



核酸适配体在分子医学中的应用*

张鑫娜^{1,2)} 黄智勇³⁾ 彭瑞资^{1,3)**}⁽¹⁾ 浙江省肿瘤医院, 浙江省核酸适配体与临床诊治重点实验室, 中国科学院基础医学与肿瘤研究所, 杭州 310022;⁽²⁾ 天津大学生命科学学院, 天津 300072; ⁽³⁾ 湖南大学化学化工学院, 长沙 410082)

摘要 分子医学着眼于从疾病的分子层面出发, 为个性化精准诊疗提供解决方案。然而, 在众多疾病的诊疗中由于缺乏有力的分子识别工具, 目前从分子水平上理解和研究疾病仍受到制约。核酸适配体是通过指数富集的配体系统进化 (SELEX) 技术在体外筛选得到的单链寡核苷酸, 具有高选择性、高亲和力、易细胞内化、良好的组织渗透和快速的组织积累能力。近年来, 由于其易合成、成本低、稳定性高且免疫原性低, 核酸适配体作为分子工具应用于疾病的诊疗一体化受到广泛关注。本综述围绕分子医学中的核酸适配体, 讨论了核酸适配体在疾病诊断中的应用, 包括基于核酸适配体的肿瘤标志物发现、液体活检、分子成像。介绍了核酸适配体在癌症治疗中的应用包括基于核酸适配体的抑制剂、核酸适配体药物偶联物、纳米药物和核酸适配体介导的免疫治疗。最后对核酸适配体在临床诊疗和产业化面临的问题进行了讨论, 包括基于应用场景的筛选方法、核酸适配体与靶标复合物结构、亲和力的机制以及核酸适配体在血液循环中的稳定性等方面。

关键词 核酸适配体, 分子医学, 诊断, 治疗**中图分类号** Q74**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0333

分子医学需要从疾病发生发展的分子基础出发, 发展出预测、诊断和治疗的个性化模式。作为生命体重要的遗传物质, 核酸在分子医学中起到重要功能, 与遗传、代谢、生物分子调控及生命体健康息息相关。天然核酸主要有脱氧核糖核酸 (DNA) 和核糖核酸 (RNA), DNA 双螺旋结构和中心法则的提出开启了分子生物学的时代。作为一类重要的功能核酸, 核酸适配体最初得名于能结合小分子有机染料的 RNA 片段, 取自拉丁文 “aptus” 与希腊单词 “meros”, 意为 “fit”^[1], 是 Ellington 和 Tuerk 两位科学家在 1990 年的《自然》和《科学》杂志上首次提出来的。它通过指数富集的配体系统进化 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 筛选获得^[2], 即从合成的单链 DNA、RNA 或者 XNA (增强型的修饰核苷酸)^[3]、HNA (特定结构型的核苷酸如 G 四链体) 文库中获得的对特定靶标有高亲和力、能调控生物活性的单链寡核苷酸分子^[4]。核酸适配体靶标范围广泛, 可精确识别金属离子、小分子、氨基酸、多肽、蛋白质和细胞, 被誉为 “化学家的抗

体”^[5]。作为一类识别分子, 核酸适配体应用于分子医学能识别疾病标志物、辨认病变细胞, 且分子质量较小, 可自动化、模块化合成, 稳定性好、毒性低, 适合于临床应用的分子探针和治疗药物^[6-7]。本文主要综述核酸适配体在疾病诊断、分子成像、靶向治疗、肿瘤免疫治疗中的应用。

1 分子医学中的核酸适配体

作为继抗体和小分子后的又一类识别分子 (寡聚核苷酸), 核酸适配体在分子医学中显示出优异的性能: a. 在筛选周期上, 核酸适配体筛选周期短, 适合突发疾病靶标的分子识别; b. 在化学稳定性上, 物化性质稳定, 可耐受较大范围的酸碱度、温度和较广泛的有机溶剂, 便于存储; c. 在分子质

* 国家自然科学基金 (22104035), 浙江省创新创业领军团队 (2022R01006) 和湖南省自然科学基金 (2022JJ40039) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0571-88121030, E-mail: r_peng@hnu.edu.cn

收稿日期: 2023-08-16, 接受日期: 2023-09-08

量上,核酸适配体相对分子质量更小,有良好的组织穿透能力和较低的免疫原性,不易引起机体的免疫反应;d.在生产周期方面,可通过化学合成进行大量合成(亚磷酰胺法),合成成本低、批间差异小;e.在化学修饰方面,易于修饰改造,能连接众多基团,实现与不同纳米颗粒偶联。核酸适配体的分子识别不依赖于碱基互补配对,而是折叠成特定的二级与三级结构,通过空间结构和靶标分子构象匹配^[8-10]。

