中国科学: 化学 2018 年 第 48 卷 第 11 期: 1407 ~ 1419
SCIENTIA SINICA Chimica chemcn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

评 述 化学生物学驱动的药物创新专刊

核酸适配子与核酸适配子制药

郑婷, 马子跃, 杜权*

北京大学药学院, 北京 100191
*通讯作者, E-mail: quan.du@pku.edu.cn

收稿日期: 2018-07-05; 接受日期: 2018-09-21; 网络版发表日期: 2018-10-31
国家自然科学基金(编号: 31571403)资助项目

摘要 近年来, 分子靶向性治疗在临床实践中取得了显著的进展, 尤其是在肿瘤治疗领域, 开启了一个全新的时代. 单克隆抗体和小分子靶向抑制剂是其中的两个支柱品种, 而在更前期的研究中, 一类被称作"化学抗体"的单链核酸分子也引起了人们的关注. 这类新型靶向性制剂又被称作"核酸适配子", 它们对性质各异的众多靶标分子均具有较高的靶向特异性和亲和性, 是分子靶向治疗的新方向. 本文针对核酸适配子的技术发展和成药性研究进行了综述.

关键词 核酸适配子, 核酸制药, SELEX, 成药性研究

1 引言

"核酸适配体"是一类对某种靶标分子具有高度亲和性的单链寡聚DNA或RNA, 这个概念是由Gold课题组[1]和Szostak课题组[2]于20世纪90年代几乎同时提出. 两个课题组均以单链随机核酸文库为基础, 筛选能特异性结合各自靶标分子的核酸适配子, 所采用的筛选手段也基本相同. Gold课题组获得了对噬菌体T4 DNA聚合酶具有高亲和性的适配子分子, 而Szostak课题组的靶标则是一组有机大分子. 在他们各自的工作基础上, Gold课题组提出了指数富集的配体系统进化技术(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX)的概念, 而Szostak课题组则利用拉丁语词根aptus (to fit)和希腊语词根meros (part), 创造了"aptamer"这个新名词, 精确地揭示了aptamer技术的内涵.

这样利用SELEX筛选, 针对某种特定的靶标分子获得的高亲和性单链核酸分子就构成了传统意义上的核酸适配子. 近来随着基因组技术的迅速发展, 人们对内源性核酸序列的认识越来越深入, 发现了大量对不同类型的靶标分子(小分子代谢产物、蛋白质)具有高亲和性的内源性核酸片段[3,4]. 在这种情况下, 核酸适配子被重新定义为对某种特定的靶标分子具有高亲和性的单链核酸, 包括SELEX筛选获得的非天然核酸序列和内源性核酸序列.

2 核酸适配子与靶标的结合

SELEX体外筛选技术是一个开创性的高亲和性分子发现平台. 利用该技术, 研究人员可以针对不同类型的靶标分子, 筛选与它们具有高亲和性的核酸适配子. 在过去的20多年中, 人们对该技术的应用范围和

引用格式: Zheng T, Ma Z, Du Q. Aptamer and aptamer pharmaceuticals. *Sci Sin Chim*, 2018, 48: 1407–1419, doi: 10.1360/N032018-00158

© 2018 《中国科学》杂志社

应用效果进行了广泛的验证，靶标范围囊括传统的有机大分子、多肽和蛋白质，以及金属离子、小分子、病毒、细菌、全细胞，甚至于存在于活体动物体内的多种不同类型的分子(图1).

探究适配子的靶标识别机理，人们发现单链的核酸适配子首先在经典的和非经典的碱基配对作用下，折叠成stem、loop、bugle、pseudoknot、G-quadruplex以及kissing hairpin等多种稳定二级结构[5]，并在此基础上形成三级或更高级的构象，作为一个整体共同完成对靶标分子的特异性识别，这种识别作用的基础为处于适配子空间构象的某些关键位点的化学基团. 适配子独特的空间构象使得这些化学基团能够足够靠近靶标分子的某些化学基团，建立包括疏水作用、静电相互作用、氢键、范德华力以及碱基堆积力在内的多种物理、化学联系，形成对靶标分子的特异性亲和作用和识别能力[6]. 这种基于特定空间构象的分子识别不仅赋予了核酸适配子高度的特异性和亲和力，也是抗体/抗原间识别作用的基础[7]. 这种识别的特异性还表现在它们能够区别与靶标非常相似的其他分子，包括靶标分子的构象异构体[8]和官能团替换分子[9,10]以及蛋白靶标的氨基酸突变体[11].

在靶标识别作用中，核酸适配子的另一个特点是尽管它们的分子量较小(5~30 kDa)，但却可以通过复杂的折叠方式形成较大的靶标结合表面积，拥有更优化的靶标结合位点[12]. 解离常数(K_d)常常可以低至μM到pM水平[13,14]，与治疗性抗体相当. 作为分子靶向治疗另一个支柱的小分子抑制剂，它们结合靶标分子的解离常数则是在nM水平. 以EGFR的抑制剂gefitinib (Iressa®，AstraZeneca，英国)为例，这种小分子作为ATP的类似物，能够占据配体酪氨酸激酶的ATP结构域，其结合野生型EGFR的解离常数为53.5 nM[15]. 以EGFR为靶点的抑制性单抗cetuximab (Erbitux®，ImClone，Branchburg，美国)的解离常数仅为2.3 nM[16]. 与抗体类似，SELEX筛选获得的两个anti-EGFR核酸适配子的解离常数分别为10[17]和2.4 nM[18].

需要指出的是，作为一种带有较强负电性的直链寡聚核苷酸，核酸适配子的空间构象是在特定的核酸序列和环境因素的共同作用下形成的，环境因素包括靶标分子的相对浓度、缓冲液成分、离子强度、pH、结合的温度、时间等诸多确定的和不确定的条件. 研究人员通常采用非生理的溶液条件开展SELEX筛选，并在整个过程中尽可能地保持实验条件的稳定. 可以理解的是在SELEX筛选中，经由多轮筛选过程的强化，最终获得的适配子的空间构象对环境因素具有极高的依赖性. 在实际应用尤其是体内应用中，环境成分的变化以及拥挤程度的提高，对适配子保持高亲和性的高级构象提出了严峻的挑战，极有可能对适配子的结合能力产生不可预知的影响.

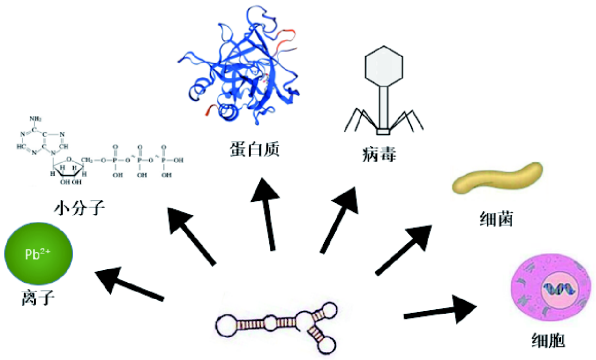


图 1 aptamer靶点的广泛性(网络版彩图)
Figure 1 Univerisial target of aptamer (color online).

3 核酸适配子与蛋白抗体的比较

在如今的分子靶向性治疗领域，蛋白质抗体是当之无愧的主力分子. 回顾抗体药物的发展历程，我们能够看到在历经一个多世纪的不懈努力之后，科研人员才成就了今天的辉煌，期间经历了多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体等多个阶段. 用“antibody”作为关键词检索药物临床实验网站(https://www.clinicaltrials.gov)，能发现3500项正在开展的和已完成的抗体药物的临床实验研究，而用“aptamer”检索则只有23项.

