

与细胞因子特异结合的寡聚核苷酸适配子 及其在诊断和治疗中的应用

严馨蕊 高绪文* * 张智清*

(中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所病毒基因工程国家重点实验室 北京 100052)

摘 要 寡聚核苷酸适配子(Aptamer)是用指数富集式配基系统进化方法(SELEX)筛选出的寡聚核苷酸,它能与靶分子特异性结合,具有识别和抑制靶物质生物学活性的作用。将体外筛选到的寡聚核苷酸适配子作为在动物或人体内应用的药剂,还需要进行化学修饰来提高它的生物利用度和在血浆中的稳定性。2-氟、2'-烷氧基或 2'-氨基修饰可以提高适配子的稳定性,使适配子的体外半衰期延长。5'端交联一个高分子量的 PEG 分子或脂质体分子,可以使它的热清除率由 1 小时提高到几小时至 1 天。修饰后仍保持生物学活性的适配子可用于治疗相应靶细胞因子引起的疾病。目前,国内外已经筛选到了十几种细胞因子的适配子,其中血管内皮生长因子已经用于临床疾病的治疗。除了用于临床治疗外,适配子还可以用于细胞因子的诊断,凡是涉及抗体的诊断领域,几乎都可以用寡聚核苷酸适配子代替。应用大规模机械化筛选技术,可以在短期内筛选到大量的高特异性、高亲和力适配子,这将有力推动临床诊断和治疗的发展。

关键词 SELEX, Aptamer, 细胞因子, 血管内皮生长因子, 寡聚核苷酸

中图分类号 Q75 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)04-0627-06

指数富集式配基系统进化(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX)技术是通过多轮的选择和扩增过程(PCR 或 RT-PCR),从随机寡聚核苷酸库中筛选特异性适配子(Aptamer)的组合化学技术,具有靶分子范围广、筛选出的配体亲和力和特异性高等特点。Tuerk 和 Gold 于 1990 年创立了基本的 SELEX 方法^[1],筛选出了特异性结合 T4 DNA 聚合酶的寡聚核苷酸适配子。他们把靶分子与寡聚核苷酸库混合,通过硝酸纤维素滤膜分离,未结合靶分子的寡聚核苷酸被滤过,然后用洗脱液将结合于膜上的靶分子与寡聚核苷酸复合物洗脱下来,PCR 扩增后进行下一轮筛选。经过多轮筛选富集,获得可与靶分子高亲和力结合的寡聚核苷酸。此后,科研工作者们在各个领域采用此技术进行了广泛的探索和运用。Gold 和 Singer 等又创造性地发挥此技术,建立了基因组筛选技术^[2],将筛选形式从单靶物质筛选扩展到多靶物质筛选,为生物界、生物化学界、医学界提供了高效、快速的检测手段和治疗方法。本文结合本实验室的有关工作,综述了细胞因子适配子在诊断和治疗中的应用。

1 细胞因子的寡聚核苷酸适配子

细胞因子是机体细胞合成和分泌的小分子多肽类因子,它能调节机体的生理功能,参与各种细胞的增殖、分化和凋亡。细胞因子在某些病理情况下参与自身免疫病、肿瘤、移植排斥、休克等疾病的发生。目前已通过 SELEX 技术筛选到与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血小板来源的生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)、L-选择素(L-selectin)、角化细胞生长因子(keratinocyte growth factor)、干扰素- γ (interferon- γ)等细胞因子特异结合的适配子。筛选到的适配子可以与靶分子特异性结合,用于靶分子的诊断,部分适配子可以通过与靶分子结合而拮抗其功能,并开发成具有重要药理作用的药物。

1.1 细胞因子寡聚核苷酸适配子的特点

寡聚核苷酸适配子对靶物质的识别具有高亲和力。寡聚核苷酸作为拮抗剂时解离常数为 50 pmol/L ~ 10 nmol/L,与细胞因子与受体结合常数基本相同,所以寡聚核苷酸可以与

收稿日期 2003-12-02, 修回日期 2004-02-10。

基金项目 国家高技术 863 计划基金资助(No. 2001AA215251)。

* 通讯作者。Tel: 86-10-63519655; Fax: 86-10-63519655; E-mail: zhangzq@public3.bta.net.cn

