

SELEX 技术及寡核苷酸适配体的近期研究进展

郭磊

[摘要] 指数富集的配体系统进化(SELEX)技术是一类具备蓬勃发展前景的体外筛选技术,在生物学、药学及化学领域已引起广泛关注。本文即针对 2004 年以来 SELEX 技术的发展特点,主要介绍两类新型 SELEX 策略,即毛细管电泳-SELEX 和针对复杂靶标的 SELEX 方法,并简要总结了寡核苷酸适配体在生物医学和药学相关方面的最新应用进展。

[关键词] 指数富集的配体系统进化;寡核苷酸适配体;肿瘤靶向;生物医学;药理学

[中图分类号] R9-39

[文献标识码] A

[文章编号] 1674-0440(2010)04-0249-08



郭磊,博士,副研究员。研究方向为生物分析化学和药物分析。近年来主要从事 SELEX 和适配体分子技术的研究。现负责国家科技重大专项子专题 1 项,国家自然科学基金面上项目 1 项;参加国家科技支撑计划、国家反恐科技专项及国家自然科学基金面上项目等课题 7 项。发表论文 30 余篇并授权国家发明专利 1 项。

Recent advances in SELEX and applications of aptamers

GUO Lei

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

[Abstract] Systematic evolution of ligands by exponential enrichment(SELEX), as one kind of selection techniques *in vitro*, attracts much interests in biology, pharmacology and chemistry area, and has a thriving future. In this paper, recent advances in SELEX technique since 2004 are summarized, and two kinds of novel SELEX strategies, capillary electrophoresis-SELEX and SELEX towards complex targets, are highlighted. Recent applications of oligonucleotide aptamers in the biomedical and pharmaceutical field are briefly introduced as well.

[Key words] SELEX; oligonucleotide aptamer; tumor targeting; biomedicine; pharmaceuticals

1 引言

1990 年,3 个课题组对指数富集的配体系统进化(SELEX)技术作出了里程碑式的贡献。Ellington 和 Szostak^[1]报道了能够特异性结合于染料小分子的 RNA 配体,并创造了适配体(aptamer)这个名词,以指代从 SELEX 技术中针对靶标系统进化出的核酸配体;Tuerk 和 Gold^[2]描述了针对 T4 DNA 聚合酶的筛选,提出并命名了 SELEX 技术;Robertson 和 Joyce^[3]则体外筛选出了 型核酶。

SELEX 技术的基本途径是将大容量的随机寡核苷酸序列库($10^{13}\sim 10^{15}$ 个随机寡核苷酸序列)与靶分子共同孵育,并通过各种分离途径将结合复合物与未结合序列分离。洗脱获得与靶分子结合的序列并对这些序列进行聚合酶链式反应

(PCR)扩增生成次级文库,用于下轮筛选。如此数轮反复后,对于收敛文库,挑选出富集的单克隆适配体并进行测序,即获得特异性识别靶分子的寡核苷酸序列,即寡核苷酸适配体。大容量的分子文库几乎涵盖了所有可能的立体构象,理论上可以针对任何靶分子筛选得到其特异性识别的适配体序列。

适配体是可以折叠成明确三维结构的、通过空间构型互补与靶分子高亲和性高特异性结合的一段寡核苷酸序列,以短的单链寡核苷酸序列(单链 DNA 或 RNA)为主。与抗体相比,其与靶分子之间分子识别功能与抗体极为相似,两者之间主要的作用力包括氢键、范德华力等。但适配体作用的靶分子范围极广(包括毒素、免疫原性弱和不具有免疫原性的物质);能够识别单抗不能区分的相似物质,比抗体具有更高的特异性;亲和力更高,其与靶分子形成的复合物的解离常数(K_d)一般都在纳摩尔每升水平,甚至可达皮摩尔每升,适配体且同时具有核酸自身稳定性强、变

基金项目:国家自然科学基金面上项目(20705039)

作者单位:100850 北京,军事医学科学毒物药物研究所八室(郭磊),E-mail:guoleibmi@gmail.com

性复性快速可逆、易功能化修饰与标记及作为优良的纳米器件等诸多优点。

与同为功能核酸分子的反义寡核苷酸或小干扰 RNA(siRNA)相比,后两者用于基因水平的靶标确证,其靶分子仅于胞内存在,且仅通过碱基互补作用发挥主要作用;适配体则可针对胞内、胞外或细胞表面的靶分子,作用力形式更加多样,是一类具有较好临床应用前景的功能性分子。例如,与短发夹 RNA(shRNA)相比,针对 HIV-1 逆转录酶的实验表明, RNA 适配体抑制 HIV-1 复制的效率更高^[4]。

SELEX 技术历经 20 年发展,已出现了灵活多样的筛选方式,筛选的靶分子亦从金属离子、有机小分子药物、核酸、蛋白质等拓展到了细胞、组织等复杂靶标,显示了该技术的强大生命力,亦展示了其在疾病基础研究及诊断治疗中的广泛应用前景。本文简要总结近 6 年来 SELEX 技术的主要进展情况,并着重阐述了核酸适配体在生物医学方面的应用情况及发展前景,肽类适配体则未纳入本文论述范畴。