然而，无论是从靶标分子的结合方式，还是对靶标分子结合的亲和力和特异性，核酸适配子与抗体都非常相似，并且在靶标分子类型、亲和力水平、生产成本等诸多方面，核酸适配子反而比抗体分子具有更大的技术优势.

核酸适配子的优势首先是其相对简单的体外筛选方式，并且研究人员还可以通过调节筛选过程的各种环境条件，获得在特定条件下对靶标分子具有高亲和性的适配体类型. 在制备抗体时，需要在生理条件下对活体动物进行多次免疫，极大地限制了抗原分子的

类型[19,20], 至于抗原位点的选择, 也是由动物的免疫系统自主决定, 人力几乎无法干预.

核酸适配子的体外筛选方式极大地扩展了靶标分子的类型, 囊括了汞[21]、铅[22]等对活体动物有较大毒性的金属离子, 茶碱[9]、可卡因[23]等有机小分子, 荧光基团[24,25]、卟啉[26]等有机大分子, 蛋白抗体的主要靶标多肽、激素[27,28]、酶[29,30]、抗体分子[31]以及细胞表面蛋白[32]. 广泛的靶标类型也极大地扩展了适配子技术的应用范围, 尤其是在检测领域, 具有抗体技术所无法比拟的优势.

适配子技术的另一个重要的优势在于其成熟的化学合成体系. 与基于细胞反应器的抗体生成不同, 寡核酸链的化学合成过程简洁、产品纯度高、批次间稳定性好、适合批量生成且生成成本相对较低. 在化学合成中, 还可以方便对适配子进行不同的化学修饰, 提高它们的稳定性、生物利用度和药代动力学性质等关键的药学性质, 也可以使其与荧光基团、量子点[33,34]、化疗剂、siRNA、纳米颗粒或固相载体偶联, 适合不同的应用场景和治疗方案.

在构象稳定性方面, 核酸适配子的优势也非常明显. 高温通常会使蛋白抗体永久变性和失活, 而核酸适配子对高温具有很强的耐受性, 即便是经历高温变性, 其空间构象也很容易再生, 恢复对靶标分子的结合能力[19,20]. 因此, 核酸适配子对运输、存储和使用条件的要求较低.

在免疫原性和细胞毒性方面, 研究数据表明天然核酸分子几乎没有免疫原性和毒性, 是非常理想的药物候选分子[35,36].

4 SELEX筛选的起始文库

对于核酸适配子的筛选, 起始文库的选择是关键步骤. 起始文库大体分为DNA文库和RNA文库两种类型. 具体到在一次筛选中需要使用哪种文库, 主要由筛选工作的性质和目标来决定. 如果为了获得能够在细胞内表达的RNA aptamers或核糖开关 (riboswitches), 需要在RNA文库的基础上开始筛选工作. 如果为了获得体外研究实验的靶标标记分子或者适配子制药, 也可以选择具有更稳定的骨架结构的DNA文库. 从该技术的发展过程来看, 早期主要集中在RNA aptamers方面[37], 因为当时普遍认为RNA分子更适合折叠成功能性结构. 这种情况一直延续到2007年, RNA适配子研究占据了研究总量的70%[37]. 2008年以后, DNA文库筛选逐渐成为主流[37]. 从研究数据来看, 针对某种特定靶标筛选到的DNA、RNA适配子在亲和性方面无显著性差异[38], 并且就DNA和RNA文库研究而言, 均未发现具有显著的系统性优势[37].

核酸文库中随机序列的长度是关系到分子多样性的一个重要指标. N个随机序列文库中分子的种类为4^N, 至于由这些序列形成的空间构象的可能性, 则显然要高于这个数值. 除了理论上的考虑外, 文库的长度还取决于合成技术的难度和成本、对PCR扩增过程的影响以及适配子的最终用途. 如果用于制药、体内药物递送这些方面, 应尽可能选择短的文库类型.

在SELEX筛选中, 30~50mer随机序列文库最为常见[39]. 以1~2 nmol的常规合成规模来看, 28mer的随机文库的序列多样性已高达7×10^{16} [40], 基本满足了筛选的需要, 也远高于抗体文库的库容量水平. 至于筛选所需的最小序列多样性, 则很难确定. 早期研究中, Thiel等[41]曾经用过一个20mer的随机文库(序列多样性为10^{11}), 也获得了具有高度亲和性的适配子. 但这些工作多是以小分子靶标进行的RNA SELEX筛选, 该方案是否可以推广到其他靶标分子尚未可知.

作为内源性生物大分子, 无论RNA还是DNA都存在被核酸酶降解的风险. 为了提高适配子的化学稳定性, 通常需要对核酸链的骨架结构进行化学修饰. 常见的有核糖修饰和磷酸骨架修饰等(2′-NH_2、2′-F、2′-OMe、4′-S、锁核酸(LNA)、TNA、FANA、己糖醇核酸(HNA)). 2′-氨基修饰是最早应用的修饰种类[42], 但由于其对核糖构象的不利影响[43], 这种修饰方案目前已很少使用. 2′-F修饰具有较强的抗降解能力, 对核糖空间构象的影响也比较小, 在SELEX技术中得到了广泛的应用[44]. 化学修饰尽管能显著提高核酸分子的稳定性、延长其在体内的半衰期, 但也有可能对核酸链的空间构象产生不可预知的影响, 干扰其对靶标分子的亲和性.

为了进一步优化SELEX筛选、提高适配子结构的稳定性, 研究人员也对扩增引物的结合位点进行优化[45], 甚至在完全去除引物结合位点的情况下进行SELEX筛选[46,47]. 也有研究人员在随机序列中加入一定的固定序列, 提高适配子构象的多样性和稳定性[48,49].

5 传统SELEX筛选的风险和应对方案

SELEX筛选的核心就是从高度复杂的核酸文库中分离出能结合靶标分子的核酸序列[50,51]. 为了高效地实现这种分离, 通常先将靶标分子偶联于固相载体的表面. 在随后的筛选中, 利用固相载体分离与其偶联的靶标分子以及与靶标分子结合的核酸适配体. 从SELEX的原理可以看出, 这个分离过程越充分, 筛选的效率也就越高. 但不可忽视的一点是固相载体表面也是由大量的化学基团构成的, 并且为了能够将靶标分子偶联到固相载体上, 还需要对固相载体表面进行充分的化学修饰, 增加更多性质更加活泼的化学基团. 如果我们从微观的角度审视适配子的分离过程, 就能发现相比于偶联到固相载体表面的有限的靶标分子而言, 固相载体表面绝大多数的化学基团于分离过程无益, 并极有可能干扰分离过程的发生.

常用的固相载体有硝酸纤维素膜、亲和柱、色谱树脂颗粒、磁珠等, 此外研究人员也尝试利用先进的仪器设备辅助适配子的分离, 如分离毛细管电泳(CE)[52,53]、原子力显微镜(AFM)[54,55]、流式细胞仪[56,57]、微流体芯片技术[58,59]和表面等离子共振仪(SPR)[60]. 从发表的研究工作来看, 这些新技术均能在一定程度上提高筛选的效率.

与固相载体分离类似, 对高亲和性适配子的PCR扩增是SELEX筛选的另一个支点. 不同于通常的PCR反应, 筛选过程中需要对同一样本进行多轮PCR扩增, 这就非常容易导致非特异性扩增、引物二聚体富集的问题[61,62]. 研究发现, 一旦出现非特异性扩增产物的积累, 它们就会在后续的筛选中逐步替代目标适配子序列, 成为PCR扩增产物的主体成分, 导致筛选失败[63]. 为了克服这个问题, 研究人员近来开始尝试利用乳化液PCR (emulsion PCR)和数字PCR (droplet digital PCR)抑制非特异性扩增的发生[64,65].