* * 为中国农业大学代培的硕士研究生。

受体竞争结合靶分子细胞因子,抑制细胞因子与其受体的结合,从而抑制该因子的生物学功能。

适配子是应用大容量的随机寡聚核苷酸库与靶分子相互作用,经过多轮筛选富集产生,对靶物质的结合具有高特异性。核苷酸、氨基酸的寡聚核苷酸适配子能将它们与突变体、镜像体区分开来。适配子甚至能够分辨出靶分子结构上 1 个甲基或 1 个羟基的差别,如茶碱特异性 RNA 适配子对茶碱的亲和力比对咖啡因(与茶碱仅差一个甲基)高 10 000 倍^[3]。

Jellinek 等筛选出了一个结合 bFGF 肝素结合位点的适配子,这个适配子与 bFGF 高特异性结合,而与家族中的其它成员 aFGF、FGF-4、FGF-5、FGF-6 和 FGF-7 没有非特异性地结合^[4]。因为寡聚核苷酸适配子和肝素一样是聚阴离子体,所以人们估计它可能对蛋白上的肝素结合位点有特异性。因此又研究了这个适配子与其它 4 个肝素结合蛋白:VEGF、PDGF、抗凝血酶Ⅲ(anti-thrombin Ⅲ)、凝血酶(thrombin)的亲性和性,发现这个适配子与其它肝素结合蛋白都没有特异性结合。

VEGF 是特异性刺激血管内皮细胞增殖的一种细胞因子,由于不同的拼接导致 VEGF 基因编码 4 个同源物 VEGF₁₆₅、VEGF₁₂₁、VEGF₁₈₉ 和 VEGF₂₀₆^[5,6],Ruckman 等筛选获得了 VEGF₁₆₅ 的适配子,并将其命名为 NX1838。它能抑制血管内皮细胞增殖和 VEGF 诱导的血管通透性增加^[7]。研究表明,NX1838 只能特异性结合 VEGF₁₆₅,而与其它同源物的亲和力较低。进一步的研究发现,NX1838 能特异性地结合 VEGF₁₆₅ 的二聚体。胎盘生长因子(placenta growth factor,PIGF)与 VEGF₁₆₅ 有 53% 的同源性,结果显示 NX1838 与 PIGF 无特异性结合。而且,NX 1838 与 VEGF 同源二聚体的亲和性比与 VEGF/PIGF 异源二聚体要高十倍^[7,8]。

寡聚核苷酸适配子的筛选周期很短,一般只需要 8~15 个循环,约 2~3 个月,而制备单克隆抗体至少需要 3~6 个月。寡聚核苷酸适配子是通过多轮重复筛选产生的,其筛选过程可以自动化。Drolet 等建立了用于蛋白质适配子筛选的自动化系统,他将蛋白质通过疏水作用吸附到微孔板上,通过机械化操作进行八轮筛选,筛到的 PDGF 和 Selectin 适配子与靶蛋白的结合常数达到 3×10^{-10} mol/L^[9]。

1.2 寡聚核苷酸适配子的修饰

对寡聚核苷酸适配子进行化学修饰,可以提高它的稳定性,增加它的生物利用度,使其更易于检测。这些修饰包括核酸骨架的修饰、大分子的偶联、荧光染料或放射性核素的标记等。

寡聚核苷酸适配子很容易被体液和细胞中丰富的核酸酶降解,进行化学修饰可以提高它的稳定性。体液中含量最多的是嘧啶特异的核酸内切酶,所以嘧啶核苷酸糖环的 2-氟、或 2'-氨基修饰是最常见的,另外还可以进行嘌呤核苷酸的 2'-烷氧基修饰。在血浆中,未经修饰的 RNA 适配子的半衰期是几秒钟,将核糖的五碳环上的第二位进行化学修饰,即 2-氟、2'-烷氧基或 2'-氨基修饰可以使适配子的体外半衰

期延长到 5~15h^[10,11]。2'-氟、2'-氨基修饰的 CTP 和 UTP 很容易通过体外转录掺入 RNA 分子,也可以在体外筛选时,掺入随机库中^[8]。即使在筛选前对库中的寡聚核苷酸做了修饰,筛选后也要进一步修饰以提高其稳定性。对嘌呤核苷酸的 2'-烷氧基修饰或在适配子的 3'端加上帽子,都可以使其免受核酸酶降解。筛选后修饰是一个经验过程,所以每次修饰完,都要重新检测它的亲和力和生物学活性^[11]。

