附分子(EpCAM)核酸适配体偶联磁性纳米晶体应用于胃癌MRI成像^[37]等,均明显提高了肿瘤靶向成像能力、灵敏度和生物相容性,且降低了细胞毒性,进一步提升了MRI的临床应用潜能。

由于具有极高的灵敏度,基于放射性核素的PET和SPECT成像技术广泛应用于临床。为提高肿瘤靶向成像能力,放射性核素标记的核酸适配体也被广泛应用于肿瘤PET和SPECT成像,如^{99m}Tc标记HER2核酸适配体应用于卵巢癌的SPECT成像^[38]、¹⁸F或⁶⁴Cu标记tenascin-C(一种广谱肿瘤标志物)核酸适配体应用于tenascin-C阳性肿瘤PET成像^[39]等,利用其特异性肿瘤靶向和富集能力及快速的血液清除能力等特点,可进一步提高PET和SPECT肿瘤诊断的特异性和灵敏度。

上述成像技术虽各具优势,但也有一些自身的缺点,如荧光信号组织穿透能力差只能用于浅表肿瘤诊断、MRI缺乏足够的灵敏度、PET空间分辨率较低等,将两种及以上不同成像技术组合可有效弥补各自缺点。最近,Tan领衔的课题组建立了一种核酸适配体靶向、靶点激活的双功能荧光/MRI成像技术,即荧光分子Cy5与蛋白酪氨酸激酶7(PTK7)核酸适配体偶联,再通过 π - π 堆积(π - π stacking)作用结合在MnO₂纳米片(nanosheet)上,因FRET效应,Cy5的荧光信号被MnO₂纳米片淬灭;当遇到特异肿瘤细胞时,PTK7核酸适配体与靶点结合,使Cy5远离MnO₂纳米片而发出荧光信号,可实现荧光成像;当MnO₂纳米片被肿瘤细胞内化,在谷胱甘肽(GST)作用下,MnO₂纳米片被还原成Mn²⁺,可用于MRI成像^[40],这种多功能组合式成像技术为肿瘤诊断技术的开发与应用提供了新思路。

3 核酸适配体在肿瘤治疗中的应用

由于缺乏肿瘤靶向能力,传统的化学治疗、放射治疗等方法的抗肿瘤效果并不理想。基于肿瘤特异性的抗体靶向治疗,如治疗性抗体、抗体偶联药物(antibody-drug conjugates, ADC)以及目前被广泛关注的嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy, CAR-T)和免疫检查点疗法等,使治疗效果显著提升,且产生了(或可预期将会产生)多个相

关“重磅炸弹”药物。近年来,核酸适配体基于自身在临床应用和生产上的诸多优势,也被广泛应用于肿瘤治疗的各个领域,如治疗性核酸适配体、核酸适配体偶联药物 (aptamer-drug conjugates, AptDC)、核酸适配体靶向的纳米药物、核酸适配体介导的免疫治疗等。

3.1 治疗性核酸适配体

在肿瘤治疗领域,核酸适配体 AS1411 (Antisoma Research 公司开发) 和 olaptased pegol (又称 NOX-A12, NOXXON Pharm 公司开发) 目前处于 期临床研究阶段。AS1411 并非由 SELEX 方法筛选获得,而是在研究富鸟嘌呤四链结构核酸的生物学功能时“意外”发现其具有抑制肿瘤细胞增殖的作用。在对 60 种肿瘤细胞系 (涵盖 14 种肿瘤类型) 进行体外评价时发现, AS1411 (当时称为 GRO29A 或 AGRO100, Aptamera 公司开发) 对所有肿瘤细胞的增殖具有不同程度的抑制作用,而对正常细胞几乎无影响。进一步研究发现, AS1411 并不是通过反义效应 (anti-sense effect) 而是通过配体结合作用 (aptameric effect) 实现对肿瘤增殖的抑制作用,并确定其作用靶点为核仁素^[10]。基于令人振奋的临床前数据, Aptamera 公司开展了一项由 17 个不同肿瘤类型患者参与的 期临床研究,结果显示, AS1411 未引起任何严重不良反应,且在不同肿瘤类型中均有一定比例的患者在 AS1411 治疗中受益,尤其是对转移性肾细胞癌所有入组患者均有一定治疗效果^[10,41]。由此, Antisoma Research 公司获得 AS1411 的继续开发权,并随后开展了其用于转移性肾细胞癌和急性髓系白血病治疗的 期临床研究。但其近期公布的有关转移性肾细胞癌治疗的 期临床数据并不理想, 35 例患者中仅有 1 例表现出明显的治疗反应。作为一个靶向核仁素的治疗药物,治疗前未对核仁素在患者肿瘤组织中的表达情况进行鉴别而不加选择的招募实验对象可能是此次临床试验效果不佳的主要原因之一^[41]。

Olaptased pegol (Spiegelmers®, 由非天然的 L-核苷酸组成) 是 NOXXON Pharma 公司开发的一种具有高核酸酶抗性的镜像结构核酸适配体,其可通过特异性抑制基质细胞衍生因子 1 (stromal cell derived factor-1, SDF-1 或 CXCL12) 的生物学功能,促进骨髓微环境中肿瘤细胞向血液中移行,使其更易被血液中化疗药物杀伤,从而起化疗增敏作用。目前, olaptased pegol 正在进行两项平行 期临床评价,即联合苯达莫司汀和利妥昔单抗用于复发或难治性慢性淋巴细胞白血病治疗,联合硼替佐米和地塞米松用于复发或难治性多发性骨髓瘤治疗。从目前透露的数