此外, 研究人员也开始利用高通量测序和生物信息学技术, 监测核酸序列在筛选过程中的富集情况. 这是对传统SELEX技术的另一项重大改进, 这不仅有助于及时获得高亲和性的适配子序列, 揭示适配子进化的动态过程[66,67], 还能使我们更全面地了解核苷酸组成的富集情况[41,68], 进一步提高对SELEX过程的掌控程度.

6 以细胞为靶点的筛选方案

除了传统的分子靶点以外, SELEX技术近来还被用于标记和识别完整的细胞, 衍生出cell-SELEX[69,70]、*in vivo* SELEX[71]、tissue SELEX[72]和3D cell-SELEX[73]等新方案. 对以单分子蛋白质为靶标的传统SELEX而言, 筛选过程通常是在非生理条件下开展的, 当将在这种条件下获得的适配子用于识别处于天然构象的靶标蛋白时, 常常会出现亲和力不足的问题. 为了解决这些问题, 研究人员开始针对完整的细胞、甚至是活细胞来进行SELEX筛选, 被称为cell-SELEX. 与基于纯化蛋白的SELEX不同, cell-SELEX是以靶细胞表面某种或所有的以其天然构象存在的结构分子为靶标进行的SELEX筛选. 这个方案主要是为了尽量保持靶标蛋白的天然构象, 使适配子更适合体内应用和疾病治疗.

cell-SELEX另一个显著的优势是当分子靶标尚不明确时, 可以仅针对不同的细胞类型开展SELEX筛选. 这样获得的一组核酸适配子, 能够共同识别某种靶细胞类型, 作为生物标志物应用于疾病的诊断和治疗. 正是基于这种考虑, cell-SELEX被首先应用于肿瘤细胞生物标志物的发现[74], 包括乳腺癌细胞、肺癌细胞[75]和白血病细胞[70,76].

7 G四链体

G-四链体(G-quadruplex, G4)是一类具有特征性四链构型的核酸适配子, 由富含鸟嘌呤核苷酸的DNA或RNA链折叠而成[77]. 作为该高级结构的组成单元, 4个鸟嘌呤碱基在Hoogsteen氢键的介导下相互作用, 形成一个类似平面正方形的G-四分体(G-quartet). 两层或多层G-四分体通过π-π堆积, 形成特征性的四链体构型. 一个G-四链体的四分体个数、糖基构象、核酸链的相对方向以及loop结构等均会对其空间构象产生影响, 也成就了G-四链体空间构象的多样性, 使其对性质各异的多种靶标分子类型均具有较高的特异性和亲和性[78].

靶向凝血酶(thrombin)的TBA15是研究得最透彻的一个G-四链体[79], 由15个DNA核苷酸组成(GGTTGGTGTGGTTGG). 在其与凝血酶蛋白的共结晶中[80], TBA15被夹在两个凝血酶蛋白之间. 利用疏

水作用和静电力, TBA15与一侧的凝血酶分子C-末端的纤维蛋白原结合位点结合, 与另一侧凝血酶分子的肝素结合位点结合. 其三个loop结构之一的TGT序列与纤维蛋白原位点附近的疏水簇(Ile24、His71、Ile79、Tyr117)形成疏水作用, 而TT loop中的一个T碱基与肝素结合位点附近的His91、Pro92和Trp237发生相互作用, 共同保持G4-thrombin晶体结构的稳定性. 作为一个经典的G4研究模型, 围绕TBA15开展了大量的基础性研究工作. 就已鉴定的G4分子而言, 多数具有富含T的loop区域[79,81], 一个可能的原因是与腺嘌呤A相比, 胸腺嘧啶具有更好的热力学性质和较低的溶剂化熵, 而C的出现则更容易形成双螺旋结构. 另一个特点是多数G4分子具有三个或三个以上的G-四分体结构, 这可能是获得稳定的骨架结构的要求.

除经典的G4结构以外, 近年来, 包括具有凸起结构的G4分子类型[82], 具有混合G:A:G:A、G:T:G:T、G:C:G:C四分体的分子类型[83,84], 以及描述为"interlocked"[85]或"intertwined"的G4二聚体[86]. 这些研究进展表明以我们目前的认知而言, G四链体这个概念所囊括的分子类型要丰富得多. 有趣的是, 在高等生物基因组序列中, 也发现了大量的内源性G4结构, 并具有重要的生物学活性[87,88]. 在人染色体末端端粒的重复序列中, 鉴定了多种富含G的DNA G4结构类型(TTAGGG), 它们与TRF1、TRF2、TEBP等蛋白因子相互作用, 共同调节端粒的折叠状态, 维持染色体末端的稳定性[89]. 内源性G4结构也常出现在基因的启动子区域, 位于基因转录起始位点的上游. 研究发现, 约50%的人类基因的启动子区域可能存在G4结构, 在原癌基因(c-myc、c-kit、bcl-2、VEGF、H-ras、N-ras等)中这种情况尤为突出. 此外, mRNA中也存在大量的G4结构. 这些内源性G4结构共同调控基因的转录和翻译过程[90,91], 对维持细胞的正常功能和状态发挥着关键的作用[92,93].

源于其稳定的骨架构象, G4结构在体外和体内条件下均表现出较高的靶向特异性和亲和性, 具有较好的成药前景. 一方面, 可以筛选针对疾病治疗靶点的高亲和性G4分子, 用于药物开发[94]; 另一方面, 利用内源性G4的结合蛋白为靶标, 筛选内源性G4的拮抗剂分子. AS1411是一个靶向核仁素蛋白的G4适配体(GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG), 用于治疗AML和肾细胞癌, 目前正处于临床II期试验阶段[95]. 在G4研究中, 一个意外的发现是富含G的核酸序列具有广泛的抗肿瘤细胞增殖活性, 而对正常细胞的增殖则无明显影响[96]. 一个可能的解释是这些G4分子通过竞争作用, 干扰了内源性G4结构的生理功能, 进而产生了广谱的抗肿瘤活性.

8 基于核酸适配子的新药研发

尽管核酸适配子的应用领域涵盖了生物和医药领域的方方面面, 但其作为治疗性药物的巨大潜力毫无疑问是人们关注的焦点[97,98]. 迄今为止, 美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)仅批准上市了一种RNA适配体药物MAGUGEN® (PEGAPANTIB), 用于老年性湿性黄斑变性的治疗. 此外, 还有十余种核酸适配子目前正处于临床试验的不同阶段, 适应症包括黄斑变性、凝血、肿瘤和炎症, 其中的几种候选药物表现良好.

核酸适配子制药大体分为三个方向: (1) 作为拮抗剂, 阻断关键的蛋白质/蛋白质或受体/配体间的相互作用; (2) 作为激动剂, 激活靶受体的功能; (3) 利用其对某种细胞类型的识别能力, 作为其他药物分子的靶向递送载体[99,100].

作为拮抗剂的应用. 治疗性适配子作为拮抗剂, 破坏病理过程中关键的蛋白/蛋白相互作用. 目前所有处于临床试验中的适配子均属于这一类型. 利用SELEX筛选也能获得内源性RNA适配子的类似物, 通过竞争性地结合内源性适配子的靶标蛋白, 这种类似物能抑制内源性适配子的病理作用[101]. 在HIV-1治疗研究中, 通过模拟能与TAT蛋白结合的长末端重复序列(LTRS)中的调节元件, 可有效抑制HIV RNA的转录, 干扰病毒复制[102,103].