2 SELEX 技术的发展

目前尚未建立针对任意靶标的标准 SELEX 筛选流程,亦不能保证凡 SELEX 筛选必有效。SELEX 技术筛选过程复杂,筛选成功率受到众多影响因素制约,如文库的设计、筛选技术尤其是分离技术的针对性和普适性、靶分子的性质结构、筛选缓冲液类型及离子种类等均影响筛选进程。发展更高效、更普适性的筛选手段是 SELEX 技术的主要致力方向,以下简略介绍 2004 年以来较呈系统化的两类新型 SELEX 策略。

2.1 基于毛细管电泳的 SELEX 方法

2004 年,以 Bowser 课题组发表在 *J Am Chem Soc* 上的筛选 IgE 的文章^[5]为标志,毛细管电泳(CE)以其高效分离选择性的特点被引入到 SELEX 技术中,使此种体外筛选技术的效率大大提高,一般仅需 2~4 轮即可达到常规方法 8~15 轮的富集效率。常规固液两相分离的方法中不可避免的一点是,对于固定到固定相表面的靶分子,将与之存在结合的序列洗脱下来时是一慢速动力学过程,需多轮往复方能富集到强结合序列。CE-SELEX 能成功实现的依据在于,文库与靶分子的结合完全在溶液中进行,结合与未结合序列经 CE 分离后进行收集,无需洗脱步骤,消除了动力

学方面的缺陷;在自由溶液中,因寡核苷酸文库与靶蛋白 IgE 荷质比的不同,结合后的寡核苷酸序列与游离文库间亦存在淌度差别,藉此实现分离;整个分离过程在溶液中进行,消除了固定相与连接臂引入的弊端,非特异性吸附位点大大降低。

继而 Krylov 课题组发展了一系列动力学 CE 体系模型,为上述 CE-SELEX 途径提供了理论基础。传统意义上来讲,CE 所涉及的相互作用体系均针对分析物在 CE 中形成的高斯型电泳峰,依据受体、配体的峰高或淌度的变化求解得到其结合/解离常数信息。体现在分析时间的规模范围内,动力学上的强相互作用体系,其复合物能稳定存在;弱相互作用体系中的复合物则倾向于完全解离,上述两种体系可分别应用毛细管区带电泳(CZE)或亲和毛细管电泳模式来分析。

Krylov 等首先提出的平衡混合物的非平衡 CE(NECEEM)方法,拓展了 CZE 模式的应用范围,使其适用于研究任何从弱到强的相互作用体系。在 CE 的高压电场分离过程中,配体、受体及配-受体复合物三者间根据不同淌度分离时,复合物不断解离,此解离区域在 CE 分离分析时间范围内表现为配体(受体)的拖尾或前伸峰,且此种解离可简单视为符合一级反应方程,即拖尾/前伸峰形与解离速率常数(K_{off})呈指数相关。因此,在 CE 过程中便可给出结合/解离平衡常数及速率常数(K_d , K_{off} 和 K_{on})^[6],更可在一次 CE 分离过程中,通过收集解离区域的不同位置筛选到具有不同 k_{off} 值的适配体^[7]。若结合温度控制,还可进一步给出热力学结合参数,如焓变和熵变等^[8]。这也是 CE-SELEX 方法所实际遵循的分离模式。

动力学 CE 体系中的平衡混合物的平衡 CE(ECEEM)方法,可筛选到预设亲和强度的适配体^[9];该动力学体系还可对挑选出的适配体克隆的亲和力进行快速评价^[10]。在 ECEEM 模式上省却各轮文库扩增步骤的 non-SELEX 方法,则将经首次 CE 分离得到的特异性结合文库,再次和靶蛋白进行平衡孵育,之后再行 CE 分离,如此反复分配,得到亲和力大为增强的收敛文库,其筛选周期甚至可缩短为 1 d 左右^[11]。

目前应用上述不同模式的 CE-SELEX 技术,已成功筛选到了针对神经肽 Y^[12]、HIV 逆转录酶^[13]、蛋白激酶 C- δ ^[14]、蓖麻毒素^[15]、赖氨酸残基 16 位乙酰化的组蛋白(H4-K16)^[16]、炭疽的保护性抗原毒素蛋白^[17]、蛋白溶菌酶^[18]及几种信号转导蛋

白^[19]等高亲和力高特异性的单链 DNA 适配体,例如,抗 H4-K16 适配体的特异性较强,对赖氨酸残基 8 位乙酰化的组蛋白或非乙酰化组蛋白并无交叉反应活性。该技术在以细胞为靶标进行筛选时亦得到了一些初步的有益结论^[20]。值得注意的是,使用 CE-SELEX 技术时,同一轮收敛文库中挑选出的 40~50 条单克隆适配体间并不具备较明显的同源性,一般认为与 CE 这种高效分离模式的特性相关。另外,由 CE-SELEX 技术筛选出的针对各靶蛋白的适配体,其后续的具体应用报道还较少。

2.2 针对复杂靶标的 SELEX 方法

与针对某一具体靶蛋白的 SELEX 方法相比,针对复杂靶标,如血浆蛋白、细胞裂解液、某一细胞系、病原菌甚至病理组织,特别是活细胞展开筛选有一定优势,如:无需纯化靶蛋白;可以更好的维持膜蛋白的天然构型,此种构型近似于其体内活性的维持形式;以及更利于鉴别出仅特定表型才具有的新型靶标等。但针对此种复杂靶标筛选时需要特别注意采用“消减”策略,以有效降低非特异性结合。