据看, olaptased pegol 对化疗药物的增敏效果令人满意^[42]。

相比于上述单价核酸适配体,多价核酸适配体因可进一步提高与靶点的亲和力、使受体多聚化而激活下游信号等,表现出更强的抗肿瘤活性。最近, Mahlknecht 等^[43]筛选到一个 HER2 核酸适配体,并构建了其三价结构,结果表明,该三价 HER2 核酸适配体的抗肿瘤活性比 HER2 抗体高 2 倍。Parekh 等^[44]的研究结果也表明,三价 CD30 核酸适配体具有更强的抗肿瘤增殖能力。

3.2 核酸适配体偶联药物

鉴于 ADC 在肿瘤靶向治疗中的成功应用,近年来一系列 AptDC 模型也被成功建立,并正在进行广泛的临床前评价。与小分子药物共价偶联是最常见的 AptDC 制备方式 (见图 4a),如 CD117 核酸适配体共价偶联甲氨蝶呤用于急性髓系淋巴瘤治疗^[45]、蛋白酪氨酸激酶 7 (PTK7) 核酸适配体通过酸敏感 linker 共价偶联多柔比星用于淋巴细胞白血病治疗^[46]等,在体内外研究中均表现出肿瘤靶向能力的特异性好、药物释放效率高、脱靶效应显著降低和治疗效果明显提高等。除共价偶联外,对于一些在三维结构中含有并列配对 GC/CG 序列的核酸适配体,蒽环类抗肿瘤药物 (如多柔比星) 可通过非共价结合的方式掺入到核酸适配体的 GC/CG 结构中 (见图 4b),形成一种简单、有效的 AptDC 模型,如表皮黏附分子 (EpCAM) 核酸适配体偶联多柔比星治疗视网膜母细胞瘤^[47]、HER2 核酸适配体偶联多柔比星治疗乳腺癌^[48]等。

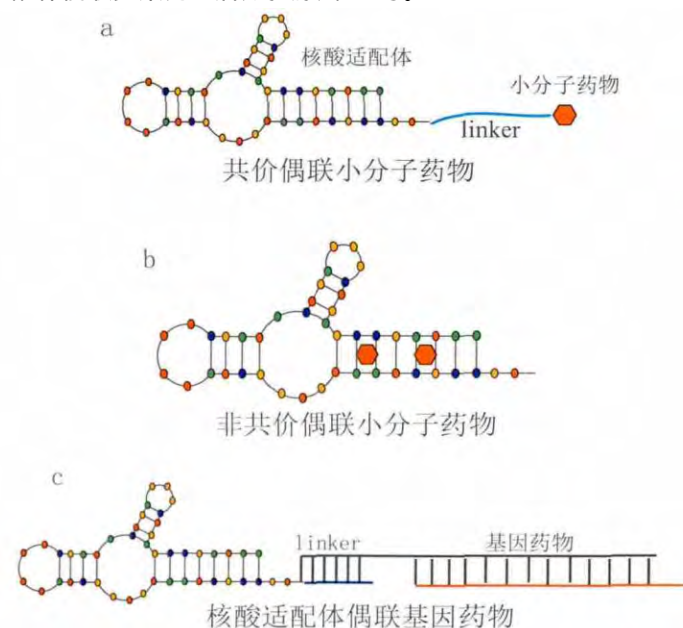


图 4 核酸适配体偶联药物模型

Figure 4 Schematic diagram of aptamer-drug conjugates (AptDC)

由于核酸适配体结构简单,适合萘环类药物掺入的位点较少,故其载药量较低。为进一步提高载药量,Zu 领衔的课题组将 CD38 核酸适配体的末端引入一段 GC/CG 重复序列的多核苷酸链,作为多柔比星的掺入位点,该模型可同时携带 5 个多柔比星分子;载药量的提高也使其抗肿瘤活性明显增强,在化疗抗性的多发性骨髓瘤动物模型中,CD38 AptDC 可逆转肿瘤细胞的化疗抗性,明显延长荷瘤小鼠的生存期^[49]。最近,Tan 领衔的课题组构建了一个被称为“纳米火车”(nanotrains)的 AptDC 模型,可同时携带 50 个多柔比星分子。该模型中的 PTK7 核酸适配体作为分子靶向工具的“火车头”,并在其 5' 端引入一段“激发”探针,两段可互补杂交的、含 GC/CG 重复序列的多核苷酸链在遇到“激发”探针后,可自组装成互补的长片段作为装载多柔比星的“车厢”。在体内外肿瘤模型中,该“纳米火车”可显著杀伤肿瘤细胞^[50]。