经典的基于细胞的核酸适配体筛选步骤主要包括:第一步构建文库,文库中的寡核苷酸通常由15~60种核苷酸组成,中间有一个随机区域、两端有固定序列,构成多达 $4^{25} \sim 10^{15}$ 个单链随机寡核苷酸的文库, RNA文库还包含用于逆转录的结合序列;第二步孵育,为了鉴定目标特异性核酸适配体,需要将靶细胞与寡核苷酸文库在指定温度下孵育;第三步分离,先洗去未结合的非特异性序列再洗脱得到结合的序列;第四步反筛,将洗脱序列与阴性细胞孵育来进行反筛;第五步序列保留,去除与阳性分子和阴性分子都结合的序列,只保留与靶

细胞结合而不与阴性细胞结合的特异性序列;第六步PCR扩增,特异结合靶细胞的DNA序列作为PCR扩增的模板,并且用作下一轮筛选的二级文库。经过多轮筛选和扩增(10~20轮),对靶细胞具有高亲和力和高特异性的核酸适配体进行富集,通常亲和力可以从2倍提高到 2^9 倍,潜在的核酸适配体在池中富集可以通过测序获取DNA序列(图1)。不同于DNA核酸适配体的SELEX, RNA核酸适配体的SELEX需使用T7 RNA聚合酶扩增以及PCR前需要逆转录^[11]。依据经典的SELEX筛选,已经发展出很多高效的筛选方法,能够简化筛选过程或筛选得到改进的核酸适配体。最近开发了很多筛选方法,比如,从大型随机L-DNA文库中镜像筛选出具有生物稳定性核酸适配体^[12],将核酸适配体转换为分子开关的大规模并行筛选^[13],能够定量分离、可编程亲和力的微流芯片筛选^[14],以官能团介导的靶向小分子的功能筛选^[15]等。核酸适配体的分子修饰以及新筛选方法的开发,将极大扩展核酸适配体在分子医学中的应用。

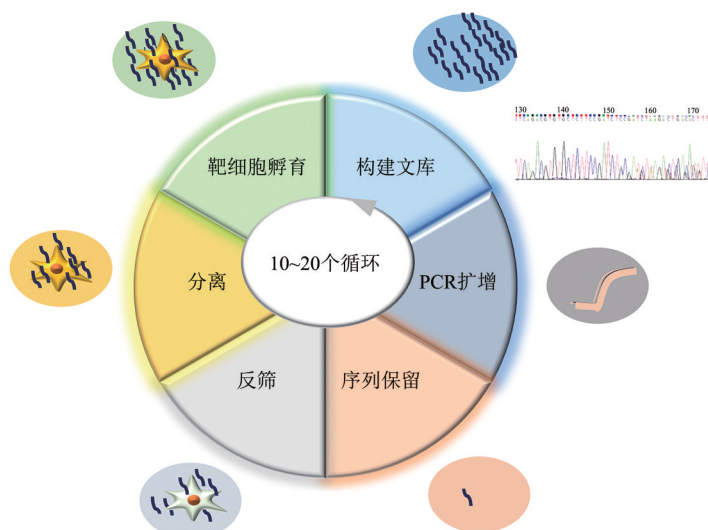


Fig. 1 Schematic illustration of aptamer SELEX process

图1 核酸适配体筛选过程示意图

2 核酸适配体在疾病诊断中的应用研究

癌细胞膜表面蛋白质的丰度、分布和构象与正常细胞存在差异,上述特征可作为生物标志物用于

疾病诊断。通过核酸适配体对膜表面蛋白质的分子识别,可实现对众多肿瘤标志物的体外检测以及病理分析。目前已开发了一系列基于核酸适配体的诊断方法用于疾病早期筛查与诊断(图2)。