作为激动剂的应用. 目前已开发了几个作为激动剂的治疗性核酸适配子, 分别靶向人表皮生长因子受体-3 (HER3/ERBB3)[104]、OX40 (CD134)[105,106]、4-1BB (CD137)[107]、CD40[108]、CD28[109]、人VEGFR-2[110]和胰岛素受体(IR)[111]. 几种靶向免疫共刺激受体(CD28、CD40、OX40和4-1BB)的RNA适配子被设计成多聚体形式, 进一步加强它们的肿瘤免疫治疗效果[112].

作为递送载体的应用. 将能识别不同细胞类型的核酸适配子与治疗性siRNA、microRNA、anti-miR、

表 1 临床试验阶段的核酸适配体药物

Table 1 Aptamer drugs in clinical trial

治疗目标	药品名称与专利公司	靶标	种类	治疗中的疾病
黄斑变性	Macugen® (Pegaptanib sodium) Pfizer/Eyetech	VEGF165	27-nt RNA	老年性黄斑变性(AMD); 糖尿病黄斑水肿; 增殖性糖尿病视网膜病变
	Zimura® (ARC1905) Ophthothech	C5	38-nt RNA	老年性黄斑变性(AMD); 样脉络膜血管病变(IPCV); 地图样萎缩
	Fovista® (E10030) Opthothech/Retinal Consultantsof Arizona	PDGF	29-nt DNA	老年性黄斑变性(AMD)
凝血	REG1抗凝血系统(RB006 和 RB007) Regado Biosciences	凝血因子IXA	37-nt RNA	急性冠脉综合征(ACS); 心脏导管术(IV型); 冠心病(CAD); 经皮冠状动脉介入治疗(PCI)
	ARC1779 Archemix	血管性血友病因子的A1结构域	39-nt DNA	血管性血友病; 紫癜; 2b型血栓性血小板减少性血管性血友病; 急性心肌梗死; 经皮冠状动脉介入治疗; 血栓症
	NU172 ARCA Biopharma	凝血酶	26-nt DNA	心脏疾病(如在体外循环中维持抗凝状态稳定)
	ARC19499 (BAX499) Baxalta US	TFPI	32-nt RNA	血友病
肿瘤	AS1411 (AGRO001) Antisoma	核仁素	26-nt DNA	急性髓样白血病(AML); 转移性肾细胞癌; 晚期实体瘤
	NOX-A12 NOXXON Pharma	CXCL12或SDF-1	45-nt RNA (Spiegelmer®)	多发性骨髓瘤(MM)以及非霍奇金淋巴瘤(NHL); 慢性淋巴细胞白血病(CLL); 自体干细胞移植; 造血干细胞移植
炎症	NOX-E36 NOXXON Pharma	CCL2	40-nt RNA (Spiegelmer®)	慢性炎症性疾病; 2型糖尿病; 系统性红斑狼疮; 蛋白尿; 肾功能损害
	NOX-H94 NOXXON Pharma	海帕西啶肽类激素	44-nt RNA (Spiegelmer®)	贫血; 终末期肾病; 慢性病贫血; 炎症

治疗性核酸适配体、化疗药物或毒素进行偶联，利用适配子对靶细胞的亲和性，将这些药物分子特异性地递送到靶组织或靶细胞中[113]，实现疾病的精准治疗，同时减少药物的毒副作用.

表1是正在进行临床试验的一些核酸适配体药物的数据.

9 核酸适配子制药的关键问题

尽管在理论上核酸适配子具有显著的技术优势，但与抗体药物迅猛发展相比，核酸适配子的成药性进展却非常迟缓[99,114]. 即便是对于唯一一个核酸适配子药物pegaptanib (Macugen®)而言[115,116]，其治疗效果也要逊色于针对同一靶点的单克隆抗体药物bevacizumab和ranibizumab[117,118]. 最近还因为引发强烈的免疫反应, 一个处于临床III期的适配子药物研究被叫停, 该药是以Factor IXa为靶点的可逆性的抗凝血药物[119,120]. 然而对于适配子的研究现状而言，这些问题的出现并非偶然，因为尚有许多关键的成药性瓶颈未被克服.

9.1 体内降解问题

药物分子的体内半衰期是其成药性的一个重要指标, 直接关系到药物的治疗效果. 人源化抗体的半衰期可达几天到几周的时间[14]，要显著优于其他药物类型，尤其是核酸药物. 由未修饰的天然核苷酸构成的适配子极易被体内广泛存在的核酸酶降解，多数情况下药物分子的半衰期为几分钟至几十分钟[121]. 为了应对这一挑战, 通常会对核酸药物进行化学修饰, 通过改变其天然构象，抵抗核酸酶的降解、提高药物分子的体内稳定性和半衰期[14].

近年来, 通过不懈的努力, 抗核酸酶降解的核酸修饰技术已逐步成熟. 用非天然的2′-NH_2、2′-F修饰替换核糖2′位置上的羟基，就可以将核酸分子的血清稳定

性提高到2 d以上[122], 如果是眼球内注射, 则能将稳定性提高至28 d[123]. 目前, 核糖2′位置上的氟代[18]、氨基[14,124]、甲氧基修饰[125,126]已经成为标准的修饰方案. 以抗人肿瘤坏死因子TNF的RNA适配子为例, 未经修饰的适配子血清半衰期仅为几分钟, 而2′-氨基和2′-氟代修饰则能将适配子的半衰期提高至8 h以上[124]. 有研究表明, 对核酸骨架进行硫代修饰不仅能显著提高适配子的稳定性[127], 还能通过减少骨架结构的负电性, 在一定程度上提高对靶标分子的亲和性. 以Gorenstein课题组[128]的工作为例, 其开发的二硫代适配子的亲和力就比单硫代适配体子提高了28~600倍. 除了这些主流的修饰方案以外, 利用*L*-核糖(RNA spiegelmers)或*L*-脱氧核糖(DNA spiegelmers)构建的核酸适配子也显示出了良好的抗降解能力[129]. 需要注意的是, 这些抗降解修饰方案均是利用非天然核酸类似物, 抑制体内核酸酶对适配子核酸链的识别和降解.

在修饰策略上, 有in-SELEX和post-SELEX两种方案可供选择. 第一种方案是在SELEX筛选的起始文库中引入修饰核苷酸, 在存在修饰核苷酸的情况下完成整个筛选过程[130,131]. 这种方案的缺点是能够利用核酸修饰种类很少, 目前只有2-氨基嘧啶(2-aminopyrimidine)[42]、2-氟嘧啶(2′-fluoropyrimidines)[132]、2′-*O*-甲基核苷酸[133]和LNA[134,135], 优点是完成筛选过程即能获得既对靶标分子具有较高亲和性, 又能抗核酸酶降解的适配子分子. 对post-SELEX方案而言, 则是在完成SELEX筛选后, 对获得的高亲和性适配子再进行化学修饰, 提高其对抗核酸酶的能力. 尽管可供选择的修饰核苷酸种类较多, 这种筛选后修饰极有可能会影响适配子正确的空间构象, 干扰其对靶标分子的结合能力[136].