由于可进一步提高亲和力、内化效率和载药量,多价 AptDC 模型也被广泛建立,如两价前列腺癌特异性膜抗原(PSMA)核酸适配体偶联多柔比星用于前列腺癌的治疗^[51]、基于滚环扩增技术(rolling circle amplification, RCA)的多价 PTK7 核酸适配体偶联多柔比星用于淋巴细胞白血病的治疗^[52]等,进一步扩展了 AptDC 的临床应用潜能。

siRNA 和 microRNA 等基因药物也具有重要的临床应用价值。但由于缺乏肿瘤组织/细胞靶向性、不能有效进入细胞(需要转染试剂)等问题,极大降低了其临床应用的可行性。与核酸适配体偶联可赋予基因药物许多应用优势,如使其具有肿瘤靶向能力、通过受体介导的内化途径可提高其进入细胞的效率等。近年来已有许多核酸适配体偶联基因药物模型(见图 4c)被建立,且广泛的临床前评价证实了其用于肿瘤治疗的可行性,如 PSMA 核酸适配体偶联 *Plk1* 或 *Bcl2* siRNA 用于前列腺癌治疗^[53]、HER2 核酸适配体偶联 *Bcl2* siRNA 联合顺铂用于乳腺癌治疗^[54]、MUC1 核酸适配体偶联 microRNA-29b 用于卵巢癌治疗^[55]等。

3.3 核酸适配体靶向的纳米药物

纳米药物因渗透性增强和滞留效应(enhanced permeability and retention, EPR)使其在肿瘤组织富集,从而提高治疗效果,但这种通过 EPR 效应提高药物富集的方式仍然是“被动”靶向模式,易受如新生血管的结构差异、血压、肿瘤的病理类型和位置等因素的影响,造成其疗效存在明显的个体差异^[56]。因此,利用核酸适配体构建“主动”靶向的纳米药物是提高其疗效的有效策略。近

年来,基于不同无机或有机纳米材料,如纳米金、多孔硅、单壁碳纳米管、量子点、磁性纳米材料、脂质体、共聚物、蛋白或核酸纳米材料等,一系列核酸适配体靶向的纳米药物模型被成功构建^[4]。通常情况下,核酸适配体和高分子纳米材料偶联具有以下应用优势:可提高纳米药物的肿瘤靶向能力;显著提高载药量;通过改变药物内化方式而提高内化效率,甚至逆转肿瘤的化疗抗性;纳米材料可提高核酸适配体的生物稳定性;由于多价效应(每个纳米颗粒表面可携带多个核酸适配体分子)进一步提高核酸适配体的亲和力;核酸适配体可提高尤其是无机纳米材料的生物相容性等^[4,57]。

除作为纳米药物的靶向工具外,一些基于核酸适配体自身特性而建立的治疗模型也具有较好的临床应用价值,如具有 GC/CG 重复序列的核酸适配体偶联纳米材料可用于两种不同亲/疏水质性化疗药物的共投递(co-delivery)。对于一些难治性或化疗抗性的肿瘤,两种(或以上)药物联合治疗通常可提高治疗效果,但在一个药物投递系统中同时携带两种不同亲/疏水质性的药物存在技术障碍。Zhang 等^[58]建立了一种核酸适配体靶向的纳米药物共投递系统,该系统含 GC/CG 重复序列的 PSMA 核酸适配体用于装配亲水性药物多柔比星,而聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)用于包裹疏水性药物多西紫杉醇;待药物分别装配完成后,再将核酸适配体和 PLGA 纳米颗粒通过 PEG 分子偶联;在体外细胞模型中,该药物共投递系统可特异靶向 PSMA 表达阳性的前列腺癌细胞,并表现出比单一药物明显提高的肿瘤杀伤活性。最近,Huang 等^[59]利用 PTK7 核酸适配体作为靶向分子,PEG-PLGA 共聚物作为药物载体,也构建了一个类似的药物共投递系统,其可同时携带亲水性多柔比星和疏水性紫杉醇两种药物,用于淋巴细胞白血病的靶向协同治疗。

如前所述,构象可变型核酸适配体可用于构建高灵敏度、低背景干扰、靶点激活的肿瘤诊断系统,也常被用于构建可精确控制、靶点激活的药物投递系统。最近,Tan 领衔的课题组利用构象可变型 PTK7 核酸适配体偶联金纳米棒(nanorods),并联合 Ce6 光敏剂,建立了一种光热和光动力联合治疗模型,在该模型中 PTK7 核酸适配体先通过金-硫键与金纳米棒结合,再将偶联 Ce6 分子的多核苷酸链与 PTK7 核酸适配体通过序列互补杂交。在没有特异肿瘤细胞时,由于金纳米棒的荧光淬灭效应,Ce6 分子没有光毒性;当遇到特异肿瘤细胞后,PTK7 核酸适配体构象改变并与 PTK7 结合,促使偶联 Ce6 分子的多核苷酸链远离金纳米棒,

在近红外光照射下, Ce6 激发单线态氧 (singlet oxygen) 产生而杀伤肿瘤细胞。同时, 金纳米棒吸收近红外光而产热, 进一步杀伤附近的肿瘤细胞。这种光热和光动力联合治疗模式可显著提高对肿瘤的特异杀伤能力^[60]。

近年来, 一个创新的医学概念——诊断治疗学 (theranostics) 被引入个体化、精准医疗领域。由于可同时进行实时诊断和实时治疗, 故以诊断治疗为目的的核酸适配体靶向纳米药物在肿瘤治疗领域引起关注。Shi 等^[61]构建了一个核酸适配体靶向的、兼有荧光显像和光热治疗作用的纳米药物模型。在该模型中, 构象可变型肺癌 A549 细胞特异性核酸适配体先与标记荧光分子的多核苷酸链通过序列互补杂交, 再将其与 Au@Ag/Au 杂合纳米颗粒偶联, 由于 FRET 效应, 荧光分子被 Au@Ag/Au 纳米颗粒淬灭而不发光; 当遇到特异肺癌细胞时, 核酸适配体发生构象改变与肺癌细胞结合, 标记荧光分子的多核苷酸链远离 Au@Ag/Au 纳米颗粒而发出明亮的荧光信号, 在荧光信号指引下, 用近红外光激发 Au@Ag/Au 纳米颗粒产热, 而精确杀伤肿瘤组织。这种基于实时影像指导的实时治疗模式为实现肿瘤个体化精准治疗提供了新思路。