从不分级的人血浆中捕获的血浆蛋白作为混合靶标进行了去卷积 SELEX (deSELEX) 筛选,因靶标多样化而存在多个筛选终点,每一终点以某一适配体家族已高比例富集为指示;前 1~3 轮即可得到靶向凝血酶前体蛋白等高丰度蛋白质的适配体,将高丰度靶蛋白去除后,再次进行 SELEX 筛选,又可得到靶向其他蛋白如 C3 补体^[21]、凝血因子^{II, VII, X}^[22]等的适配体家族。但本法仅适用于可溶性蛋白,且不能区分靶标是单一蛋白质还是蛋白质复合体。

对细胞筛选而言,目前存在两种主要的筛选思路,其一,直接以过表达某种靶蛋白的细胞系为靶标,不表达该靶蛋白的细胞系为需“消减”的空白(反筛),一般称做细胞表面的过表达靶标 (TECS)-SELEX 技术;其二,直接对某一癌细胞系进行筛选,正常细胞系或相关癌细胞系为需“消减”的空白,其后通过得到的特异性适配体“钓取”并鉴定靶标,一般称做细胞 SELEX 技术 (cell-SELEX)。

跨膜蛋白是一类重要的药物靶标,但针对其的药物筛选存在较大难度。Cerchia 等^[23]针对过表达受体酪氨酸激酶 (RET) 的细胞系,经 TECS-SELEX 筛选到了特异性抑制 RET 的适配体,该类适配体

可干扰 RET 二聚化的形成,从而抑制相关胞内信号转导途径。继而,针对膜蛋白 RETC634Y, Pestourie 等^[24]比较了针对靶标筛选的不同方式,包括以表达 RETC634Y 的 PC12 细胞为靶标、以该 RET 的胞外结构域为靶标、以及交替使用上述两种靶标实施 SELEX,结果表明,仅以该 RET 的胞外结构域为靶标筛选得到的适配体并不与该转化细胞产生特异性结合,活细胞表面的靶标蛋白维持高丰度及活性形式,是成功筛选的关键。Ohuchi 等^[25]则针对表面过表达的人转化生长因子 β 型受体 (TbR) 的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系,11 轮筛选后得到了与 TbR 型特异性结合的 RNA 适配体。针对人表皮生长因子受体 2 (Her2) 高表达的人乳腺癌细胞系 SK-BR-3 筛选得到的 RNA 适配体,与 Her2 下调的细胞系 MDA-MB-231 无结合,对于高表达人 Her2 蛋白的小鼠细胞系 NIH-3T3 则产生特异性识别,说明了该适配体的靶标蛋白即为 Her2 蛋白^[26]。

近年来 Cell-SELEX 技术受到广泛关注。此种针对细胞的整体筛选,以正常或相关细胞做为背景“消减”,可有效鉴别出肿瘤特异性生物标志物而无需预先获知细胞表面特定受体的相关信息。例如,经 12 轮消减 SELEX 后,筛选出的 RNA 适配体仅特异性识别人外周血白血病 T 细胞 (Jurkat T 细胞),而不与正常外周血单核细胞产生结合^[27]。

Tang 课题组在以活细胞为靶标的 cell-SELEX 技术方面开展了一系列富有成效的工作,筛选出与白血病、肝癌^[28]、肺癌^[29]细胞特异结合的多簇单链 DNA 适配体。不同类型癌细胞具有不同的特征适配体分子指纹谱^[30]。例如,Shangguan 等^[31]以人类急性 T 淋巴细胞性白血病 (T-ALL) 的 CCRF-CEM 细胞系为靶细胞,以人 B 细胞系淋巴瘤 Ramos 细胞系 (Burkitt 淋巴瘤细胞, B 细胞) 为“消减”细胞进行反筛,筛选出特异性识别 T-ALL 癌细胞的多条适配体,其中部分适配体 (sgc3, sgc8 和 sgd3) 对 T-ALL 细胞系有较好的特异性,对正常造血细胞、淋巴细胞和骨髓瘤细胞不识别。这些适配体亦能将临床上的骨髓穿刺液正确归属于 T-ALL 类型和 B 细胞系淋巴瘤类型,其靶标经适配体“钓取”鉴定为跨膜蛋白酪氨酸激酶 PTK-7^[32]。另一仅靶向 Ramos 细胞系进行正向筛选的研究表明,此时筛选出来的不同适配体即与 Ramos 细胞系及相关细胞系如 CCRF-CEM、

Toledo 细胞系(人类弥漫性大 B 细胞淋巴瘤)产生不同的亲和力,但仍能于人骨髓穿刺液中识别相关细胞系^[33],靶标鉴定为膜结合 IgM 蛋白的重链部分^[34],IgM 分子是 Burkitt 淋巴瘤细胞表面表达的 B 细胞受体复合物的主要组分,其活性与 Burkitt 淋巴瘤细胞的增殖与存活行为直接相关。

Cell-SELEX 同样适于病原菌(如结核分枝杆菌 H37Rv 细胞株^[35]、金黄色葡萄球菌^[36])和病毒的筛选。Chen 等^[37]针对丙型肝炎(HCV)活病毒进行筛选,得到了靶向 HCV 包膜糖蛋白 E2 的适配体,可作为针对 HCV 患者的诊断试剂。Tang 等^[38]筛选了牛痘病毒感染的人肺癌细胞系 A549,靶标可能是细胞膜表面的病毒相关蛋白。MonoLEX 技术则以反筛后的亲和树脂固定去活牛痘病毒后,依据不同亲和力的寡核苷酸文库分子在层析柱内呈成簇分段分布的实践经验,将层析柱径向切割成细小片段,继而进行洗脱和荧光定量 PCR 扩增,一步筛选到了牛痘病毒的特异性适配体^[39]。