9.2 肾脏清除问题

影响适配子半衰期的另一个重要因素是肾脏滤过问题. 核酸适配子的分子量在5~30 kDa, 平均粒径5 nm以下[137], 多数小于肾小球的滤过阈值为50 kDa, 容易被肾脏滤过并排除体外. 克服这一问题的方法是将其与分子量较大的大分子或聚合物偶联, 提高其表观分子量, 以延长其在循环系统中的保留时间. 常用的偶联载体有聚乙二醇(PEG)[133]、胆固醇[138,139]、蛋白质[140,141]、多聚化[142,143]或纳米材料[11]. 以MuuGEN® (OSI Pharmaceuticals, 美国)为例, 将该RNA适配子与分子量为40 kDa的PEG缀合, 能将静脉给药的半衰期延长至9.3 h, 皮下注射的半衰期延长至12 h[122], 而玻璃体内注射的半衰期更是延长到94 h[123]. 在小鼠研究中, 人们发现将2′氟-/2′-氧甲基修饰的核酸适配子与40 kDa的PEG缀合, 能使其半衰期增加至23 h[133]. 然而, 高分子量PEG缀合也可能影响适配子与靶标分子的结合[144]. 因此, PEG分子量的选择、与PEG的连接方式以及连接臂的长度等均需要通过实验研究来逐一确定.

9.3 毒性作用

核酸适配子的分子量较小, 血液中的适配子分子能够快速扩散至组织或脏器, 在局部形成过度积累, 产生细胞毒性. 在适配子及其降解产物的清除过程, 也可能导致其在肾脏、肝脏组织中的过度积累, 引发毒性作用[145]. 利用免疫组织化学、原位杂交或组织病理学方法, 可以定性或定量检测寡核苷酸的组织分布水平[146,147]. Geary等[145]将硫代TNF适配子静脉注射小鼠和灵长类动物后, 发现它们在动物的肾脏、肝脏、淋巴结和脾脏中的积累. 研究发现, 以100 mg/kg体重的剂量进行腹腔内单次注射或以50 mg/kg体重的剂量进行静脉单次注射, 会产生可逆性的肾脏和肝脏功能异常, 恢复期一般为4~13周. 静脉注射适配子制剂在肝脏中会引起单核细胞浸润、Kupffer细胞肥大及肝窦扩张等现象, 转氨酶AST和ALT水平略有升高, 在肾脏中则观察到嗜碱性粒细胞浸润的现象[148]. 对靶向载脂蛋白B合成酶的硫代反义核酸mipomersen的临床研究表明, 在5周的治疗时间内, 出现了剂量依赖性的AST和ALT的升高[149,150].

化学修饰是核酸适配子毒性的另一个重要来源. 非天然核酸掺入虽然能抑制核酸酶的降解, 同时也会造成适配子的体内代谢障碍, 引起毒性作用或免疫反应, 因此对适配子的化学修饰应采取谨慎的态度. 例如, 研究LNA修饰核酸就曾经观察到严重的肝脏毒性[151].

此外, 适配子药物的毒性还可能来源于与之偶联的化合物. REG1 (Regado Biosciences)的三期临床研究发现, 当患者体内存在抗PEG抗体时, 使用PEG化的REG1就会导致严重的过敏反应[152]. 而与高度亲脂分子的偶联则更容易导致核酸分子在肝脏的富集, 引发肝毒性[153].

9.4 免疫原性

一般来说, 对于特异性免疫系统而言, 核酸分子的免疫原性较弱[154]. 但对于进入体内的外源性核酸分子, 机体还是可以利用固有免疫反应体系中的多种受体蛋白, 识别并清除它们. 常见的受体分子有Toll样受体家族(Toll-like receptors, TLRs)和视黄酸诱导基因(retinoic acidinducible gene, RIG)-I样受体(RLRs)[155]. TLR 3、TLR 7、TLR 8或TLR 9能识别非内源性的核酸分子, 并激活非特异性免疫反应[156]. TLR9能够识别DNA中未甲基化的CpG岛序列, TLR3识别双链RNA, 而TLR7和TLR8则能识别异常的单链RNA结构[131]. 研究表明, 通过深入认识这些受体的识别模式, 可以降低甚至避免适配子分子对固有免疫反应的激活[157].

10 总结与展望

就本综述的核心——核酸适配子制药而言, 一个明显的矛盾是其显著的技术优势和非常有限的临床转化案例之间的强烈对比. 之所以会出现这种情况, 技术垄断是一个最常被谈及的话题. 与抗体技术悠久的发展历史不同, SELEX筛选是一个全新的技术方案. 对这样一项创新性的技术而言, 技术持有者具有排他性的垄断权利, 他们的态度是否开放在很大程度上决定了该技术的早期发展. 目前这种状况仍在影响适配子的临床转化. 用“aptamer”作为关键词检索国际专利数据库, 能搜索一千余项相关的专利申请. 这一方面体现了人们对该技术的殷切期望, 另一方面, 这种密集的专利篱笆也会对该技术的发展带来较大的负面影响. 当然, 在现今世界中对任何一项享有巨大商业化前景的新技术, 这种状况都是不可能完全避免的.

与外在的专利垄断相比, 核酸适配子技术发展的内在问题是一个更重要的制约因素. 放在包括antisense RNA、siRNA、microRNA和aptamer制药在内的核酸制药的大背景下, 许多关键的成药性难题和临床安全性研究都还处于探索阶段, 对核酸药物的制剂形态、药代动力学特性、药效学性质和毒性等共性问题, 还缺乏清晰的认识和被验证的解决方案.

就核酸适配子制药的个性问题而言, SELEX筛选过程中环境因素的影响、载体和PCR扩增的干扰等也未被有效克服. 这些问题不仅造成筛选的成功率低, 对适配子空间构象的稳定性以及在不同环境条件下对靶标分子的识别也产生了不利的影响. 在学术领域, 这种情况表现为大量的研究工作都集中在少数几个经过广泛验证的适配子分子上, 如凝血酶适体, Geoffray Baird将其称作“凝血酶问题”[35,158].

尽管就核酸适配子的临床转化存在诸多技术障碍和挑战, 但人类对新技术的热情和对新一代治疗药物的巨大需求, 为包括适配子在内的核酸药物的发展注入了强大的动力.

参考文献

1 Tuerk C, Gold L. *Science*, 1990, 249: 505–510
2 Ellington AD, Szostak JW. *Nature*, 1990, 346: 818–822
3 Cooper TA, Wan L, Dreyfuss G. *Cell*, 2009, 136: 777–793
4 Long JC, Caceres JF. *Biochem J*, 2009, 417: 15–27
5 Mayer G. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 2672–2689
6 Gelinas AD, Davies DR, Janjic N. *Curr Opin Struct Biol*, 2016, 36: 122–132
7 Gold L. *J Biol Chem*, 1995, 270: 13581–13584
8 Geiger A, Burgstaller P, von der Eltz H, Roeder A, Famulok M. *Nucl Acids Res*, 1996, 24: 1029–1036
9 Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B. *Science*, 1994, 263: 1425–1429
10 Sassanfar M, Szostak JW. *Nature*, 1993, 364: 550–553
11 Chen L, Rashid F, Shah A, Awan HM, Wu M, Liu A, Wang J, Zhu T, Luo Z, Shan G. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 10002–10007
12 Lakhin AV, Tarantul VZ, Gening LV. *Acta Nat,* 2013, 5: 34-43
13 Gewirtz AM. *Curr Opin Mol Ther,* 1999, 1: 297–306
14 Brody EN, Gold L. *Rev Mol Biotech*, 2000, 74: 5–13