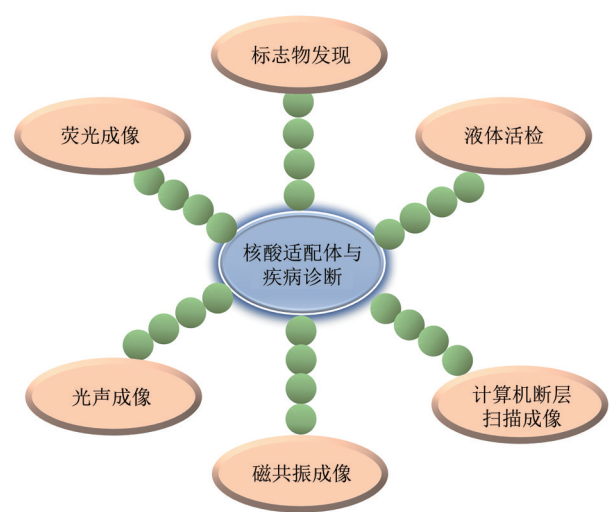


Fig. 2 Schematic illustration application of aptamers in disease diagnosis

图2 核酸适配体在疾病诊断中的应用示意图

2.1 基于核酸适配体的肿瘤标志物发现

细胞膜作为细胞与周围环境之间物质和能量交换的门户，在维持细胞结构的完整性和调节细胞生命活动方面起着至关重要的作用，在分子水平上实现癌症相关膜蛋白的精确检测尤为重要^[16]。目前已报道了诸多肿瘤标志物的发现方法，比如蛋白质组、二维凝胶电泳和差分成像凝胶电泳、质谱、稳定同位素、抗肽抗体捕获和多重反应监测，但仍存在灵敏度和特异性低、稳定性差等局限。其中，通过细胞筛选获得与肿瘤细胞特异性结合的核酸适配体的方法是发现肿瘤细胞膜表面标志物的有利工具^[7]。由于Cell-SELEX靶向的是活细胞，被核酸适配体靶向的生物标志物可从细胞中分离出来，并通过质谱分析鉴定。研究人员通过Cell-SELEX发现一系列有代表性的肿瘤标志物（表1）。比如，Daniels等^[17-18]利用核酸适配体GBI-10靶向胶质母细胞瘤衍生的细胞系U251鉴定到了Tenascin-C（肿瘤基质中发现的细胞外蛋白质），被认为参与胚胎发生和致癌途径。Mallikaratchy等^[19]利用核酸适配体TD05发现了结合Ramos细胞膜表面的免疫球蛋白重μ链，可作为伯基特淋巴瘤的标志物和治疗靶点。上官隽华等^[20-21]利用核酸适配体Sgc8c发现了跨膜受体PTK7的高表达与CCRF-CEM细胞之间存在强相关性，进一步发现PTK7蛋白可以作为T细胞急性淋巴细胞白血病的潜在生物标志物。Yang等^[22]利用核酸适配体靶向急性骨髓性白血病细胞系NB4并鉴定到Siglec-5蛋白，有望在临床实

践中用于白血病细胞检测和治疗。Wu等^[23-24]通过筛选获得核酸适配体XQ-2d，并鉴定到CD71不仅在胰腺癌，而且在多种肿瘤中过度表达，为癌症诊断和治疗提供了有利辅助。Jia等^[25]利用核酸适配体发现了鼻咽癌细胞系NPC5-8F过表达的CD109蛋白可作为鼻咽癌潜在的生物标志物。Van Simaey等^[26]利用核酸适配体TOV6辅助发现了卵巢癌细胞系TOV-21G的标志物STIP1。Wang等^[27]基于亚细胞神经突筛选到的核酸适配体yly12可以强烈结合神经突，其分子靶标被鉴定为L1CAM，是在正常神经和各种癌症中表达的一种表面抗原。Zhou等^[28]基于筛选得到的核酸适配体发现了新的肿瘤驱动蛋白HDLBP，在小细胞肺癌特异性过表达，可以作为治疗靶点。Zhang等^[29]利用核酸适配体XQ-2d靶向葡萄膜黑色素瘤细胞鉴定到CD71蛋白，其作为葡萄膜黑色素瘤的生物标志物和治疗靶点具有巨大潜力。类似地，Pan等^[30]利用核酸适配体PZ-1靶向葡萄膜黑色素瘤细胞鉴定到同样有生物标志物和治疗靶点潜力的JUP蛋白。作为实现细胞膜生理功能的关键参与者，细胞膜蛋白占总蛋白质的30%，而膜蛋白的类型和表达水平与肿瘤的发生发展密切相关，随着高通量测序技术的发展，核酸适配体本身作为核酸序列，更容易被应用于基于高通量测序平台的多组学研究中，从而为肿瘤标志物的发现提供新的策略。

Table 1 Representative biomarkers by Cell-SELEX		
表1 Cell-SELEX筛选的代表性的生物标志物		
癌种	细胞系	标志物
胶质母细胞瘤	U251	Tenascin-C ^[31]
伯基特淋巴瘤	Ramos	IGHM ^[19]
急性淋巴细胞白血病	CCRF-CEM	PTK7 ^[20-21]
急性骨髓性白血病	NB4	Siglec-5 ^[22]
胰腺导管腺癌	PL45	CD71 ^[23-24]
鼻咽癌	NPC5-8F	CD109 ^[25]
卵巢癌	TOV-21G	STIP1 ^[26]
神经母细胞瘤细胞系	SH-SY5Y	L1CAM ^[27]
小细胞肺癌	H446、H1688	HDLBP ^[28]
葡萄膜黑色素瘤	UM	CD71 ^[29] 、JUP ^[30]

2.2 基于核酸适配体的液体活检

液体活检能够监测肿瘤复发、评估疗效，而且具有标本易获得、创伤性小、非侵入性、可反复采集等优点。本节主要讨论核酸适配体在液体活检中对蛋白质、细胞外囊泡、循环肿瘤细胞的检测。