Tucker 等从 2'氟修饰的库中筛选到了与 VEGF 特异结合的 RNA 适配子,在不改变其亲和力和生物学活性的基础上将其截短为 27 个碱基,并且对所有嘧啶核糖的第二位碱基进行氟修饰,对嘌呤核糖的第二位碱基进行烷氧基修饰。修饰后的适配子 NX1838 的稳定性大幅度提高,在人血浆中孵育 18h,或在 -20℃ 存放 2 个月后仍然保持其活性^[12]。对 bFGF 的适配子 2'氨基修饰后,在人血清中两日内仍极少降解,比未修饰的适配子的稳定性提高了 1 000 倍。修饰后的适配子仍保持其生物学活性,在 1nmol/L 的浓度下抑制 bFGF 与细胞表面受体的结合^[4]。Pagratis 等比较了用 2'-氟和 2'-氨基修饰的文库筛选的人角化细胞生长因子适配子的特性。2'-氟修饰的 RNA 适配子比 2'-氨基修饰的适配子表现出更高的亲和力^[13]。人们在筛选干扰素-γ 适配子时,将两种修饰的核苷酸加入到一个库中发现,这不但提高了核酸的稳定性还增加了筛选文库的多样性^[14]。

对适配子的修饰提高了它的稳定性,但是 25~40 个碱基的寡聚核苷酸的分子量只有 8~13kD,由于分子量小,适配子的肾脏清除率只有几分钟,生物利用度很低。位点特异性地加入 PEG 或其他疏水基团,或把适配子吸附在脂质表面,可以增加其有效的分子大小,提高它的生物利用度^[13]。Tucker 等在修饰后的 NX1838 的 5'端交联了一个分子量为 40kD 的 PEG 分子,使它的血浆清除率由 1h 提高到 6~8h。Willis 等将另一个 VEGF 适配子 5'端与 DAG(二羟甘油)相连,亲脂性的 DAG 插入到脂质体的磷脂双分子。修饰后的适配子的血浆清除率延长而且保持了生物学活性,能抑制血管上皮细胞增殖和 VEGF 诱导的血管通透性增加^[15]。

Watson 等在重度联合免疫缺陷症的小鼠模型上对 L 选择素的适配子进行了研究。L 选择素的适配子 5'端交联了一个分子量为 40kD 的 PEG 分子后,其分子量增加到 50kD,使其血浆清除率明显降低,在注射 10h 后仍能与淋巴细胞的 L 选择素结合,抑制白细胞在毛细血管壁的粘附及白细胞的渗出^[16]。对 PEG 修饰的适配子的药代动力学分析表明,血浆清除率降低是生理学活性得以发挥的重要决定因素。目前的修饰物主要是 PEG 和脂质体,其它修饰物还有待进一步开发。

为了增加适配子的功能,提高它在临床诊断和治疗中的应用,可以进行广泛的位点特异性修饰以提供报告分子和效应分子。寡聚核苷酸适配子可以被荧光染料、放射性同位素、生物素标记,它还可以与放射性核苷酸、细胞毒素和其他毒物相连。修饰后的寡聚核苷酸适配子保持原有的生物学活性,在 HNE 的适配子的 5'端或 3'端偶联荧光素后可用流

式细胞仪进行检测 ,其结果与相应抗体的检测结果相当。这说明偶联荧光素后并未影响适配子的结合活性。Fang 等已经成功的应用荧光素标记的 PDGF 适配子 ,高通量地检测肿瘤细胞表面的变异的肿瘤相关蛋白^[17]。将 5-Bromo- dUTP 代替 TTP 经 PCR 产生 BrdU 修饰随机文库 ,在 308nm 的激光照射下 ,含 BrdU 的适配子与靶蛋白中的芳香族或含硫氨基酸残基之间形成共价结合。这种共价结合对两者构象之间的严格要求增加了适配子筛选的特异性^[18]。光交联-SELEX 技术已经应用于一种高通量的用于临床诊断的“ 适配子芯片”^[19,20]。