3.4 核酸适配体介导的免疫治疗

免疫检查点和 CAR-T 细胞治疗是近年来肿瘤免疫治疗领域最引人关注的研究热点。核酸适配体用于肿瘤免疫治疗的可行性目前也被广泛研究。最近, Prodeus 等^[62]筛选到一个鼠源性 PD-1 (程序性死亡蛋白 1) 核酸适配体, 其可特异性阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合, 从而逆转肿瘤的免疫抑制状态, 激活抗肿瘤免疫。在 PD-1 阳性的结肠癌荷瘤模型中, PD-1 核酸适配体可显著抑制肿瘤的生长, 治疗效果与 PD-1 抗体相似。在另一项研究中, Herrmann 等^[63]利用 CTLA-4 (细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4) 核酸适配体偶联基因药物 STAT3 siRNA, 建立了一种创新的免疫检查点基因治疗方法。研究结果表明, 其构建的 CTLA-4

核酸适配体-STAT3 siRNA 偶联药物可特异杀伤荷瘤小鼠循环系统与肿瘤位点的调节性 T 细胞 (Treg) 和肿瘤细胞, 逆转肿瘤免疫抑制状态, 激活抗肿瘤免疫, 明显抑制肿瘤的生长和转移, 该研究为免疫检查点抑制疗法提供了一个新思路。

近年来, 一些探索性的核酸适配体介导的细胞免疫治疗模型也被建立, 如 Boltz 等^[64]将 c-MET (肝细胞生长因子受体) 核酸适配体与 CD16 核酸适配体偶联, 构建了一个双特异性核酸适配体, 其可将表达 CD16 分子的 NK 细胞招募至表达 c-MET 的肿瘤细胞附近, 从而增强对肿瘤细胞的杀伤效率。Tan 领衔的课题组也构建了一个核酸适配体靶向的 NK 细胞治疗模型, 该模型中一个亲脂性 diacyllipid 链通过 PEG 分子偶联在白血病 K562 细胞特异性核酸适配体的末端, 核酸适配体可通过 diacyllipid 链插入到体外分离的 NK 细胞膜上, 这种装配有核酸适配体的 NK 细胞可快速、特异性招募并杀伤 K562 细胞^[65]。

4 临床研究现状和市场前景

自 1990 年 SELEX 技术被建立后, Gold 及其同事们即意识到该技术的商业价值, 并于 1991 年申报了 SELEX 技术的发明专利。随后, 他们又申请了超过 140 项相关专利用于保护 SELEX 技术的商业应用, 只有获得专利授权的公司才可利用 SELEX 技术筛选核酸适配体进行商业化开发, 如 Archemix 公司获得了开发治疗性产品的专利授权、SomaLogic 公司获得了开发诊断性产品的专利授权、NOXXON Pharm 公司获得了开发 Spiegelmer 产品的专利授权等。由于 SELEX 技术的专利限制, 一定程度上影响了核酸适配体产品商业化进程, 目前为止仅有一个核酸适配体产品上市, 10 个分别用于黄斑变性、肿瘤、抗凝血、炎症相关疾病治疗的核酸适配体产品正处于临床研究阶段 (见表 2)。

表 2 治疗性核酸适配体产品临床研究现状

Table 2 Therapeutic aptamers under clinical trials

产品名称	靶点	开发公司	适应证	临床研究状态	临床研究注册号
ARC1779	血管性血友病因子 (vWF)	Archemix Corp	vWF 相关的小血小板功能异常	期临床 (完成)	NCT00632242
ARC1905 (Zimura)	补体因子 C5	Ophthotech Corp	干性年龄相关的黄斑变性	期临床 (进行中)	NCT02686658
ARC19499	组织因子途径抑制物 (TFPI)	Baxalta US Inc.	血友病	期临床 (终止)	NCT01191372
AS1411	核仁素 (nucleolin)	Antisoma Research	转移性肾细胞癌	期临床 (完成)	NCT00740441
			急性髓系白血病	期临床 (完成)	NCT00512083
E10030 (Fovista)	血小板源性生成因子 (PDGF-BB)	Ophthotech Corp	年龄相关的黄斑变性	期临床 (进行中)	NCT01940887

续表 2

产品名称	靶点	开发公司	适应证	临床研究状态	临床研究注册号
NOX-A12 (olaptesed pegol)	基质细胞衍生因子 1 (SDF-1)	NOXXON Pharma	慢性淋巴细胞白血病	期临床(启动)	NCT01486797
			多发性骨髓瘤	期临床(完成)	NCT01521533
NOX-E36 (erapticap pegol)	单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)	NOXXON Pharma	2 型糖尿病;蛋白尿	期临床(完成)	NCT01547897
NOX-H94(lexaptetid pegol)	铁调节蛋白 (hepcidin)	NOXXON Pharma	慢性病引起的贫血	期临床(完成)	NCT01691040
NU172	凝血酶	ARCA Biopharma	冠状动脉旁路移植术后抗凝血治疗	期临床(状态未知)	NCT00808964
REG1 (pegnivacogin)	凝血因子	Regado Biosciences, Inc.	经皮冠状动脉介入治疗术后抗凝血治疗	期临床(终止)	NCT01848106