2.2.1 核酸适配体与蛋白质检测

蛋白质是生命活动的物质承担者,蛋白质的检测不仅可以揭示生命活动的发生规律,同样对人类重大疾病发生发展的病理机制研究也有重要作用。MUC1是存在于上皮恶性肿瘤中的众所周知的肿瘤标志物, Ferreira 等^[32]通过筛选到靶向 MUC1 的 DNA 核酸适配体进一步设计了核酸适配体-抗体-ELISA 三明治结构,该结构所构建的传感器可用于乳腺癌、膀胱肿瘤的早期诊断和其他上皮肿瘤的原发性或转移性疾病检测。正常条件下前列腺特异性抗原 PSA 主要存在于前列腺组织中,前列腺出现病变血清中的 PSA 浓度将升高,由此血清 PSA 可作为前列腺癌早期筛查的重要指标, Min 等^[33-34]开发了基于核酸适配体电化学探针能同时检测前列腺癌细胞的前列腺特异性膜抗原 (PSMA) (+) 和 PSMA (-), 并且可以用作前列腺癌早期诊断的工具。Qing 等^[35]基于核酸适配体构建的电化学核酸适配体传感器实现了对凝血酶的特异性和灵敏检测,计算检测限为 1.26 fmol/L,为蛋白质生物标志物的灵敏检测提供了范例。Zhang 等^[36]利用新开发的能特异性识别严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型 (SARS-CoV-2) 野生型和变体刺突蛋白的二聚体 DNA 核酸适配体构建了传感器,用唾液样本评估获得了 80.5% 的临床敏感性和 100% 的特异性,这是第一个报道的可以检测 SARS-CoV-2 任何新变种的快速检测方法。Curti 等^[37]基于核酸适配体构

建了检测 SARS-CoV-2 刺突蛋白的电化学适配体传感器,在不同的非目标病毒蛋白没有观察到交叉反应性,可扩展用于检测其他可提供核酸适配体的蛋白质靶标。因此,核酸适配体通过对蛋白质的灵敏检测帮助实现疾病早筛早诊。

2.2.2 核酸适配体与细胞外囊泡检测

细胞外囊泡携带多种反映亲本细胞的蛋白质,研究其表面蛋白为癌症诊断提供了有力手段。近年来一系列新兴的细胞外囊泡捕获技术被开发出来。例如, Jiang 等^[38]报道了一种通过核酸适配体组修饰的金纳米颗粒实现了对细胞外囊泡表面蛋白的捕获和分析平台,细胞外囊泡表面蛋白和核酸适配体的竞争性结合会取代原纳米颗粒的核酸适配体,导致纳米颗粒聚集,这种聚集继而导致溶液变色从而实现识别并产生用于鉴定细胞外囊泡表面上多种蛋白质的模式。Liu 等^[39]利用激光照射微流控芯片产生热泳,并通过核酸适配体特异性识别肿瘤细胞外囊泡表面肿瘤相关膜蛋白,获得了多个细胞外囊泡膜蛋白的信息,该技术可用于 6 种癌症的早期自动分型检测,为基于细胞外囊泡的肿瘤液体活检领域提供了新的研究思路。此外,多参数输入型检测策略得到广泛报道^[40]。Feng 等^[41]针对结直肠癌患者外周血来源的细胞外囊泡的临床诊断问题,围绕多参数分子识别策略,以核酸适配体作为识别基团,开发了一种基于逻辑门的用于细胞外囊泡表面蛋白的智能诊断方法 (图 3),该方法不仅能准确

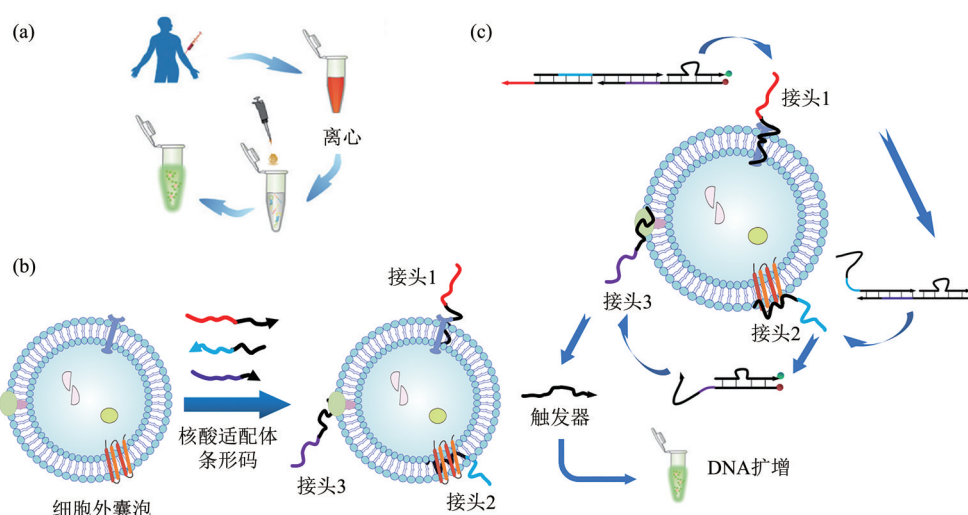


Fig. 3 Schematic illustration of extracellular vesicles derived from colorectal cancer for logic diagnosis