2 细胞因子适配子在治疗中的应用

在细胞因子表达量过高或应用大剂量细胞因子进行治疗的情况下 ,可能对机体产生不良的作用 ,例如发热、炎症性组织损伤、自身免疫病、变态反应、血管渗漏综合征、恶液质、刺激肿瘤细胞增殖等。应用细胞因子拮抗剂可以治疗炎症性细胞因子水平升高引起的疾病。目前 ,细胞因子抑制剂的研究与开发已经取得了很大进展 ,已有一批细胞因子蛋白质拮抗剂 ,如人源化单抗或可溶性受体已被批准上市或进入临床 ,并且取得了很好的疗效^[21]。然而蛋白质药物也存在许多缺点 ,蛋白质的生产制备工艺复杂 ,成本昂贵 ,组织渗透性差 ,很难到达靶组织 ,血浆清除率很低 ,难以排泄 ,具有免疫原性 ,反复使用后会诱生抗体。

用 SELEX 方法筛选的寡聚核苷酸适配子克服了以上蛋白质药物的缺点。寡聚核苷酸拮抗剂由于分子量小 ,能快速到达靶组织 ,具有快速的血浆清除率 ,可以通过体外合成获得 ,易于生产和纯化 ,不含其它蛋白和抗原 ,不引起人体的免疫反应 ,可以反复使用。第一个成功的例子是针对 VEGF₁₆₅ 的寡聚核苷酸适配子 ,已进入二期临床实验 ,用于治疗老年性视网膜变性所致的失明^[22]。P-选择素^[23]、L-选择素^[16]和血小板源性生长因子^[24,25]的适配子也已应用于动物疾病模型的治疗。实验结果表明 ,这些适配子拮抗剂在体内都具有很好的生物学活性。

在伤口愈合、糖尿病视网膜病变、肿瘤等病理状态下 ,大量的 VEGF 可以刺激血管内皮细胞增生 ,增加血管通透性 ,对机体产生不良影响 ,因此 ,VEGF 的寡聚核苷酸适配子将在以上疾病的治疗中发挥重要的作用。Huang 等用 Wilms 瘤细胞注射裸鼠 ,诱导肿瘤动物模型。1 周后开始用 NX 1838 进行治疗 ,治疗持续 5 周 ,治疗组与未经治疗的对照组相比肿瘤的重量减少了 84%。实验结果表明 ,VEGF₁₆₅ 的寡核苷酸适配子能抑制肿瘤早期的生长^[26]。Ostendorf 等给实验性膜增生性肾小球肾炎大鼠注射 NX 1838 后 ,VEGF₁₆₅ 介导的内皮细胞的增生与对照组相比减弱 ,而 NX 1838 对正常的肾小球内皮细胞没有影响 ,说明 NX 1838 只对 VEGF 增多的病理组织有作用 ,对正常组织没有毒副作用^[27]。

Tucker 等研究了 NX 1838 在猕猴体内的药代动力学性质 ,将 NX 1838 以 1mg/mL 的剂量对猕猴进行静脉注射 ,测得最大血浆浓度为 25.5mg/mL ,它的水浆半衰期为 9.3h ,肾脏

清除率为 6.2 mL/h。皮下注射给药时 ,在 8 ~ 12h 其血浆浓度达最大值 4.9mg/mL^[12]。随后 Drolet 等又研究了 NX 1838 注射到猕猴的玻璃体后的药代动力学指数和安全性。以每只眼 0.25 ,0.50 ,1.0 ,1.5 或 2.0 mg 的剂量注射到猕猴的玻璃体 ,在随后的 3 个月中对药代动力学指数和安全性进行评估。结果显示由 NX 1838 玻璃体注射后再入血的半衰期达到 94h ,在注射的 28d 后仍具有活性 ,注射后未见毒副作用和抗核酸抗体产生。这些数据表明 ,可用 1 ~ 2mg/kg 的剂量进行一个月的玻璃体给药 ,对人进行临床治疗^[28]。

2001 年 ,NX 1838 进入了一期临床 ,用于治疗老年性视网膜变性继发的血管增生 ,15 名病人用药 3 个月后 ,80% 的病人视力得到不同程度的恢复 ,没有任何毒副作用发生^[29]。2003 年 ,NX 1838 用于二期临床研究 ,病人用药 3 个月后 ,取得了同样令人满意的结果^[22]。下一步将对 NX 1838 的治疗作用和长期应用的安全性进行更深入的研究。