哌加他尼钠的成功上市是核酸适配体药物开发领域的重要里程碑。然而,作为第一个用于黄斑变性治疗的药物,哌加他尼钠的市场之路并不平稳。在与随后上市的兰尼单抗(ranibizumab,商品名 Lucentis, Genentech/Novartis 公司开发)和阿柏西普(afibercept,商品名 Eylea, Bayer/Regeneron 公司开发)的市场竞争中,由于哌加他尼钠对病人视力的改善程度不如兰尼单抗和阿柏西普,目前已暂时退出销售市场。造成这种治疗效果存在差异的主要原因是:作为黄斑变性治疗靶点的 VEGF 家族有 6 个亚型,虽然抑制最主要的 VEGF₁₆₅ 亚型可显著改善黄斑变性引起的临床症状,但同时抑制其他亚型对视力的恢复也起一定作用,兰尼单抗和阿柏西普为泛 VEGF 抑制剂(pan-VEGF inhibitor),可抑制 VEGF 家族所有亚型,而哌加他尼钠只特异性地抑制最主要的 VEGF₁₆₅ 亚型。然而,最近在对兰尼单抗和阿柏西普的上市后临床监测中发现,这种泛 VEGF 抑制剂由于同时抑制了其他亚型的正常生物学功能,长期应用会引起血压、心脏功能异常等不良反应,提示哌加他尼钠在长期应用安全性上要高于泛 VEGF 抑制剂^[66]。

尽管哌加他尼钠现已暂时退出市场,但它的成功上市、甚至退市的原因均为后续核酸适配体产品的开发提供了重要的参考依据,如基于疾病发生机制的靶点选择、为提高生物稳定性的化学修饰方法、安全性评价体系建立、临床试验方案及上市后临床监测等。随着 SELEX 技术专利过期及对核酸适配体技术的深入开发,近年来核酸适配体技术的基础研究和商业化开发呈爆发式增长。截至 2016 年 4 月,有近 6 000 篇(来源 PubMed 数据库)相关文献被发表,其中约 70% 的文献是近 5 年内发表。据 MarketResearch.com 在其《Nucleic Acid Aptamers for Diagnostics and Therapeutics: Global Markets》报告中预测分析,核酸适配体在包括治疗、诊断、生物传感器、药物筛选、生物标志物筛选和研究应用等领域的全球市场份额正

以 73.5% 的年复合增长率高速增长,将于 2019 年达 54 亿美元。

5 面临的挑战和展望

尽管具有良好的临床转化潜能,核酸适配体技术在从实验室到临床应用的道路上仍面临挑战:

(1)核酸适配体的一个明显缺点是生物稳定性较差,在体内半衰期短。为提高其生物稳定性,可采用如前所述的化学修饰方法。事实上,核酸适配体的化学修饰技术已非常成熟,经过一种或几种化学修饰后,核酸适配体的生物稳定性均能满足临床应用需要。然而,采用何种方法修饰核酸适配体既能提高其生物稳定性,又能兼顾临床应用安全性和生产成本,很难用统一的标准衡量。一些修饰方法可能会带来临床应用安全性的问题,如 PEG 修饰尽管是小分子药物修饰的最常见方法,但 PEG 修饰后的药物在一些临床应用中会引起少发但严重的过敏反应^[67]。提示,针对不同的核酸适配体及不同的应用条件,需对修饰方法进行个体化考量。

(2)尽管现有各种改进的 SELEX 方法可明显提高筛选成功率并有效缩短筛选周期,但 SELEX 筛选过程仍是一个“黑匣子”,即无法预测核酸适配体和靶点结合的具体表位,以及具体的生物学功能,需要在后续的实验中进行分析。表位 SELEX 方法在一定程度上弥补了这一技术缺陷^[68]。另外,现有的 SELEX 方法尚不能实现多靶点高通量筛选,一次只能对单个或少数几个靶点进行筛选。最近 Hünig 等^[69]建立了一个半自动筛选平台,可在 10 d 同时完成 12 个靶点的 SELEX 筛选,在一定程度上提高了筛选效率。

(3)目前,抗体仍是占市场主导地位的分子识别工具。经过几十年的实验室应用和临床评价,抗体无论在技术原理、改构(修饰)方法、生产工艺、临床应用、评价体系

以及市场认知度等方面均较为成熟。尽管在临床应用和生产上具有显著的优势,作为一个仅诞生 25 年的新型技术,核酸适配体尤其需要在临床评价体系和市场认知度方面进一步提升。随着核酸适配体的应用价值被认同,越来越多不同领域的科学家包括生物学、医学、化学、生物信息学等,以及生物制药公司涉足核酸适配体研发领域,这将大大加快核酸适配体从基础到临床以及成功商业化的步伐。

综上所述,作为一种新型的分子靶向工具,核酸适配体具有极高的商业价值和广阔的临床应用前景。尽管目前还面临着一些挑战,但其在体内外诊断、疾病治疗、生物传感器、生物标志物筛选、新药研发等方面的应用优势已然凸显。随着临床(前)数据的不断积累,在可以预期的时间内,将会有越来越多的核酸适配体产品完成从实验室到临床的转化。