图3 核酸适配体编码结直肠癌来源的细胞外囊泡逻辑诊断

(a) 结直肠癌来源的细胞外囊泡; (b) 核酸适配体作为识别基团可在1个血清样本中同时检测3个细胞外囊泡蛋白; (c) 信号放大。

区分正常细胞和癌细胞, 而且应用于临床样本, 实现了对结直肠癌细胞来源的细胞外囊泡实现多参数的分子诊断, 从而为结直肠癌的分子诊断提供新的诊断策略。

2.2.3 核酸适配体与肿瘤循环细胞检测

通过测量特定细胞的水平, 临床医生可以预测疾病发生的风险或者判断患者对治疗的反应。以循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTC) 为例, 在成年男性血液中, 大多数实体瘤细胞的平均细胞密度约为 200/ml (占血液细胞总数的 0.004%)^[42-43], 需要高特异探针才能准确检测脱落到血液中的肿瘤细胞^[44]。传统的细胞分离方法, 如介质电泳和沉淀法、荧光活化细胞、基于 PCR 的细胞检测灵敏度和特异性都难以用于 CTC 检测。基于核酸适配体开发了一系列的电化学传感器能实现高灵敏度 CTC 的检测, 例如, 开发对癌症细胞无需光学检测系统的超灵敏检测方法^[45]、高效检测罕见循环癌症细胞的高灵敏度比色法^[46]、无标记的基于核酸适配体的化学发光生物传感器^[47]、与纳米材料如量子点或单壁碳纳米管结合^[48]等。外周血中极其罕见的 CTC 的无损分离和富集以及可靠检测对于肿瘤精准诊断和治疗具有相当重要的意义, 但目前仍然是一个巨大的挑战。Song 等^[49]基于金纳米的多价核酸适配体修饰技术以及巯基、谷胱甘肽的交换反应, 可以提高核酸适配体对靶细胞捕获效率同时保证 CTC 无损释放, 在 41 例临床样本的盲测中对肿瘤患者的检出率可以达到 100%, 在肿瘤分期和监测等方面有重要应用前景。Li 等^[50]基于临床样本的 SELEX 开发了胎儿有核红细胞特异性的核酸适配体, 能够从母体细胞中高效富集靶细胞进行染色体分析, 这是第一个开发用于有核红细胞富集的核酸适配体报道, 对胎儿无创产前诊断具有广泛应用潜力。Li 等^[51]基于核酸适配体识别实现了对血液中 EpCAM 阳性循环肿瘤细胞的无损分离和富集, 并且可以滚环放大灵敏计数, 有望为分析复杂外周血中极其罕见的 CTC 进行液体活检提供有力工具。

2.3 基于核酸适配体的分子成像

分子成像是指在分子水平上对细胞或体内功能生物分子进行非侵入性可视化、表征和测量^[52]。分子成像可在影像检查中点亮病灶, 在深入了解生物过程、疾病的早期诊断、疾病评估等方面发挥着重要的作用。通过核酸适配体的分子靶向能力结合影像基因成像可以实现细胞和亚细胞中分子水平的可视化, 为癌症的早期筛查和诊断提供有力的分子工具。例如, Yan 等^[53]基于核酸适配体设计了单壁碳纳米管的多功能可激活平台, 用于癌症细胞成像大大减少了背景信号和增强对比成像。Wu 等^[24]利用核酸适配体 XQ-2d 对胰腺导管腺癌成像, 临床样本的识别率为 82.5%。Yang 等^[54]通过 G 四链体和球型核酸构建了用于活细胞 K⁺ 成像的荧光纳米探针, 当 K⁺ 存在时, G 四链体序列从球形核酸上解离, 从而使两种荧光染料产生荧光共振能量转移, 实现细胞内 K⁺ 的特异性检测。Yuan 等^[55]利用转移性结直肠癌细胞系核酸适配体 J3 实现了对转移性癌症的组织成像, 检出率达 73.9%。核酸适配体结合分子影像能用于早期肿瘤微小病灶的发现, 可显著提高对小病灶的诊断能力, 相对抗体探针更安全通用、成本低廉。目前, 基于核酸适配体的活体成像包括磁共振成像、氧化铁或钆基纳米颗粒造影剂、正电子断层扫描和单光子发射转换断层扫描、放射性标记成像。Ding 等^[56]对 PTK7 靶向的核酸适配体 sgc8 进行化学修饰和放射性标记构建了 ⁶⁸Ga[Ga]-NOTA-SGC8 偶联物, 并应用于患者的全身正电子发射断层显像 (PET) / 计算机断层扫描术 (CT) 动态扫描 (图 4), 这项研究中核酸适配体 sgc8 结合 PET/CT 在人体内首次成像显示出在肿瘤部位的积聚和血液的快速清除, 是核酸适配体的首例人体全身动态药代学 PET/CT 影像应用。该研究不仅启发未来开发更多基于核酸适配体的 PET 成像探针, 也为核酸相关的医学临床转化奠定了坚实的基础, 同时论证了在全景 PET 指导下新药开发方式的可行性。