David Parma 等将 L 选择素的适配子进行 2' 氟修饰后偶联 40kD 的 PEG 分子 ,用于治疗患严重免疫缺陷的小鼠。实验结果表明适配子能抑制白细胞的移动 ,从而阻止其粘附于毛细血管壁而向外周淋巴结转移。当用药剂量为 5.4nmol/kg 体重时 ,它的药效持续时间为 11.2h^[16]。

Ostendorf 等用 PDGF 蛋白 B 链的适配子治疗实验性血管球肾炎大鼠取得了很好的疗效。诱导大鼠病变后的第 3 天到第 7 天开始治疗 ,100d 后检测病变的各种指标。治疗组与对照组相比 ,肾实质增生减弱 ,细胞间隙Ⅲ和Ⅳ型胶原的含量明显减少 ,肾脏的斑痕形成被抑制^[25]。

人们还研究了其它 VEGF 适配子对新生儿持续性的肺部血管高压和糖尿病引起的视网膜病变的治疗作用^[30,31]。此外 ,血小板源性生长因子、选择素和成纤维细胞生长因子的适配子也用于治疗相应的靶分子引起的疾病。NX 1838 在临床治疗中的成功应用将为其它寡聚核苷酸拮抗剂的临床应用提供宝贵的经验。

除了功效、药代动力学性质和安全性外 ,合成 RNA 的费用也是 RNA 适配子能否大量应用于临床治疗的焦点问题。一个体重 70kg 的成人 ,每次治疗的有效剂量应该是 70 ~ 140mg。而目前 35 个碱基修饰的适配子合成价钱约为每克 2000 美元 ,每剂药的价钱是 140 ~ 280 美元。对一些急性病 ,例如 :器官移植、心肌梗死、中毒性或脓毒血症性休克、血管成形术和肺栓塞需要治疗 3 ~ 15d ,要花费 700 ~ 1400 美元 ,与治疗性单抗花费相当。而且有几种方案可以减少花费 ,首先 ,利用 PASS(Product Anchored Sequential Synthesis)系统可以有效地合成 RNA 适配子 ,费用可以降到原来的十分之一 ,即每克 200 美元。其次 ,药代动力学研究刚刚开始 ,任何提高药物半衰期的方案都能减少药物用量 ,从而降低费用 ,这有待于新的偶联物、新型脂质体和新的药物载体的开发。随着高通量适配子筛选技术的成熟 ,很快将有大量的细胞因子适配子问世 ,作为细胞因子拮抗剂 ,他们将在细胞因子引起的疾病的治疗中发挥重要的作用。

3 细胞因子寡聚核苷酸适配子在诊断中的应用

诊断学正面临着革命,近两年人类基因组计划顺利进行,大量基因的确认,需要新的检测方法,这是推动诊断学发展的直接动力。而以寡聚核苷酸适配子为检测试剂的方法正适应了需要。大规模机械化筛选技术的建立,可以在短期内筛选到大量的适配子。在 SELEX 技术建立的十几年期间,已经筛选出大量的适配子并开展了应用于临床诊断的研究。与抗体相比,寡聚核苷酸适配子作用的靶分子范围更广,结合能力更强,其解离常数(K_d)多在 $\text{pmol/L} \sim \text{nmol/L}$ 之间,甚至强于天然配基;与靶分子结合的特异性更强,筛选周期更短,并且其筛选过程可以自动化,比抗体的分子小,方便体内影像诊断和治疗,如接上硫代磷酸,可用于细胞内诊断和治疗,适配子变性与复性可逆且速度快,可反复使用、长期保存和室温运输。因此,凡是涉及抗体的诊断领域,几乎都可以用寡聚核苷酸适配子代替。