[参考文献]

- [1] Serganov A, Patel D J. Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins[J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(10): 776-790.
- [2] Sun H, Zu Y. A highlight of recent advances in aptamer technology and its application[J]. *Molecules*, 2015, 20(7): 11959-11980.
- [3] Sun H, Zhu X, LU P Y, et al. Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3: e182.
- [4] Sun H, Zu Y. Aptamers and their applications in nanomedicine[J]. *Small*, 2015, 11(20): 2352-2364.
- [5] Burmeister P E, Lewis S D, Silva R F, et al. Direct *in vitro* selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF[J]. *Chem Biol*, 2005, 12(1): 25-33.
- [6] Stovall G M, Bedenbaugh R S, Singh S, et al. *In vitro* selection using modified or unnatural nucleotides[J]. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*, 2014, 56: 1-33.
- [7] Keefe A D, Cload S T. SELEX with modified nucleotides[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2008, 12(4): 448-456.
- [8] Basile A S, Huttmacher M, Nickens D, et al. Population pharmacokinetics of pegaptanib in patients with neovascular, age-related macular degeneration[J]. *J Clin Pharmacol*, 2012, 52(8): 1186-1199.
- [9] Förster C, Zydek M, Rothkegel M, et al. Properties of an LNA-modified ricin RNA aptamer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 419(1): 60-65.
- [10] Bates P J, Laber D A, Miller D M, et al. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer[J]. *Exp Mol Pathol*, 2009, 86(3): 151-164.
- [11] Macugen AMD Study Group, Apte R S, Modi M, et al. Pegaptanib 1-year systemic safety results from a safety-pharmacokinetic trial in patients with neovascular age-related macular degeneration[J]. *Ophthalmology*, 2007, 114(9): 1702-1712.
- [12] Darmostuk M, Rimpelova S, Gbelcova H, et al. Current approaches in SELEX: an update to aptamer selection technology[J]. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(6 Pt 2): 1141-1161.
- [13] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30.
- [14] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [15] Zhang X, Soori G, Dobleman T J, et al. The application of monoclonal antibodies in cancer diagnosis[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2014, 14(1): 97-106.
- [16] Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(5): 479-491.
- [17] Zhang P, Zhao N, Zeng Z, et al. Using an RNA aptamer probe for flow cytometry detection of CD30-expressing lymphoma cells[J]. *Lab Invest*, 2009, 89(12): 1423-1432.
- [18] Zeng Z, Tung C H, Zu Y. A cancer cell-activatable aptamer-reporter system for one-step assay of circulating tumor cells[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3: e184.
- [19] Zhao B, Wu P, Zhang H, et al. Designing activatable aptamer probes for simultaneous detection of multiple tumor-related proteins in living cancer cells[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 68: 763-770.
- [20] Wang K, Fan D, Liu Y, et al. Highly sensitive and specific colorimetric detection of cancer cells via dual-aptamer target binding strategy[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 73: 1-6.
- [21] Kashefi-Kheyrabadi L, Mehrgardi M A, Wiechec E, et al. Ultrasensitive detection of human liver hepatocellular carcinoma cells using a label-free aptasensor[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(10): 4956-4960.
- [22] Bi S, Ji B, Zhang Z, et al. A chemiluminescence imaging array for the detection of cancer cells by dual-aptamer recognition and bio-bar-code nanoprobe-based rolling circle amplification[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2013, 49(33): 3452-3454.
- [23] Chen X, He Y, Zhang Y, et al. Ultrasensitive detection of cancer cells and glycan expression profiling based on a multivalent recognition and alkaline phosphatase-responsive electrogenerated chemiluminescence biosensor[J]. *Nanoscale*, 2014, 6(19): 11196-11203.
- [24] Liu F, Zhang Y, Yu J, et al. Application of ZnO/graphene and S6 aptamers for sensitive photoelectrochemical detection of SK-BR-3 breast cancer cells based on a disposable indium tin oxide device[J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 51: 413-420.
- [25] Sheng W, Chen T, Tan W, et al. Multivalent DNA nanospheres for