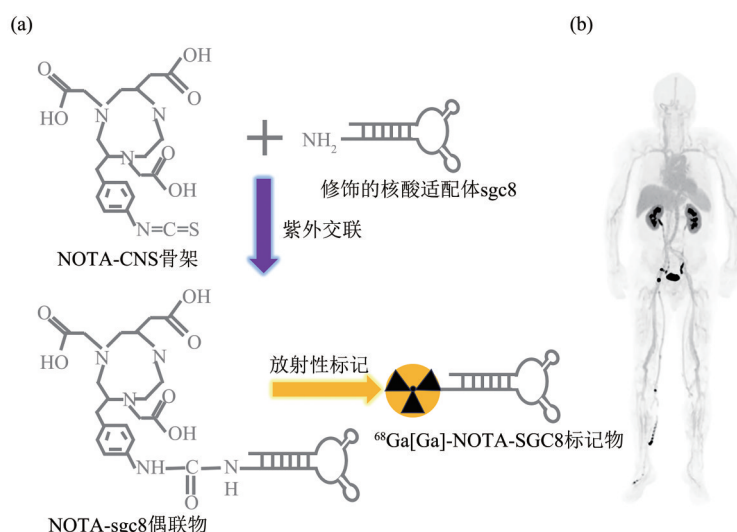


Fig. 4 ⁶⁸Ga[Ga]-NOTA-SGC8 for PTK7 positive tumor imaging in patient (modified from[56])

图4 ⁶⁸Ga[Ga]-NOTA-SGC8用于PTK7(+)患者肿瘤成像 (修改自[56])

(a) ⁶⁸Ga[Ga]-NOTA-SGC8偶联示意图; (b) PTK7(+)患者肿瘤成像。

3 核酸适配体在药物治疗中的应用研究

由于核酸适配体的高特异性、分子灵活性，且可靶向抗体无法结合的位点，近年来核酸适配体已被广泛用于抑制剂开发、靶向药物和纳米药物合成等多个领域（图5）。

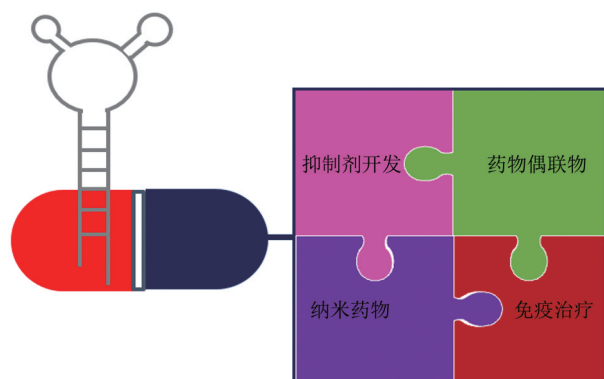


Fig. 5 Schematic diagram of aptamer application in drug therapy

图5 核酸适配体应用于药物治疗示意图

3.1 基于核酸适配体的抑制剂

核酸适配体具有高选择性、高亲和力、易细胞内化、快速的组织积累能力和良好的组织渗透能力等独特优势，使其在新药研发领域具有广阔的市场前景。早在2005年，Eyetech和Pfizer公司开发了

基于靶向血管内皮生长因子的核酸适配体，被美国食品药品监督管理局（FDA）批准用于治疗新生血管年龄相关性黄斑变性，称为“Macugen”（Pegaptanib sodium），该药物是第一个获批的用于眼部疾病抗血管生成的核酸适配体药物，开启了核酸适配体药物治疗的里程碑，引发一系列关注和研究^[57-63]。之后，AS1411和NOX-A12等核酸适配体先后进入了临床研究和临床实验^[64]。另外，Yu等^[65]研发的靶向硬骨抑素的长效修饰的核酸适配体候选药物Apc0010A可以显著促进成骨不全动物模型的骨形成，同时不会有抗体药物的心血管风险，已经通过美国FDA儿童罕见病药物认定和孤儿药认定。还有很多具有诊断或治疗潜力的核酸适配体，如Gelinis等^[66]报道的抑制SARS-CoV-2刺突蛋白与其细胞表面受体血管紧张素转换酶2结合、能在体外中和病毒的核酸适配体，Chu等^[67]发现的与TNFR1结合并精确阻断TNFR1活性以抑制潜在的类风湿性关节炎等自身免疫性疾病的核酸适配体。今年8月5日，Iveric Bio的核酸适配体药物Avacincaptad Pegol被FDA批准上市，这是一款阻断C5的核酸适配体药物，商品名为Izervay，用于治疗地图样萎缩^[68]。自1990年来首次报道核酸适配体，经过30多年的发展，目前已经有两款核酸适配体上市，基于核酸适配体的抑制剂将是未来生物医药潜在的机遇。