双抗体夹心法是目前最常用检测血液、尿、唾液和其他体液中的蛋白质的诊断模式。将捕捉抗体与固相载体结合,然后加入待检样品混合物,以另一个抗体为检测抗体与待测抗原结合,加入酶或者荧光标记的抗体孵育,然后加入底物进行检测。Drolet 等建立了一个用寡聚核苷酸适配子检测 VEGF 的方法。用 VEGF 的单克隆抗体包被酶标板,然后加入待检混合物,以荧光素标记的适配子进行检测,这种方法的敏感度为 0.1 ng/mL ^[32]。Philippe Bridonneau 等用 ELISA 间接法检测了经过 HPLC 离子交换层析纯化的 VEGF 适配子 NX-0121,并且取得了很好的效果。首先包被 VEGF,然后加入纯化后的生物素标记的适配子 NX-0121,再加入碱性磷酸酶标记的亲合素与其结合,最后加入化学发光底物,孵育 20min 后检测其发光水平,通过标准曲线计算所检测的适配子的量^[33]。适配子与单克隆抗体一样,可以作为捕捉分子或检测分子,但适配子尚不能同时发挥捕捉和检测两方面的作用,原因是它们竞争结合配体(抗原)的相同部位。可以用特异结合靶分子两个不同表位(非重叠位点)的适配子,通过改变筛选条件和方法或核酸库的类型(RNA/DNA)或通过进一步筛选配基-靶复合物来得到第二个不同的适配子。因为寡聚核苷酸适配子与靶分子具有更高的亲和力和特异性,所以它更适合用于单克隆抗体难以区分的结构类似物或交叉抗原的鉴别诊断。

应用 5-Bromo 修饰的 ssDNA 适配子可以应用于高特异性的检测。Golden 等用光交联-SELEX 技术筛选出 bFGF 的两个 5-Bromo 修饰的 ssDNA 适配子,在 308nm 的光照射下,含 BrdU 的适配子与靶蛋白中的芳香族或含硫氨基酸残基之间形成共价结合,这种共价结合对两者构象之间的严格要求增加了适配子筛选的特异性。分离到的 bFGF 的 K_d 值可达 16 pmol/L ,检测灵敏度达 58 pg/mL ^[18]。将 5-Iodo 或 5-Bromo 稀释适配子固定在芯片上,与标本共同孵育后,经洗去非特异性结合的检测物后进行光交联,使适配子与特异性的蛋白共

价结合,再用比较严格的条件洗去非特异性结合的蛋白,从而完成高特异性、高通量的检测^[19,20]。

传统的流式细胞术应用不同颜色荧光标记的单克隆抗体来检测细胞或微球颗粒上的靶蛋白。流式细胞仪可以很好地分辨这些信号,可以同时用于多项诊断试验。寡聚核苷酸适配子可以代替单抗用于流式细胞术,检测细胞表面相应靶蛋白。

Fang 等用荧光基团标记 PDGF 的适配子,实时监控适配子与 PDGF 的结合。标记的适配子与 PDGF 结合后由于复合物的分子量增加,荧光基团的旋转变慢,导致各向异性。我们可以根据荧光各向异性的改变来检测适配子与靶物质的结合。这种检测方法具有高选择性和超敏感性,可以检测到 1 nmol 的 PDGF。它将广泛用于实时监测靶分子与适配子的结合及癌症的诊断^[34]。2003 年 Fang 等成功地应用荧光素标记的 PDGF 适配子,高通量地检测肿瘤细胞表面的变异的肿瘤相关蛋白,这是诊断学的一个重大进展。

过去的 30 年间,抗体在诊断实验中是首选的工具。适配子的亲和力和特异性与抗体相似,将有力推动未来的诊断试验,其应用已取得令人鼓舞的成果。尽管适配子的研究尚未成熟,但其进展很快,随着 SELEX 过程的自动化,会有大量的高特异性适配子问世,将在实验诊断中发挥巨大作用。但适配子不可能解决分子识别所需的全部问题,它能补充抗体检测的不足,不一定要代替已经成熟的抗体试验,两者一起发展会解决诊断实验中尚未解决的问题。

4 总结和展望

细胞因子在体内发挥着重要的免疫调节作用,当患有类风湿性关节炎、败血症休克、全身性红斑狼疮以及某些肿瘤疾病时,体液中某些细胞因子的水平有不同程度的升高,在许多情况下与病程和病情相平行,如类风湿性关节炎的滑膜液中,可以发现 IL-1、IL-6、IL-8 水平明显升高,这些细胞因子均可以促进炎症过程,使病情加重。因此,检测血清、血浆及其它体液中相应细胞因子水平,不仅可以辅助临床某些疾病的诊断,也可以对病情、预后及疗效进行评估。适配子能与细胞因子特异性结合,进而拮抗其生物学作用,不但可以诊断而且可以治疗这类由细胞因子水平升高引起的炎症性疾病。近十年来,已经运用 SELEX 技术成功地筛选出十余种细胞因子的寡聚核苷酸适配子。其中,VEGF 的适配子已经在疾病的诊断和治疗方面发挥了重要的作用,并为其它细胞因子适配子的研究和开发奠定了基础。我们可以筛选和鉴定其他细胞因子的寡聚核苷酸适配子,并对其生物学作用以及在临床诊断和治疗中的应用进行研究,以期开发出细胞因子拮抗药物,用于相应疾病的治疗。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands By exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, **249** (4968): 505 - 510
- © 中国科技微生物研究所期刊编辑部 Interactions of *Escherichia coli*