- enhanced capture of cancer cells in microfluidic devices[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(8): 7067-7076.
- [26] Zhao W, Cui C H, Bose S, *et al.* Bioinspired multivalent DNA network for capture and release of cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(48): 19626-19631.
- [27] Zeng Z, Zhang P, Zhao N, *et al.* Using oligonucleotide aptamer probes for immunostaining of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues[J]. *Mod Pathol*, 2010, 23(12): 1553-1558.
- [28] Shangguan D, Li Y, Tang Z, *et al.* Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(32): 11838-11843.
- [29] Shangguan D, Cao Z, Meng L, *et al.* Cell-specific aptamer probes for membrane protein elucidation in cancer cells[J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(5): 2133-2139.
- [30] Li X, An Y, Jin J, *et al.* Evolution of DNA aptamers through *in vitro* metastatic-cell-based systematic evolution of ligands by exponential enrichment for metastatic cancer recognition and imaging[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(9): 4941-4948.
- [31] Olafsen T, Wu A M. Antibody vectors for imaging[J]. *Semin Nucl Med*, 2010, 40(3): 167-181.
- [32] Zeng Z, Parekh P, Li Z, *et al.* Specific and sensitive tumor imaging using biostable oligonucleotide aptamer probes[J]. *Theranostics*, 2014, 4(9): 945-952.
- [33] Wu X, Zhao Z, Bai H, *et al.* DNA aptamer selected against pancreatic ductal adenocarcinoma for *in vivo* imaging and clinical tissue recognition[J]. *Theranostics*, 2015, 5(9): 985-994.
- [34] Ma h, Gao Z, Yu P, *et al.* A dual functional fluorescent probe for glioma imaging mediated by blood-brain barrier penetration and glioma cell targeting[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 449(1): 44-48.
- [35] Zhang C, Ji X, Zhang Y, *et al.* One-pot synthesized aptamer-functionalized CdTe: Zn²⁺ quantum dots for tumor-targeted fluorescence imaging *in vitro* and *in vivo*[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(12): 5843-5849.
- [36] Kim B, Yang J, Hwang M, *et al.* Aptamer-modified magnetic nanoprobe for molecular MR imaging of VEGFR2 on angiogenic vasculature[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2013, 8(1): 399.
- [37] Heo D, Lee E, Ku M, *et al.* Maleimidyl magnetic nanoplatform for facile molecular MRI[J]. *Nanotechnology*, 2014, 25(27): 275102.
- [38] Varmira K, Hosseinimehr S J, Noaparast Z, *et al.* A HER2-targeted RNA aptamer molecule labeled with ^{99m}Tc for single-photon imaging in malignant tumors[J]. *Nucl Med Biol*, 2013, 40(8): 980-986.
- [39] Jacobson O, Yan X, Niu G, *et al.* PET imaging of tenascin-C with a radiolabeled single-stranded DNA aptamer[J]. *J Nucl Med*, 2015, 56(4): 616-621.
- [40] Zhao Z, Fan H, Zhou G, *et al.* Activatable fluorescence/MRI bimodal platform for tumor cell imaging *via* MnO₂ nanosheet-aptamer nanoprobe[J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(32): 11220-11223.
- [41] Rosenberg J E, Bambury R M, Van Allen E M, *et al.* A phase II trial of AS1411 (a novel nucleolin-targeted DNA aptamer) in metastatic renal cell carcinoma[J]. *Invest New Drugs*, 2014, 32(1): 178-187.
- [42] Vater A, Sahlmann J, Kröger N, *et al.* Hematopoietic stem and progenitor cell mobilization in mice and humans by a first-in-class mirror-image oligonucleotide inhibitor of CXCL12[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2013, 94(1): 150-157.
- [43] Mahlknecht G, Maron R, Mancini M, *et al.* Aptamer to ErbB-2/HER2 enhances degradation of the target and inhibits tumorigenic growth[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(20): 8170-8175.
- [44] Parekh P, Kamble S, Zhao N, *et al.* Immunotherapy of CD30-expressing lymphoma using a highly stable ssDNA aptamer[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(35): 8909-8917.
- [45] Zhao N, Pei S N, Qi J, *et al.* Oligonucleotide aptamer-drug conjugates for targeted therapy of acute myeloid leukemia[J]. *Biomaterials*, 2015, 67: 42-51.
- [46] Huang Y F, Shangguan D, Liu H, *et al.* Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells[J]. *Chembiochem*, 2009, 10(5): 862-868.
- [47] Subramanian N, Raghunathan V, Kanwar J R, *et al.* Target-specific delivery of doxorubicin to retinoblastoma using epithelial cell adhesion molecule aptamer[J]. *Mol Vis*, 2012, 18: 2783-2795.
- [48] Liu Z, Duan J H, Song Y M, *et al.* Novel HER2 aptamer selectively delivers cytotoxic drug to HER2-positive breast cancer cells *in vitro*[J]. *J Transl Med*, 2012, 10: 148.
- [49] Wen J, Tao W, Hao S, *et al.* A unique aptamer-drug conjugate for targeted therapy of multiple myeloma[J]. *Leukemia*, 2016, 30(4): 987-991.
- [50] Zhu G, Zheng J, Song E, *et al.* Self-assembled, aptamer-tethered DNA nanotrains for targeted transport of molecular drugs in cancer theranostics[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(20): 7998-8003.
- [51] Boyacioglu O, Stuart C H, Kulik G, *et al.* Dimeric DNA aptamer complexes for high-capacity-targeted drug delivery using pH-sensitive covalent linkages[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, 2: e107.
- [52] Zhang Z, Ali M M, Eckert M A, *et al.* A polyvalent aptamer system for targeted drug delivery[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(37): 9728-9735.
- [53] McNamara J O 2nd, Andrechek E R, Wang Y, *et al.* Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras[J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(8): 1005-1015.
- [54] Thiel K W, Hernandez L I, Dassie J P, *et al.* Delivery of chemosensitizing siRNAs to HER2⁺-breast cancer cells using RNA aptamers[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(13): 6319-6337.
- [55] Dai F, Zhang Y, Zhu X, *et al.* Anticancer role of MUC1 aptamer-miR-29b chimera in epithelial ovarian carcinoma cells through regulation of