3.2 基于核酸适配体的药物偶联物

核酸适配体药物偶联物 (aptamer-drug conjugate, ApDC) 通过简单高效的精准偶联方法实现核酸适配体与天然药物分子的连接, 是实现精准治疗的分子利器。例如, PSMA 是前列腺癌肿瘤标志物, 在前列腺癌上皮细胞上过表达并组成性地内吞到胞内, 研究人员利用靶向 PSMA 胞外域的 2'-氟嘧啶 RNA 核酸适配体^[69]递送药物如化疗剂^[70]、毒素^[71]或 siRNA^[72]治疗前列腺癌, 能够有效地减少药物用量并实现靶向治疗。PTK7 特异性结合急性淋巴细胞白血病 T 细胞的核酸适配体 sgc8c 可以内化进入细胞^[73], Huang 等^[74]和 Shanguan 等^[75]将阿霉素与 sgc8c 共价偶联, 该偶联物显示出优异的靶向毒性, 对细胞 CCRF-CEM 的毒性增加了 6.7 倍。Castano 等^[76]和 Mallikaratchy 等^[19]利用核酸适配体 TD05 与光敏剂偶联, 被激发的光敏剂与环境氧气的相互作用来产生活性氧使恶性细胞凋亡或者坏死, 核酸适配体靶向递送显著增强了效果。类似地, Taghdisi 等^[77]通过核酸适配体非共价连接柔红霉素可特异递送至 T 细胞急性淋巴细胞白血病细胞并有效减少副作用。

目前, ApDC 在活体应用领域仍面临诸多挑战: a. 由于血液中存在丰富的核酸酶, 导致核酸适配体容易降解, 核酸适配体的稳定性亟待提高; b. 由于核酸适配体的尺寸、亲水性、极性等理化特性, 易被肾脏清除, 导致体内半衰期短; c. 由于核酸适配体受体内温度、离子浓度、特定组织器官和肿瘤微环境等因素的干扰, 亟待解决核酸适配体在复杂环境中维持高亲和力和构象稳定。普遍的解决策略主要为核酸适配体的化学修饰以及 ApDC 连接子的开发。目前, 研究人员开发了一系列精准的核酸适配体与抗癌药物的偶联策略, 如根据药物量身定制生物偶联策略, 常见的药物分子雷公藤甲素、青蒿素、康普瑞汀、丝裂霉素、美登素、紫杉醇活性位点的定点偶联, 在乳腺癌和三阴性乳腺癌靶向治疗效果显著^[78-80]。另外, 根据自动化编程策略可精准调控药物分子的数量和位置, 结果显示, 不同连接子的核酸适配体药物偶联物对药物释放和细胞毒性会产生作用影响, 在靶向治疗中取得了显著效果^[81]。基于 ApDC 组装形成的多价 ApDC 纳米结构可以大幅提升实体瘤穿透能力和治疗效果^[82]。核酸适配体-蛋白质降解靶向嵌合体 (PROTAC) 偶联方法也被开发为一种新策略, 可以提高常规

PROTAC 的肿瘤特异性靶向能力和体内抗肿瘤效力, 已经在乳腺癌取得效果^[83]。此外, 通过核酸适配体延伸序列与核酸药物的杂交可实现其靶向递送, 如短干扰 RNA、小激活 RNA、microRNA 和反义寡核苷酸, 以及基于环形 RNA 嵌入核酸适配体序列实现 RNA 的靶向递送, 扩展了核酸适配体药物偶联的应用^[84]。

3.3 核酸适配体纳米药物

纳米药物容易渗透进入肿瘤组织 (和正常组织相比) 并长期滞留的现象, 使纳米药物有肿瘤治疗效果。但是纳米药物的药物富集容易受到新生血管结构的差异、血压、肿瘤病理类型和肿瘤位置的影响, 不同个体疗效会存在明显差异。提高疗效和减少非靶点副作用是纳米药物设计的关注点^[85-86]。核酸适配体能够选择性地增加治疗剂在癌症细胞中的积累或保留, 并减少正常细胞的死亡^[84, 87]。基于核酸适配体的功能化纳米药物, 已被证实具有显著促进药物在肿瘤病灶富集的潜力, 其对药物内化方式的改变甚至能够逆转肿瘤的化疗抗性, 也在高分子材料偶联表现出来显著的优势^[5]。一系列基于不同无机或有机纳米材料的核酸适配体纳米靶向药已经被构建。例如, Zhang 等^[88]利用 PSMA 的核酸适配体偶联聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 纳米材料表现出比单一药物明显提高的肿瘤杀伤活性。Wang 等^[89]将 PTK7 的核酸适配体与金纳米棒、Ce6 光敏剂偶联构建了光热和光动力联合治疗模式, 显著提高了对肿瘤的特异杀伤能力。Huang 等^[90]利用 PTK7 的核酸适配体构建 PEG-PLGA 共聚物作为药物载体共投递用于淋巴细胞白血病的靶向协同治疗。Shi 等^[91]利用靶向肺癌 A549 细胞的构象可变量核酸适配体偶联 Au@Ag/Au 杂合纳米颗粒构成的荧光成像和光热治疗的双功能纳米药物, 可以实现影像指导的实时治疗。Wang 等^[92]构建了核酸适配体 Sgc8c 与广谱微管蛋白抑制剂康普瑞汀偶联物, 由 DNA 八面体框架程序化地装载, DNA 纳米结构的强渗透性和滞留效应以及 Sgc8c 核酸适配体的主动靶向能力可以实现高选择性的化学药物输送和有效的体内成像, 在小鼠原位肿瘤模型显示优良的生物安全性和抗癌功效 (图 6)。核酸适配体作为能特异识别肿瘤细胞表面标志物的靶向配体, 可以提高药物分子在肿瘤组织中的富集来提高药物的治疗效果, 该策略有望成为疾病治疗中最有吸引力的靶向药物之一。