针对组织切片(包括临床病理切片)等的筛选也一般遵循“自上而下”型的策略。Noma 等^[40]针对鸡骨骼肌冰冻组织切片进行的 7 轮原位 SELEX 筛选,以适配体点杂交法初步鉴定其靶蛋白为高丰度的原肌球蛋白,展示了 SELEX 技术直接筛选出特异性识别组织水平生物标志物的可能性。Li 课题组^[41]建立了组织石蜡切片消减 SELEX 技术,以临床乳腺浸润性导管癌患者的癌组织切片为靶标,同例患者的癌旁组织为消减靶标,得到特异与乳腺癌靶组织中的癌细胞特异结合的 RNA 适配体,鉴定其靶蛋白为核不均一核糖核蛋白 hnRNP A1。Mi 等^[42]则对于人类结肠癌肝转移荷瘤裸鼠模型的肝肿瘤进行体内原位 SELEX 筛选,称为“体内 SELEX”,将 RNA 文库中嘧啶核苷 2' 位以氟基团修饰后经静脉注射到小鼠体内,然后将肝肿瘤切除,提取结合的文库进行扩增,经 14 轮筛选后,得到的特异性 RNA 适配体具备高度同源性,靶蛋白鉴定为小鼠 p68 RNA 解旋酶。与绝大多数 SELEX 于体外开展不同,此种筛选直接在体内展开,有效降低了与高丰度非靶蛋白的非特异性结合,筛选到与原位组织特异结合的靶蛋白的概率和针对性均有所增强。

尚须指出的是,不同种类(包括亚型)、不同时期的肿瘤细胞、多种病理组织亚型均表现出非常复杂的分子特征,筛选和鉴定肿瘤标志物方面的 SELEX 技术仍需发展,需要在筛选方法、标记

技术、示踪手段方面进行深入研究,以期真正筛选到可指示疾病的不同分期、肿瘤的不同亚型的适配体分子指纹谱。

3 适配体的生物医学及药学应用

由于适配体与蛋白质的结合往往阻断或调控了蛋白质正常生物学功能的发挥,适配体在临床应用方面显示出巨大的应用潜力,已有多种适配体型药物被研制出来,少数适配体药物已进入临床试验阶段,如 2004 年第 1 个获得 FDA 批准的适配体类药物培加尼布(pegaptanib, Macugen)^[43];适配体亦是一类非常有用的临床诊断元件。另外,因适配体可在体外细胞水平和体内动物模型两个层次起到抑制相关靶蛋白的作用特点,该技术可作为基因敲除或 siRNA 途径的一个有益补充,且可在蛋白质层面上提供很多有益信息。本部分简要总结适配体在相关生物医学和药学方面的最新进展。

3.1 适配体在生物医学方面的应用

适配体分子和纳米粒子均具有易多位点修饰、易于成为功能支架分子的特性,在基于适配体的肿瘤细胞靶向治疗方面,适配体可与纳米技术达成完美结合。例如,将治疗药物的靶向递送与可控释放有机结合,实现安全、有效的化疗,是癌症治疗策略的主要发展方向,适配体纳米粒子就可便捷地将化疗药物定向输送到肿瘤原发以及不定向肿瘤部位。2004 年, *Cancer Res* 上关于适配体偶联纳米粒靶向前列腺癌细胞的报道^[44]引起了该方向的研究热潮。

在该工作及后续的系列研究中, Farokhzad 等以前列腺癌细胞为模型,将内含紫杉醇类药物多西他赛(docetaxel)^[43-45]、顺铂^[46]的多聚乳酸/羟基乙酸-聚乙二醇(PLGA-PEG)纳米粒子与识别前列腺表面膜抗原(PSMA)的适配体相连,该偶合物能特异结合到过表达 PSMA 的肿瘤细胞上,继而被肿瘤细胞吞噬而发挥细胞毒性,实现靶向治疗,该靶向疗法亦在荷瘤裸鼠模型上显示了显著抑制肿瘤生长的在体效果。Bagalkot 等^[47]巧妙地利用抗肿瘤药物多柔比星(DOX)能嵌入到 DNA 双链区这一特性,将 DOX 与特异识别 PSMA 的适配体非共价结合,且不影响适配体的识别特性,实现了化疗药物对肿瘤细胞的靶向治疗作用。量子点-适配体-DOX 偶合物在成功靶向的同时,还可对癌细胞进行高灵敏度示踪^[48]。

另外,将金纳米粒子与抗表皮生长因子受体(EGFR)适配体的偶合物靶向至高表达 EGFR 的癌细胞,可较好地实现受体介导的胞吞作用^[49]。适配体-载药脂质体偶合物还可成功靶向递送药物至癌细胞^[50]。亦出现了适配体-毒素偶合物,与免疫毒素类似,RNA 适配体与白树毒素(gelolin)偶合后,除可选择性靶向至高表达 PSMA 的前列腺癌细胞表面外,还可促进毒素的内化作用,加速细胞凋亡,其 IC₅₀ 值达到纳摩尔每升水平^[51]。