- RNA with bacteriophage MS2 coat protein : genomic SELEX. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(21):E93
- [3] Jenison RD, Gill SC, Barry P *et al.* High resolution molecular discrimination by RNA. *Science*, 1994, **263**:1425 – 1429
- [4] Jellinek D, Green LS, Bell C *et al.* Potent 2'-amino-2'-deoxypyrimidine RNA inhibitors of basic fibroblast growth factor. *Biochemistry*, 1995, **34**(36):11363 – 11372
- [5] Ferrara N, Winer J, Burton T *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor does not promote transformation but confers a growth advantage *in vivo* to Chinese hamster ovary cells. *J Clin Invest*, 1993, **91**(1):160 – 170
- [6] Tischer E, Mitchell R, Hartman T *et al.* The human gene for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 1991, **266**(18):11947 – 11954
- [7] Ruckman J, Green LS. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF₁₆₅). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *Biol Chem*, 1998, **273**(32):20556 – 20567
- [8] Balasubramaniam V, Le Cras TD, Ivy DD *et al.* Role of platelet-derived growth factor in vascular remodeling during pulmonary hypertension in the ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, **284**(5):L826 – 833 R
- [9] Drolet DW, Jenison RD, Smith DE *et al.* A high throughput platform for systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). *Comb Chem High Throughput Screen*, 1999, **2**(5):271 – 278
- [10] Pieken WA, Olsen DB, Benseler F *et al.* Kinetic characterization of ribonuclease-resistant 2'-modified hammerhead ribozymes. *Science*, 1991, **253**(5017):314 – 317
- [11] Beigelman L, McSwiggen JA, Draper KG *et al.* Chemical modification of hammerhead ribozymes. Catalytic activity and nuclease resistance. *J Biol Chem*, 1995, **270**(43):25702 – 25708
- [12] Tucker CE, Chen LS. Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide-aptamer (NX1838) in rhesus monkeys. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999, **733**(1):203 – 212
- [13] Pagratis NC, Bell C, Chang YF *et al.* Potent 2'-amino-, and 2'-fluoro-2'-deoxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**(1):68 – 73
- [14] Lee PP, Ramanathan M, Hunt CA *et al.* An oligonucleotide blocks interferon-gamma signal transduction. *Transplantation*, 1996, **62**(9):1297 – 1301
- [15] Willis MC, Collins BD, Zhang T *et al.* Liposome-anchored vascular endothelial growth factor aptamers. *Bioconjug Chem*, 1998, **9**(5):573 – 582
- [16] Watson SR, Chang YF, O 'Connell D *et al.* Anti-L-selectin aptamers : binding characteristics, pharmacokinetic parameters, and activity against an intravascular target *in vivo*. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2000, **10**(2):63 – 75
- [17] Fang X, Sen A, Vicens M *et al.* Synthetic DNA aptamers to detect protein molecular variants in a high-throughput fluorescence quenching assay. *ChemBiochem*, 2003, **4**(9):829 – 834
- [18] Golden MC, Collins BD, Willis MC *et al.* Diagnostic potential of photo SELEX-evolved ssDNA aptamers. *J Biotechnol*, 2000, **81**(2 – 3):167 – 178
- [19] Tavitian B. *In vivo* imaging with oligonucleotides for diagnosis and drug development. *Gut*, 2003, **52**(Suppl 4):IV40 – IV47
- [20] Brody EN, Willis MC, Smith J *et al.* The use of aptamers in large arrays for molecular diagnostics. *Mol Diagn*, 1999, **4**(4):381 – 388
- [21] Mease P. Psoriatic arthritis : the role of TNF inhibition and the effect of its inhibition with etanercept. *Expert Opin Pharmacother*, 2001, **2**(7):1137 – 1148
- [22] Eyetech Study Group. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration : phase II study results. *Ophthalmology*, 2003, **110**(5):979 – 986
- [23] Jenison RD, Jennings SD, Walker DW. Oligonucleotide inhibitors of P-selectin-dependent neutrophil-platelet adhesion. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 1998, **8**(4):265 – 279
- [24] Ostendorf T, Kunter U, van Roeyen C *et al.* The effects of platelet-derived growth factor antagonism in experimental glomerulonephritis are independent of the transforming growth factor-beta system. *J Am Soc Nephrol*, 2002, **13**(3):658 – 667
- [25] Ostendorf T, Kunter U, Grone HJ *et al.* Specific antagonism of PDGF prevents renal scarring in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 2001, **12**(5):909 – 918
- [26] Huang J, Moore J, Soffer S *et al.* Highly specific antiangiogenic therapy is effective in suppressing growth of experimental Wilms tumors. *J Pediatr Surg*, 2001, **36**(2):357 – 361
- [27] Ostendorf T, Kunter U, Eitner F *et al.* VEGF(165) mediates glomerular endothelial repair. *Clin Invest*, 1999, **104**(7):913 – 923
- [28] Drolet DW, Nelson J, Tucker CE *et al.* Pharmacokinetics and safety of an anti-vascular endothelial growth factor aptamer (NX1838) following injection into the vitreous humor of rhesus monkeys. *Pharm Res*, 2000, **17**(12):1503 – 1510
- [29] Eyetech Study Group. Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Retina*, 2002, **22**(2):143 – 152
- [30] Grover TR, Parker TA, Zenge JP *et al.* Intrauterine hypertension decreases lung VEGF expression and VEGF inhibition causes pulmonary hypertension in the ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, **284**(3):L508 – 517
- [31] Ishida S, Usui T, Yamashiro K *et al.* VEGF₁₆₄ is proinflammatory in the diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, **44**(5):2155 – 2162
- [32] Drolet DW, Moon-McDermott L, Ronig TS. An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nat Biotechnol*, 1996, **14**(8):1021 – 1025
- [33] Bridonneau P, Bunch S, Tengler R *et al.* Purification of a highly modified RNA-aptamer. Effect of complete denaturation during chromatography on product recovery and specific activity. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999, **726**(1 – 2):237 – 247
- [34] Fang X, Cao Z, Beck T *et al.* Molecular aptamer for real-time onco-protein platelet-derived growth factor monitoring by fluorescence anisotropy. *Anal Chem*, 2001, **73**(23):5752 – 5757