15 Yun CH, Boggon TJ, Li Y, Woo MS, Greulich H, Meyerson M, Eck MJ. *Cancer Cell*, 2007, 11: 217–227
16 Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJW, Kussie P, Ferguson KM. *Cancer Cell*, 2005, 7: 301–311
17 Esposito CL, Passaro D, Longobardo I, Condorelli G, Marotta P, Affuso A, de Franciscis V, Cerchia L. *PLoS One*, 2011, 6: e24071
18 Li N, Nguyen HH, Byrom M, Ellington AD. *PLoS One*, 2011, 6: e20299
19 Centi S, Tombelli S, Minunni M, Mascini M. *Anal Chem*, 2007, 79: 1466–1473
20 Tombelli S, Minunni M, Mascini M. *Biomol Eng*, 2007, 24: 191–200
21 Ono A, Togashi H. *Angew Chem Int Ed*, 2004, 43: 4300–4302
22 Ye BF, Zhao YJ, Cheng Y, Li TT, Xie ZY, Zhao XW, Gu ZZ. *Nanoscale*, 2012, 4: 5998–6003
23 Stojanovic MN, de Prada P, Landry DW. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 4928–4931
24 Holeman LA, Robinson SL, Szostak JW, Wilson C. *Folding Des*, 1998, 3: 423–431
25 Grate D, Wilson C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 6131–6136
26 Li Y, Geyer CR, Sen D. *Biochemistry*, 1996, 35: 6911–6922
27 Leva S, Lichte A, Burmeister J, Muhn P, Jahnke B, Fesser D, Erfurth J, Burgstaller P, Klussmann S. *Chem Biol*, 2002, 9: 351–359
28 Yoshida W, Mochizuki E, Takase M, Hasegawa H, Morita Y, Yamazaki H, Sode K, Ikebukuro K. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24: 1116–1120
29 Dupont DM, Andersen LM, Botkjaer KA, Andreasen PA. *Curr Med Chem*, 2011, 18: 4139–4151
30 Cerchia L, de Franciscis V. *Curr Med Chem*, 2011, 18: 4152–4158
31 Missailidis S. *Methods Mol Biol,* 2004, 248: 547–555
32 Chen M, Yu Y, Jiang F, Zhou J, Li Y, Liang C, Dang L, Lu A, Zhang G. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 2079
33 Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 383: 83–91
34 Nitsche A, Kurth A, Dunkhorst A, Pänke O, Sielaff H, Junge W, Muth D, Scheller F, Stöcklein W, Dahmen C, Pauli G, Kage A. *BMC Biotechnol*, 2007, 7: 48
35 Baird GS. *Am J Clin Pathol*, 2010, 134: 529–531
36 Wlotzka B, Leva S, Eschgfäller B, Burmeister J, Kleinjung F, Kaduk C, Muhn P, Hess-Stumpp H, Klussmann S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 8898–8902
37 McKeague M, McConnell EM, Cruz-Toledo J, Bernard ED, Pach A, Mastronardi E, Zhang X, Beking M, Francis T, Giamberardino A, Cabecinha A, Ruscito A, Aranda-Rodriguez R, Dumontier M, DeRosa MC. *J Mol Evol*, 2015, 81: 150–161
38 McKeague M, Derosa MC. *J Nucl Acids*, 2012, 2012: 1–20
39 Cowperthwaite MC, Ellington AD. *J Mol Evol*, 2008, 67: 95–102
40 Pobanz K, Lupták A. *Methods*, 2016, 106: 14–20
41 Thiel WH, Bair T, Wyatt Thiel K, Dassie JP, Rockey WM, Howell CA, Liu XY, Dupuy AJ, Huang L, Owczarzy R, Behlke MA, McNamara Ii JO, Giangrande PH. *Nucl Acid Ther*, 2011, 21: 253–263
42 Lin Y, Qiu Q, Gill SC, Jayasena SD. *Nucl Acids Res*, 1994, 22: 5229–5234
43 Lipi F, Chen S, Chakravarthy M, Rakesh S, Veedu RN. *RNA Biol*, 2016, 13: 1232–1245
44 Fitzwater T, Polisky B. *Methods Enzymol,* 1996, 267: 275–301
45 Shtatland T, Gill SC, Javornik BE, Johansson HE, Singer BS, Uhlenbeck OC, Zichi DA, Gold L. *Nucl Acids Res*, 2000, 28: 93e–93
46 Lai YT, DeStefano JJ. *Anal Biochem*, 2011, 414: 246–253
47 Lai YT, DeStefano JJ. *Nucl Acid Ther*, 2012, 22: 162–176
48 Nutiu R, Li Y. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 1061–1065
49 Nutiu R, Li Y. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 4771–4778
50 Ozer A, Pagano JM, Lis JT. *Mol Ther-Nucl Acids*, 2014, 3: e183
51 Darmostuk M, Rimpelova S, Gbelcova H, Ruml T. *Biotech Adv*, 2015, 33: 1141–1161
52 Drabovich AP, Berezovski M, Okhonin V, Krylov SN. *Anal Chem*, 2006, 78: 3171–3178
53 Mosing RK, Mendonsa SD, Bowser MT. *Anal Chem*, 2005, 77: 6107–6112
54 Miyachi Y, Shimizu N, Ogino C, Kondo A. *Nucl Acids Res*, 2010, 38: e21
55 Peng L, Stephens BJ, Bonin K, Cubicciotti R, Guthold M. *Microsc Res Tech*, 2007, 70: 372–381
56 Raddatz MSL, Dolf A, Endl E, Knolle P, Famulok M, Mayer G. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 47: 5190–5193