- PTEN methylation[J]. *Target Oncol*, 2012, 7(4): 217-225.
- [56] Rink J S, Plebanek M P, Tripathy S, *et al*. Update on current and potential nanoparticle cancer therapies[J]. *Curr Opin Oncol*, 2013, 25(6): 646-651.
- [57] Liang H, Zhang X B, Lv Y, *et al*. Functional DNA-containing nanomaterials: cellular applications in biosensing, imaging, and targeted therapy[J]. *Acc Chem Res*, 2014, 47(6): 1891-1901.
- [58] Zhang L, Radovic-Moreno A F, Alexis F, *et al*. Co-delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs from nanoparticle-aptamer bioconjugates[J]. *Chem Med Chem*, 2007, 2(9): 1268-1271.
- [59] Huang F, You M, Chen T, *et al*. Self-assembled hybrid nanoparticles for targeted co-delivery of two drugs into cancer cells[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2014, 50(23): 3103-3105.
- [60] Wang J, You M, Zhu G, *et al*. Photosensitizer-gold nanorod composite for targeted multimodal therapy[J]. *Small*, 2013, 9(21): 3678-3684.
- [61] Shi H, Ye X, He X, *et al*. Au@Ag/Au nanoparticles assembled with activatable aptamer probes as smart "nano-doctors" for image-guided cancer thermotherapy[J]. *Nanoscale*, 2014, 6(15): 8754-8761.
- [62] Prodeus A, Abdul-Wahid A, Fischer N W, *et al*. Targeting the PD-1/PD-L1 immune evasion axis with DNA aptamers as a novel therapeutic strategy for the treatment of disseminated cancers[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2015, 4: e237.
- [63] Herrmann A, Priceman S J, Swiderski P, *et al*. CTLA4 aptamer delivers STAT3 siRNA to tumor-associated and malignant T cells[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(7): 2977-2987.
- [64] Boltz A, Piater B, Toleikis L, *et al*. Bi-specific aptamers mediating tumor cell lysis[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(24): 21896-21905.
- [65] Xiong X, Liu H, Zhao Z, *et al*. DNA aptamer-mediated cell targeting[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52(5): 1472-1476.
- [66] Amadio M, Govoni S, Pascale A. Targeting VEGF in eye neovascularization: what's new?: a comprehensive review on current therapies and oligonucleotide-based interventions under development[J]. *Pharmacol Res*, 2016, 103: 253-269.
- [67] Lincoff A M, Mehran R, Povsic T J, *et al*. Effect of the REG1 anticoagulation system versus bivalirudin on outcomes after percutaneous coronary intervention (REGULATE-PCI): a randomised clinical trial[J]. *Lancet*, 2016, 387(10016): 349-356.
- [68] Lao Y H, Chiang H Y, Yang D K, *et al*. Selection of aptamers targeting the sialic acid receptor of hemagglutinin by epitope-specific SELEX[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2014, 50(63): 8719-8722.
- [69] Hünig T, Wessels H, Fischer C, *et al*. Just in time-selection: a rapid semiautomated SELEX of DNA aptamers using magnetic separation and BEAMing[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(21): 10940-10947.



[专家介绍] 祖幼立: 医学博士, 美国康奈尔大学医学院教授, 休斯顿 Methodist 医院血液病理科主任, 休斯顿 Methodist 研究所肿瘤病理研究室主任。同时领导临床和研究工作使祖幼立教授有机会更好地从事转化医学的研究, 开发新的疾病诊断方法, 建立更有效的精准医疗手段。祖幼立教授的科研团队在核酸适配体及纳米技术临床应用研究领域处于世界领先地位, 并获得多项国际专利。目前, 祖幼立教授的研究工作得到多项 NIH 科研基金的资助, 共发表 SCI 论文 100 余篇。同时, 祖幼立教授还是 NIH 基金评审专家, 多家杂志的编委和特约审稿人, 以及多家科学协会的委员。



[专家介绍] 朱迅: 医学博士, 著名免疫学家, 吉林大学教授, 博士生导师, 国家新药咨询委员, 国家自然科学基金专家组成员, 同写意新药英才俱乐部理事长, 《药学进展》副主编。

先后主持或参与承担国家自然科学基金委员会、卫生部、国家医药管理局、吉林省科委、吉林省计委、日本厚生省等资助的课题 20 多项, 共发表论文 200 多篇, 参加编写或主编专著及教材 20 多部。获卫生部、吉林省科委等科技成果奖 5 次。1991 年获吉林省第二届青年科技奖; 1993 年享受国务院政府特殊津贴; 1996 年获“第二届全国中青年医学科技之星”称号; 1996 年被国家人事部、国家教委评为“全国优秀留学回国人员”; 1997 年获卫生部“世川医学奖学金优秀归国进修人员奖”; 1997 年被评为“吉林省有突出贡献的中青年专业技术人才”; 2000 年入选教育部“高等学校骨干教师资助计划”及教育部“跨世纪优秀人才培养计划”。

曾任白求恩医科大学副校长, 参加国内多家医药产业园区及医药企业的战略咨询, 技术及项目论证等数十次, 曾担任多家医药公司的顾问。多次参加国务院研究发展中心、国家发改委、国家食品药品监督管理局、科技部等组织的咨询及论证会; 应邀在国际及全国性会议或论坛上做大会报告或主题演讲(讲座)100 余次; 并多次组织或主持了全国性及区域性的“生物技术”研讨会或专题报告会。引荐、协助了 20 余名留学生回国创业或加盟国内制药公司, 其中多家企业已经成为各自领域的行业龙头。