RNA 干扰(RNAi)技术,即用 siRNA 代替传统反义寡核苷酸进行转录后的基因沉默技术,近年来已成为基因表达调控方面的强有力工具。同为寡核苷酸分子,适配体和 siRNA 可方便地进行序列连接,那么适配体及其靶分子即可成为 RNAi 的有效调控元件。An 等^[52]将结合茶碱的 RNA 适配体组合到 shRNA 的环上,不同剂量茶碱的加入在体内外水平上均可抑制 siRNA 的有效产生,这是第一例关于特定 RNA-小分子间的作用影响 RNAi 的报道。

抑制蛋白质活性的 RNA 适配体和抑制 mRNA 活性的 siRNA 同时应用时,更可发挥两者在基因表达的不同水平同时抑制靶标的特性。Chan 等^[53]对于核因子(NF)-κB 的哺乳动物细胞实验研究表明,仅使用 RNA 适配体或 siRNA 时,活性抑制率在 29%~64%,两者联合应用时,NF-κB 的活性抑制率达到 90%以上。

在上述研究基础之上,RNAi、适配体及纳米技术的有效组合可在一定程度上解决将 siRNA 成功靶向递送到特异性细胞中,且不对其他细胞产生不利影响这一难题。Khaled 等^[54]将受体特异性结合的 RNA 适配体和临床用 siRNA 组合起来,可控自组装到纳米粒子表面,形成的三价纳米粒子可成功递送 siRNA 分子到达癌细胞内,导致癌细胞凋亡。此种方式不产生免疫原性,有望用于慢性疾病的长期治疗。RNA 适配体通过亲和素-生物素途径与 siRNA 相连^[55],或构建 RNA 适配体-siRNA 嵌合体^[56],亦可成功靶向并递送 siRNA 至 PSMA 高表达的癌细胞中,后者还可通过原位注射方式靶向递送至靶组织。对上述嵌合体的结构进行改造,包括碱基修饰、PEG 化和优化 RNA 适配体结构后所产生的第二代 RNA 适配体-siRNA 嵌合体,可通过腹腔注射至血液循环成功实现 RNAi,有效抑制了肿瘤生长且不对正常组织造成影响^[57]。

3.2 适配体的药学应用

对于一些与肿瘤发生、发展相关的细胞因子、生长因子、生长因子受体、激酶等,已经筛选获得了特异结合的适配体,经功能基团修饰以增加其细胞摄取率和胞内浓度后,适配体可有效捕获细胞内或细胞膜上的肿瘤相关靶标,从而影响相关蛋白质的功能及生物活性,属于一类具备较好开发前景的药物。如靶向核仁蛋白的适配体 AGRO100,通过与核仁蛋白及 NF-κB 活性调节亚基形成复合体,可抑制 NF-κB 的活性^[58]。又如适配体药物培加尼布,其靶点为血管内皮生长因子(VEGF)^[59],它通过和 VEGF 的特异性结合,有效阻断了 VEGF 和其受体的识别作用,最终抑制肿瘤增殖与转移。对于视网膜病变——糖尿病性黄斑水肿的二期临床结果表明,培加尼布有效抑制了人眼中视网膜厚度,不需激光光凝疗法辅助^[60]。

适配体序列的长度多为 20~50 碱基,相对分子质量在 $(5\sim15)\times10^3$ 范围之间,在体内应用时须克服易被核酸外切酶降解、易被肾脏清除半衰期较短的劣势。一般来讲,可通过对适配体进行适当的化学修饰,包括于 RNA 的 2'位修饰上适当的化学官能团(巯基化、甲基化)、3'端封闭、5'和 3'端 PEG 化^[61],或构建镜像适配体^[62]、多价适配体等途径解决该类问题。例如,可针对构成寡核苷酸文库的核苷酸直接进行修饰,4 位巯基化 UTP 和 CTP 在可适用于体外转录和反转录过程的同时,文库抗 RNA 外切酶降解能力也增加 50 倍,以人凝血酶为靶蛋白筛选得到的巯基化适配体的亲和力亦有增强^[63]。

Di Giusto 等^[64]将纳米结构特性与适配体的功能特性相结合,构建出多价 DNA 适配体,有效增加了适配体的亲和力及在体液中的稳定性,如在血清和血浆里,其半衰期>10 h;在以荷瘤裸鼠为模型的体内实验中,锁核酸的血浆稳定性大大增强,且并不影响其结合特性^[65]。大鼠血浆药代动力学及组织分布实验表明,2'位氟代和 2'位 O-甲基化的抗 TGFβ-2 适配体 ARC83,再经 PEG 化修饰后,其在血液循环中的半衰期从 5 h 延长至 12 h,有效降低了肾脏对其的清除速率,更适于将适配体有效分布于各组织中^[66];ARC245 是从 2'位-O-甲基化的寡核苷酸文库中直接筛选出的靶向 VEGF 的适配体,其经 PEG 化后,其生物稳定性更强,半衰期可提高到 23 h,体现了该适配体药物适用于数天 1 次静脉注射方式的可能性^[67]。