Cytokine Aptamers as Therapeutic and Diagnostic Agents

YAN Xin-Rui GAO Xu-Wen ZHANG Zhi-Qing*

(State Key Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering , Institute of Virology ,
China Center for Disease Control and Prevention , Beijing 100052 , China)

Abstract Aptamers are oligonucleotides derived from an *in vitro* evolution process called SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Aptamers specially binding to targets could recognize and inhibit the function of targets. Using this method , many powerful antagonists of cytokines have been found. In order for these antagonists to work in animal models of disease and in humans , it is necessary to modify the aptamers. First of all , 2'-F , 2'-NH₂ and 2'-CH₃O modifications of nucleoside triphosphates could prolong half-lives in blood. Aptamers can be kept in the circulation from hours to days by conjugating them to higher molecular weight vehicles. After modified , conjugated aptamers are injected into animals , they inhibit physiological functions known to be associated with their target cytokines. Exhibiting binding characteristics comparable to or even better than monoclonal antibodies , these ligands can be used as detection probes , highly efficient inhibitors of protein function or specific competitors in high-throughput screening (HTS) assays. Recently several aptamers of cytokines have been characterized. Some of them have been used as diagnostic agent for the detection of target cytokines. The first aptamer that has proceeded to phase II clinical studies is NX-1838 , an injectable angiogenesis inhibitor that can be potentially used to treat macular degeneration-induced blindness. Aptamers will be versatile tools that can greatly enhance the efficiency of modern diagnose and therapy development.

Key words SELEX , cytokine , aptamer , VEGF , RNA , oligonucleotide

Received : 12-02-2003

This work was supported by Grant from National Hi-Tech 863 Plan (No. 2001AA215251).

* Corresponding author. Tel : 86-10-63519655 ; Fax : 86-10-63519655 ; E-mail : Zhangzq@public3.bta.net.cn