57 Mayer G, Ahmed MSL, Dolf A, Endl E, Knolle PA, Famulok M. *Nat Protoc*, 2010, 5: 1993–2004
58 Huang CJ, Lin HI, Shiesh SC, Lee GB. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25: 1761–1766
59 Cho M, Xiao Y, Nie J, Stewart R, Csordas AT, Oh SS, Thomson JA, Soh HT. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 15373–15378
60 Sayer N, Ibrahim J, Turner K, Tahiri-Alaoui A, James W. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293: 924–931
61 Kanagawa T. *J Biosci Bioeng*, 2003, 96: 317–323
62 Schütze T, Rubelt F, Repkow J, Greiner N, Erdmann VA, Lehrach H, Konthur Z, Glökler J. *Anal Biochem*, 2011, 410: 155–157
63 Musheev MU, Krylov SN. *Anal Chim Acta*, 2006, 564: 91–96
64 Yufa R, Krylova SM, Bruce C, Bagg EA, Schofield CJ, Krylov SN. *Anal Chem*, 2015, 87: 1411–1419
65 Shao K, Ding W, Wang F, Li H, Ma D, Wang H. *PLoS One*, 2011, 6: e24910
66 Levay A, Brenneman R, Hoinka J, Sant D, Cardone M, Trinchieri G, Przytycka TM, Berezhnoy A. *Nucl Acids Res*, 2015, 43: e82
67 Hoinka J, Berezhnoy A, Dao P, Sauna ZE, Gilboa E, Przytycka TM. *Nucl Acids Res*, 2015, 43: 5699–5707
68 Thiel WH, Bair T, Peek AS, Liu X, Dassie J, Stockdale KR, Behlke MA, Miller FJ, Giangrande PH. *PLoS One*, 2012, 7: e43836
69 Sefah K, Shangguan D, Xiong X, O'Donoghue MB, Tan W. *Nat Protoc*, 2010, 5: 1169–1185
70 Shangguan D, Li Y, Tang Z, Cao ZC, Chen HW, Mallikaratchy P, Sefah K, Yang CJ, Tan W. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 11838–11843
71 Cheng C, Chen YH, Lennox KA, Behlke MA, Davidson BL. *Mol Ther-Nucl Acids*, 2013, 2: e67
72 Li S, Xu H, Ding H, Huang Y, Cao X, Yang G, Li J, Xie Z, Meng Y, Li X, Zhao Q, Shen B, Shao N. *J Pathol*, 2009, 218: 327–336
73 Souza AG, Marangoni K, Fujimura PT, Alves PT, Silva MJ, Bastos VAF, Goulart LR, Goulart VA. *Exp Cell Res*, 2016, 341: 147–156
74 Gedi V, Kim YP. *Sensors*, 2014, 14: 18302–18327
75 Chen HW, Medley CD, Sefah K, Shangguan D, Tang Z, Meng L, Smith JE, Tan W. *ChemMedChem*, 2008, 3: 991–1001
76 Sefah K, Tang ZW, Shangguan DH, Chen H, Lopez-Colon D, Li Y, Parekh P, Martin J, Meng L, Phillips JA, Kim YM, Tan WH. *Leukemia*, 2009, 23: 235–244
77 Majumdar A, Patel DJ. *Acc Chem Res*, 2002, 35: 1–11
78 Burge S, Parkinson GN, Hazel P, Todd AK, Neidle S. *Nucl Acids Res*, 2006, 34: 5402–5415
79 Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ. *Nature*, 1992, 355: 564–566
80 Padmanabhan K, Padmanabhan KP, Ferrara JD, Sadler JE, Tulinsky A. *J Biol Chem,* 1993, 268: 17651–17654
81 Huang H, Suslov NB, Li NS, Shelke SA, Evans ME, Koldobskaya Y, Rice PA, Piccirilli JA. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 686–691
82 Mukundan VT, Phan AT. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 5017–5028
83 Tran PL, De Cian A, Gros J, Moriyama R, Mergny JL. *Top Curr Chem,* 2013, 330: 243–273
84 Malgowska M, Gudanis D, Kierzek R, Wyszko E, Gabelica V, Gdaniec Z. *Nucl Acids Res*, 2014, 42: 10196–10207
85 Li X, Zheng K, Zhang J, Liu H, He Y, Yuan B, Hao Y, Tan Z. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 14581–14586
86 Wei D, Todd AK, Zloh M, Gunaratnam M, Parkinson GN, Neidle S. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 19319–19329
87 Sissi C, Gatto B, Palumbo M. *Biochimie*, 2011, 93: 1219–1230
88 Tucker WO, Shum KT, Tanner JA. *Curr Pharm Des*, 2012, 18: 2014–2026
89 Dai J, Carver M, Yang D. *Biochimie*, 2008, 90: 1172–1183
90 Wieland M, Hartig JS. *Chem Biol*, 2007, 14: 757–763
91 Mullen MA, Olson KJ, Dallaire P, Major F, Assmann SM, Bevilacqua PC. *Nucl Acids Res*, 2010, 38: 8149–8163
92 Arthanari H, Bolton PH. *Chem Biol*, 2001, 8: 221–230
93 Smith JS, Chen Q, Yatsunyk LA, Nicoludis JM, Garcia MS, Kranaster R, Balasubramanian S, Monchaud D, Teulade-Fichou MP, Abramowitz L, Schultz DC, Johnson FB. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18: 478–485
94 Johnson JE, Smith JS, Kozak ML, Johnson FB. *Biochimie*, 2008, 90: 1250–1263
95 Bates PJ, Laber DA, Miller DM, Thomas SD, Trent JO. *Exp Mol Pathol*, 2009, 86: 151–164
96 Huppert JL. *Philos Trans R Soc A*, 2007, 365: 2969–2984
97 Babendure JR, Adams SR, Tsien RY. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 14716–14717
98 Poolsup S, Kim CY. *Curr Opin Biotech*, 2017, 48: 180–186
99 Keefe AD, Pai S, Ellington A. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 537–550
100 Nimjee SM, Rusconi CP, Sullenger BA. *Annu Rev Med*, 2005, 56: 555–583

101 01 Kohn DB, Bauer G, Rice CR, Rothschild JC, Carbonaro DA, Valdez P, Hao Q, Zhou C, Bahner I, Kearns K, Brody K, Fox S, Haden E, Wilson K, Salata C, Dolan C, Wetter C, Aguilar-Cordova E, Church J. *Blood,* 1999, 94: 368–371

102 DiGiusto DL, Krishnan A, Li L, Li H, Li S, Rao A, Mi S, Yam P, Stinson S, Kalos M, Alvarnas J, Lacey SF, Yee JK, Li M, Couture L, Hsu D, Forman SJ, Rossi JJ, Zaia JA. *Sci Translational Med*, 2010, 2: 36ra43

103 Unwalla HJ, Rossi JJ. *Virol J*, 2010, 7: 33

104 Chen CHB, Chernis GA, Hoang VQ, Landgraf R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 9226–9231

105 Dollins CM, Nair S, Boczkowski D, Lee J, Layzer JM, Gilboa E, Sullenger BA. *Chem Biol*, 2008, 15: 675–682

106 Pratico ED, Sullenger BA, Nair SK. *Nucl Acid Ther*, 2013, 23: 35–43

107 McNamara JO, Kolonias D, Pastor F, Mittler RS, Chen L, Giangrande PH, Sullenger B, Gilboa E. *J Clin Invest*, 2008, 118: 376–386

108 Soldevilla MM, Villanueva H, Bendandi M, Inoges S, López-Díaz de Cerio A, Pastor F. *Biomaterials*, 2015, 67: 274–285

109 Pastor F, Soldevilla MM, Villanueva H, Kolonias D, Inoges S, de Cerio AL, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y, Gilboa E, Bendandi M. *Mol Ther-Nucl Acids*, 2013, 2: e98

110 Ramaswamy V, Monsalve A, Sautina L, Segal MS, Dobson J, Allen JB. *Nucl Acid Ther*, 2015, 25: 227–234

111 Yunn NO, Koh A, Han S, Lim JH, Park S, Lee J, Kim E, Jang SK, Berggren PO, Ryu SH. *Nucl Acids Res*, 2015, 43: 7688–7701

112 Gilboa E, McNamara J, Pastor F. *Clin Cancer Res*, 2013, 19: 1054–1062

113 Zhou J, Rossi JJ. *Mol Ther-Nucl Acids*, 2014, 3: e169

114 Sundaram P, Kurniawan H, Byrne ME, Wower J. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 48: 259–271

115 Ng EWM, Shima DT, Calias P, Cunningham ET, Guyer DR, Adamis AP. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 123–132

116 Siddiqui MAA, Keating GM. *Drugs*, 2005, 65: 1571–1577; discussion 1578–1579

117 Mousa SA, Mousa SS. *Biodrugs*, 2010, 24: 183–194

118 Ferrara N, Adamis AP. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15: 385–403

119 Lincoff AM, Mehran R, Povsic TJ, Zelenkofske SL, Huang Z, Armstrong PW, Steg PG, Bode C, Cohen MG, Buller C, Laanmets P, Valgimigli M, Marandi T, Fridrich V, Cantor WJ, Merkely B, Lopez-Sendon J, Cornel JH, Kasprzak JD, Aschermann M, Guetta V, Morais J, Sinnaeve PR, Huber K, Stables R, Sellers MA, Borgman M, Glenn L, Levinson AI, Lopes RD, Hasselblad V, Becker RC, Alexander JH. *Lancet*, 2016, 387: 349–356