另外,因适配体自身作为核酸分子具有的碱基互补特性,极利于构建其自身的拮抗剂或解毒剂(antidote)^[68]。如适配体作为抗凝血剂,可系统性地诱导动物模型产生抗凝效果和抑制血栓形成。解毒剂则可迅速逆转由此种抗凝血剂产生的抗凝血效应,从而有效防止手术中此种药物引起的过量出血。设计合理剂量的适配体/解毒剂是对药物药效进行有效控制的一种办法^[69]。2006 年, Dyke 等^[70]对于靶向凝血因子 a 的 RNA 适配体 RB006 及其解毒剂 RB007 同时进行了临床 A 期的人体药代动力学试验,适配体的剂量与活化部分凝血活酶时间(APTT)呈直接相关;在所有剂量水平,解毒剂均可在 1~5 min 内迅速起效;针对稳定型冠状动脉疾病的临床 b 期试验也表明了 RB006-RB007 适配体-解毒剂的药物安全性和有效性^[71]。

4 展望

历经 20 年,SELEX 技术正朝向高效、普适的方向发展,寡核苷酸适配体呈现出的分子结构多样、易功能化、无免疫原性等特征,以及可做为支架元件方便地与新型功能分子如 siRNA、化疗药物、细胞毒素和纳米粒子进行整合等特性,使得其做为新型的诊断和治疗元件在临床应用方面备受重视。目前来讲,适配体与肿瘤相关靶标在细胞、组织水平的高特异性识别大多于体外展开,用于活体诊治的研究报道较为有限,以适配体为主动靶向功能分子的工作还需深入。各种修饰型适配体的相关药代动力学研究亦亟待丰富。相信随着 SELEX 技术、RNAi 技术、纳米技术及现代生物技术和药物技术的飞速发展,单独使用适配体或与抗体、siRNA 的组合应用将在生物医学和药学方面大有可为。

【参考文献】

- [1] Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. *Nature*, 1990, 346 (6287): 818-822.
- [2] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. *Science*, 1990, 249(4968): 505-510.
- [3] Robertson DL, Joyce GF. Selection *in vitro* of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA [J]. *Nature*, 1990, 344(6265): 467-468.
- [4] Joshi PJ, North TW, Prasad VR. Aptamers directed to HIV-1 reverse transcriptase display greater efficacy over small hairpin RNAs targeted to viral RNA in blocking HIV-1 replication [J]. *Mol Ther*, 2005, 11(5):677-686.
- [5] Mendonsa SD, Bowser MT. *In vitro* evolution of functional DNA using capillary electrophoresis [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(1):20-21.
- [6] Berezovski M, Drabovich A, Krylova SM, *et al*. Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures: a universal tool for development of aptamers [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(9):3165-3171.
- [7] Drabovich AP, Berezovski M, Okhonin V, *et al*. Selection of smart aptamers by methods of kinetic capillary electrophoresis [J]. *Anal Chem*, 2006, 78(9):3171-3178.
- [8] Krylov SN. Kinetic CE. Foundation for homogeneous kinetic affinity methods [J]. *Electrophoresis*, 2007, 28(1/2):69-88.
- [9] Drabovich A, Berezovski M, Krylov SN. Selection of smart aptamers by equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures (ECEEM) [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(32): 11224-11225.
- [10] Yunusov D, So M, Shayan S, *et al*. Kinetic capillary electrophoresis-based affinity screening of aptamer clones [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 631(1):102-107.
- [11] Berezovski M, Musheev M, Drabovich A, *et al*. Non-SELEX selection of aptamers [J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(5): 1410-1411.
- [12] Mendonsa SD, Bowser MT. selection of aptamers with affinity for neuropeptide Y using capillary electrophoresis [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(6):9382-9383.
- [13] Mosing RK, Mendonsa SD, Bowser MT. Capillary electrophoresis-SELEX selection of aptamers with affinity for HIV-1 reverse transcriptase [J]. *Anal Chem*, 2005, 77(19):6107-6112.
- [14] Mallikaratchy P, Stahelin RV, Cao Z, *et al*. Selection of DNA ligands for protein kinase C-delta [J]. *Chem Comm*, 2006, 30:3229-3231.
- [15] Tang J, Xie J, Shao N, *et al*. The DNA aptamers that specifically recognize ricin toxin are selected by two *in vitro* selection methods [J]. *Electrophoresis*, 2006, 27(7):1303-1311.
- [16] Williams BAR, Lin L, Lindsay SM, *et al*. Evolution of a histone H4-K16 acetyl-specific DNA aptamer [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(18):6330-6331.
- [17] Cella LN, Sanchez P, Zhong W, *et al*. Nano aptasensor for protective antigen toxin of anthrax [J]. *Anal Chem*, 2010, 82 (5):2042-2047.
- [18] Tran DT, Janssen KPF, Pollet J, *et al*. Selection and characterization of DNA aptamers for egg white lysozyme [J]. *Molecules*, 2010, 15(3):1127-1140.
- [19] Tok J, Lai J, Leung T, *et al*. Selection of aptamers for signal transduction proteins by capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2010, 31(12): 2055-2062.
- [20] 徐 华, 李少华, 郭 磊, 等. 基于毛细管电泳的细胞 SELEX 方法的初步建立 [J]. 军事医学科学院院刊, 2009, 33(5):461-464.
- [21] Fitter S, James R. Deconvolution of a complex target using DNA aptamers [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(40):34193-34201.
- [22] Layzer JM, Sullenger BA. Simultaneous generation of aptamers

- to multiple gamma-carboxyglutamic acid proteins from a focused aptamer library using DeSELEX and convergent selection[J]. *Oligonucleotides*, 2007, 17(1):1-11.
- [23] Cerchia L, Ducongé F, Pestourie C, *et al.* Neutralizing aptamers from whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase[J]. *PLoS Biol*, 2005, 3(4):e123.
- [24] Pestourie C, Cerchia L, Gombert K, *et al.* Comparison of different strategies to select aptamers against a transmembrane protein target[J]. *Oligonucleotides*, 2006, 16(4):323-335.
- [25] Ohuchi SP, Ohtsu T, Nakamura Y. Selection of RNA aptamers against recombinant transforming growth factor-beta type receptor displayed on cell surface [J]. *Biochimie*, 2006, 88(7):897-904.
- [26] Kang HS, Huh YM, Kim S, *et al.* Isolation of RNA aptamers targeting HER-2-overexpressing breast cancer cells using cell-SELEX[J]. *Bull Kor Chem Soc*, 2009, 30(8):1827-1831.
- [27] Lee YJ, Lee SW. *In vitro* selection of cancer-specific RNA aptamers [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2006, 16(7):1149-1153.
- [28] Shangguan D, Meng L, Cao ZC, *et al.* Identification of liver cancer-specific aptamers using whole live cells[J]. *Anal Chem*, 2008, 80(3):721-728.
- [29] Chen HW, Medley CD, Sefah K, *et al.* Molecular recognition of small-cell lung cancer cells using aptamers [J]. *Chemmedchem*, 2008, 3(6):991-1001.
- [30] Shangguan D, Cao ZC, Li Y, *et al.* Aptamers evolved from cultured cancer cells reveal molecular differences of cancer cells in patient samples [J]. *Clin Chem*, 2007, 53(6):1153-1155.
- [31] Shangguan D, Li Y, Tang Z, *et al.* Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2006, 103(32):11838-11843.
- [32] Shangguan D, Cao Zc, Meng L, *et al.* Cell-specific aptamer probes for membrane protein elucidation in cancer cells[J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(5):2133-2139.
- [33] Tang Z, Shangguan D, Wang K, *et al.* Selection of aptamers for molecular recognition and characterization of cancer cells [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(13):4900-4907.
- [34] Mallikaratchy P, Tang Z, Kwame S, *et al.* Aptamer directly evolved from live cells recognizes membrane bound immunoglobulin heavy Mu chain in Burkitt's lymphoma cells[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(12):2230-2238.
- [35] Chen F, Zhou J, Luo F, *et al.* Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2007, 357(3):743-748.
- [36] Cao X, Li S, Chen L, *et al.* Combining use of a panel of ss-DNA aptamers in the detection of *Staphylococcus aureus* [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(14):4621-4628.
- [37] Chen F, Hu YL, Li D, *et al.* CS-SELEX generates high-affinity ssDNA aptamers as molecular probes for Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2[J]. *PLoS One*, 2009, 4(12):e8142.
- [38] Tang Z, Parekh P, Turner P, *et al.* Generating aptamers for recognition of virus-infected cells [J]. *Clin Chem*, 2009, 55(4):813-822.
- [39] Nitsche A, Kurth A, Dunkhorst A, *et al.* One-step selection of vaccinia virus-binding DNA aptamers by MonoLEX [J]. *BMC Biotech*, 2007, 7:48.
- [40] Noma T, Ikebukuro K, Sode K, *et al.* A screening method for DNA aptamers that bind to a specific, unidentified protein in tissue samples[J]. *Biotech Lett*, 2006, 28(17):1377-1381.
- [41] Li S, Xu H, Ding H, *et al.* Identification of an aptamer targeting hnRNP A1 by tissue slide-based SELEX[J]. *J Pathol*, 2009, 218(3):327-336.
- [42] Mi J, Liu Y, Rabbani ZN, *et al.* *In vivo* selection of tumor-targeting RNA motifs[J]. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(1):22-24.
- [43] Ng EWM, Shima DT, Calias P, *et al.* Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease[J]. *Nat Rev*, 2006, 5(2): 123-132.
- [44] Farokhzad OC, Jon S, Khademhosseini A, *et al.* Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(21): 7668-7672.
- [45] Farokhzad OC, Cheng J, Teplý BA, *et al.* Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(16): 6315-6320.
- [46] Dhar S, Gu F, Langer R, *et al.* Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt () prodrug-PLGA-PEG nanoparticles [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2008, 105(45):17356-17361.
- [47] Bagalkot V, Farokhzad OC, Langer R, *et al.* An aptamer-doxorubicin physical conjugate as a novel targeted drug-delivery platform[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45(48):8149-8152.
- [48] Bagalkot V, Zhang L, Levy-Nissenbaum E, *et al.* Quantum dot-aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on fluorescence resonance energy transfer[J]. *Nano Lett*, 2007, 7(10):3065-3070.
- [49] Li N, Larson T, Nguyen HH, *et al.* Directed evolution of gold nanoparticle delivery to cells [J]. *Chem Comm*, 2010, 46(3):392-394.
- [50] Kang H, O'Donoghue MB, Liu H, *et al.* A liposome-based nanostructure for aptamer directed delivery[J]. *Chem Comm*, 2010, 46(2):249-251.
- [51] Chu TC, Marks JW, Lavery LA, *et al.* Aptamer:toxin conjugates that specifically target prostate tumor cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(12):5989-5992.
- [52] An CI, Trinh VB, Yokobayashi Y. Artificial control of gene expression in mammalian cells by modulating RNA interference through aptamer-small molecule interaction [J]. *RNA*, 2006, 12(5):710-716.
- [53] Chan R, Gilbert M, Thompson KM, *et al.* Co-expression of anti-NF-kappa B RNA aptamers and siRNAs leads to maximal suppression of NF-kappa B activity in mammalian cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(5): e36.
- [54] Khaled A, Guo S, Li F, *et al.* Controllable self-assembly of nanoparticles for specific delivery of multiple therapeutic