120 Verheugt FWA. *Lancet*, 2016, 387: 314–315

121 Griffin LC, Tidmarsh GF, Bock LC, Toole JJ, Leung LL. *Blood,* 1993, 81: 3271–3276

122 Tucker CE, Chen LS, Judkins MB, Farmer JA, Gill SC, Drolet DW. *J Chromatogr B-Biomed Sci Appl*, 1999, 732: 203–212

123 Drolet DW, Nelson J, Tucker CE, Zack PM, Nixon K, Bolin R, Judkins MB, Farmer JA, Wolf JL, Gill SC, Bendele RA. *Pharm Res*, 2000, 17: 1503–1510

124 Yan X, Gao X, Zhang Z. *Genom Proteom Bioinf*, 2004, 2: 32–42

125 Lebars I, Richard T, Di Primo C, Toulmé JJ. *Blood Cells Mol Dis*, 2007, 38: 204–209

126 Hernandez FJ, Stockdale KR, Huang L, Horswill AR, Behlke MA, McNamara JO Ii. *Nucl Acid Ther*, 2012, 22: 58–68

127 Thiviyanathan V, Somasunderam AD, Gorenstein DG. *Biochm Soc Trans*, 2007, 35: 50–52

128 Volk DE, Yang X, Fennewald SM, King DJ, Bassett SE, Venkitachalam S, Herzog N, Luxon BA, Gorenstein DG. *Bioorg Chem*, 2002, 30: 396–419

129 Maasch C, Buchner K, Eulberg D, Vonhoff S, Klussmann S. *Nucl Acids Symposium Ser*, 2008, 52: 61–62

130 Jäger S, Rasched G, Kornreich-Leshem H, Engeser M, Thum O, Famulok M. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 15071–15082

131 Hirao I, Kimoto M, Mitsui T, Fujiwara T, Kawai R, Sato A, Harada Y, Yokoyama S. *Nat Methods*, 2006, 3: 729–735

132 Ruckman J, Green LS, Beeson J, Waugh S, Gillette WL, Henninger DD, Claesson-Welsh L, Janjic N. *J Biol Chem*, 1998, 273: 20556–20567

133 Burmeister PE, Lewis SD, Silva RF, Preiss JR, Horwitz LR, Pendergrast PS, McCauley TG, Kurz JC, Epstein DM, Wilson C, Keefe AD. *Chem Biol*, 2005, 12: 25–33

134 Kuwahara M, Obika S. *Artif DNA-PNA XNA*, 2013, 4: 39–48

135 Veedu RN, Wengel J. *Mol Biosyst*, 2009, 5: 787–792

136 Lee Y, Urban JH, Xu L, Sullenger BA, Lee J. *Nucl Acid Ther*, 2016, 26: 173–182

137 Guo P. *Nat Nanotech*, 2010, 5: 833–842

138 Rusconi CP, Roberts JD, Pitoc GA, Nimjee SM, White RR, Quick G, Scardino E, Fay WP, Sullenger BA. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 1423–1428

139 Lee CH, Lee SH, Kim JH, Noh YH, Noh GJ, Lee SW. *Mol Ther-Nucl Acids*, 2015, 4: e254

140 Dougan H, Lyster DM, Vo CV, Stafford A, Weitz JI, Hobbs JB. *Nucl Med Biol*, 2000, 27: 289–297

141 Heo K, Min SW, Sung HJ, Kim HG, Kim HJ, Kim YH, Choi BK, Han S, Chung S, Lee ES, Chung J, Kim IH. *J Control Release*, 2016, 229: 1–9

142 Kim Y, Dennis DM, Morey T, Yang L, Tan W. *Chem Asian J*, 2010, 5: 56–59

143 Soule EE, Bompiani KM, Woodruff RS, Sullenger BA. *Nucl Acid Ther*, 2016, 26: 1–9

144 Morita Y, Kamal M, Kang SA, Zhang R, Lokesh GL, Thiviyanathan V, Hasan N, Woo S, Zhao D, Leslie M, Suh S, Razaq W, Rui H, Gorenstein DG, Volk DE, Tanaka T. *Mol Ther-Nucl Acids*, 2016, 5: e399

145 Geary RS, Yu RZ, Watanabe T, Henry SP, Hardee GE, Chappell A, Matson J, Sasmor H, Cummins L, Levin AA. *Drug Metabol Disposit*, 2003, 31: 1419–1428

146 Farman CA, Kornbrust DJ. *Toxicol Pathol*, 2003, 31: 119–122

147 Goebl N, Berridge B, Wroblewski VJ, Brown-Augsburger PL. *Toxicol Pathol*, 2007, 35: 541–548

148 Kang SA, Tsolmon B, Mann AP, Zheng W, Zhao L, Zhao YD, Volk DE, Lokesh GLR, Morris L, Gupta V, Razaq W, Rui H, Suh KS, Gorenstein DG, Tanaka T. *Toxicol Appl Pharm*, 2015, 287: 86–92

149 Akdim F, Stroes ESG, Sijbrands EJG, Tribble DL, Trip MD, Jukema JW, Flaim JAD, Su J, Yu R, Baker BF, Wedel MK, Kastelein JJP. *J Am College Cardiol*, 2010, 55: 1611–1618

150 Goel S, Desai K, Macapinlac M, Wadler S, Goldberg G, Fields A, Einstein M, Volterra F, Wong B, Martin R, Mani S. *Invest New Drugs*, 2006, 24: 125–134

151 Swayze EE, Siwkowski AM, Wancewicz EV, Migawa MT, Wyrzykiewicz TK, Hung G, Monia BP, Bennett CF. *Nucl Acids Res*, 2007, 35: 687–700

152 Ganson NJ, Povsic TJ, Sullenger BA, Alexander JH, Zelenkofske SL, Sailstad JM, Rusconi CP, Hershfield MS. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 137: 1610–1613.e7

153 Waring MJ. *Expert Opin Drug Discov*, 2010, 5: 235–248

154 Cerchia L, Esposito CL, Camorani S, Catuogno S, Franciscis V. *Pharmaceuticals*, 2011, 4: 1434–1449

155 Avci-Adali M, Steinle H, Michel T, Schlensak C, Wendel HP. *PLoS One*, 2013, 8: e68810

156 Weber C, Müller C, Podszuweit A, Montino C, Vollmer J, Forsbach A. *Immunology*, 2012, 136: 64–77

157 Foy JWD, Rittenhouse K, Modi M, Patel M. *J Ocular Pharm Ther*, 2007, 23: 452–466

158 Lin H, Zhang W, Jia S, Guan Z, Yang CJ, Zhu Z. *Biomicrofluidics*, 2014, 8: 041501

Aptamer and aptamer pharmaceuticals

Ting Zheng, Ziyue Ma, Quan Du*

School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China
**Correspoding author (email: quan.du@pku.edu.cn)*

Abstract: Recently, molecule-based targeted therapy has achieved remarkable success in clinical, and opened up a new era particulraly in the field of cancer therapy. Monoclonal antibodies and small molecule inhibitors are two pillars of this field. Additionally, a single-strand nucleic acid molecule called "chemical antibody" has also attracted increasing attention. These novel targeting agents are called "nucleic acid aptamers (aptamers)". With high specificity and affinity for a variety of target molecules, nucleic acid aptamers represent a new direction in the gene targeting therapy. In this review, we summarizes the recent development of aptamers and their druggability.

Keywords: aptamers, aptamer pharmaceuticals, SELEX, druggability

doi: 10.1360/N032018-00158