- molecules to cancer cells using RNA nanotechnology[J]. *Nano Lett*, 2005, 5(9):1797-1808.
- [55] Chu TC, Twu KY, Ellington AD, *et al.* Aptamer mediated siRNA delivery[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(9): e73.
- [56] McNamara JO, Andrechek ER, Wang Y, *et al.* Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras[J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(8):1005-1015.
- [57] Dassie JP, Liu X, Thomas GS, *et al.* Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(9): 839-846.
- [58] Girvan AC, Teng Y, Casson LK, *et al.* AGRO100 inhibits activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) by forming a complex with NF- κ B essential modulator (NEMO) and nucleolin[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(7):1790-1799.
- [59] Ruckman J, Green LS, Beeson J, *et al.* 2'-fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165) [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(32): 20556-20567.
- [60] Cunningham ET, Adamis AP, Altaweel M, *et al.* A phase randomized double-masked trial of pegaptanib, an antivascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema [J]. *Ophthalmology*, 2005, 112(10):1747-1757.
- [61] McCauley TG, Kurz JC, Merlino PG, *et al.* Pharmacologic and pharmacokinetic assessment of anti-TGF beta 2 aptamers in rabbit plasma and aqueous humor [J]. *Pharm Res*, 2006, 23(2):303-311.
- [62] Purschke WG, Eulberg D, Buchner K, *et al.* An L-RNA-based aquaretic agent that inhibits vasopressin *in vivo* [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2006, 103(13):5173-5178.
- [63] Kato Y, Minakawa N, Komatsu Y, *et al.* New NTP analogs: the synthesis of 4'-thioUTP and 4'-thioCTP and their utility for SELEX[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(9):2942-2951.
- [64] Di Giusto DA, King GC. Construction, stability, and activity of multivalent circular anticoagulant aptamers [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(45):46483-46489.
- [65] Schmidt KS, Borkowski S, Kurreck J, *et al.* Application of locked nucleic acids to improve aptamer *in vivo* stability and targeting function [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(19): 5757-5765.
- [66] Healy JM, Lewis SD, Kurz M, *et al.* Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions[J]. *Pharm Res*, 2004, 21(12): 2234-2246.
- [67] Burmeister PE, Lewis SD, Silva RF, *et al.* Direct *in vitro* selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF[J]. *Chem Biol*, 2005, 12(1): 25-33.
- [68] Oney S, Lam RTS, Bompiani KM, *et al.* Development of universal antidotes to control aptamer activity [J]. *Nat Med*, 2009, 15(10): 1224-1228.
- [69] Rusconi CP, Roberts JD, Pitoc GA, *et al.* Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(11): 1423-1428.
- [70] Dyke CK, Steinhubl SR, Kleiman NS, *et al.* First-in-human experience of an antidote-controlled anticoagulant using RNA aptamer technology—a phase 1A pharmacodynamic evaluation of a drug-antidote pair for the controlled regulation of factor a activity[J]. *Circulation*, 2006, 114(23):2490-2497.
- [71] Chan MY, Cohen MG, Dyke CK, *et al.* Phase 1B randomized study of antidote-controlled modulation of factor a activity in patients with stable coronary artery disease[J]. *Circulation*, 2008, 117(22):2865-2874.

(收稿日期:2010-07-10 修回日期:2010-07-20)

关注药物安全性

美国 FDA 警告辛伐他汀导致肌肉损伤的风险性增加

美国 FDA 目前警告 80 mg 剂量降胆固醇药物辛伐他汀(simvastatin, Zocor)可使肌肉损伤风险增高。肌肉损伤(称为肌病)是他汀类药物常见不良反应,此警告强调辛伐他汀导致肌肉损伤的高风险性,包括横纹肌溶解症,高剂量服用风险更高。横纹肌溶解症是重症肌病,可导致重度肾损伤和肾功能衰竭,甚至死亡。美国 FDA 一直关注辛伐他汀的回顾性研究,以评估他汀类药物引起相关肌肉损伤的风险。关于肌肉损伤风险的新信息源于临床试验、观察研究、不良事件报告和处方使用的数据。目前 FDA 正综合分析辛伐他汀 SEARCH 研究结果,该研究将服用辛伐他汀 80 mg 和 20 mg 的患者进行对比,主要评估心血管事件,如心脏病、血管重建术和心血管疾病所致死亡。

美国 FDA 召回多个批号丁酸氯维地平

美国 FDA 召回 11 个批号高血压治疗药丁酸氯维地平注射剂(clevidipine butyrate, Cleviprex),因为发现其中可能存在惰性不锈钢颗粒。这些颗粒聚集或较大颗粒可减缓毛细血管血液流动速率,造成组织机械损伤或发生急慢性炎症反应,组织血液供应减少可能导致缺血或脑、肾脏、肝脏、心脏及肺等多器官功能不全。

(张世俊 赵文丽摘)