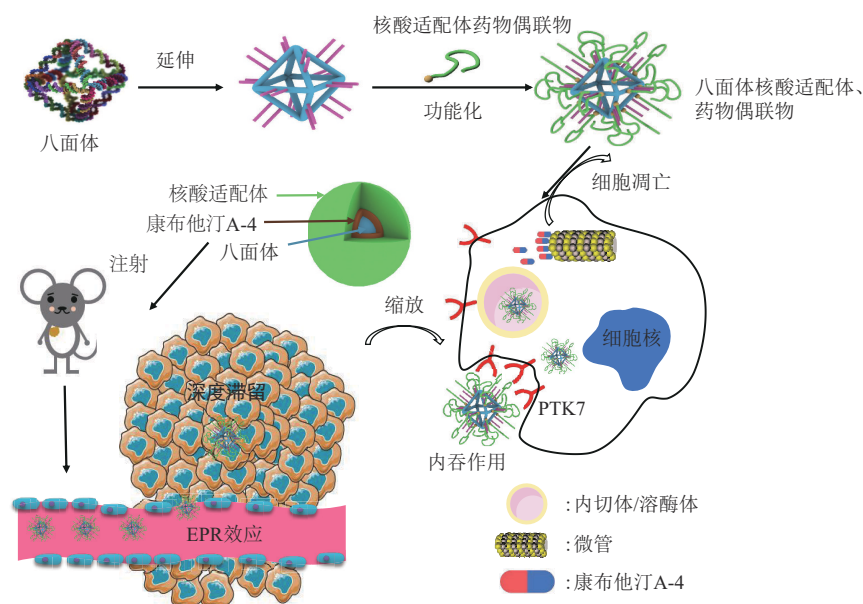


Fig. 6 DNA nanoframework structures loaded with aptamer–drug conjugate for targeted therapy of colorectal cancer

图6 DNA纳米框架结构装载核酸适配体药物偶联物用于结直肠癌的靶向治疗

EPR效应：高渗透、长滞留效应（enhanced permeability and retention effect）。

3.4 核酸适配体介导的免疫治疗

化疗和放疗是大多数癌症的主要治疗选择，但在杀死高度增殖的癌细胞时，会对正常细胞产生严重的毒副作用。免疫治疗已成为攻克肿瘤的一种新疗法。癌症免疫治疗方法现有的成功临床结果大多是由针对免疫检查点的抗体引领的，核酸适配体作为免疫原性小的靶向分子可以实现与单克隆抗体相同的治疗效果^[93-94]。例如，Xiong等^[95]利用c-Met核酸适配体和CD16核酸适配体偶联构建的双特异性核酸适配体可以将表达CD16的NK细胞招至表达c-Met的肿瘤细胞，从而增强对肿瘤细胞的特异杀伤效率。Herrmann等^[96]利用靶向CTLA-4的核酸适配体偶联基因药物STAT3 siRNA可以明显抑制肿瘤细胞生长和转移，为免疫检查点抑制疗法提供了一个新思路。Prodeus等^[97]利用PD1的核酸适配体可以特异性阻断PD1和PDL1的结合从而激活抗肿瘤免疫，在PD1阳性荷瘤小鼠中能显著抑制肿瘤生长，与抗体治疗效果类似。Chen等^[98]通过核酸适配体改造的NK细胞在小鼠体内实现了对三阴性乳腺癌的靶向免疫治疗，展示了三阴性乳腺癌免疫治疗的新方法。FDA的双特异性核酸适配体免疫疗法，可以诱导人工免疫突触，促进T细胞活化和随后的肿瘤细胞裂解^[99]，Fu等^[100]利用靶向PD-1的核酸适配体和核仁素的核酸适配体构成免

疫检查点封锁和肿瘤归巢功能的双特异性药物。Zhang等^[101]开发了基于PD-L1核酸适配体的纳米球形核酸实现了高效且安全的肿瘤免疫治疗，核酸适配体可以阻断肿瘤细胞表面PD-L1蛋白表达，随后近红外光照射产生活性氧，同时释放药物，共同诱导细胞发生免疫原性死亡，该方法提高了肿瘤免疫疗法的响应及治疗效果，有望为提高临床肿瘤免疫治疗疗效、解决治疗过程中出现的免疫相关不良反应等提供新策略。

4 总结与展望

核酸适配体是通过模拟自然进化人工筛选获得的核酸分子探针，作为能与靶标高特异性、高亲和力结合的识别分子，核酸适配体为分子医学发展个性化的预测、诊断和治疗模式提供了极佳的工具。核酸适配体的主要优势包括：与靶标结合的特异性和亲和力强、合成简单快速、容易化学修饰、靶标范围广、组织穿透性好、免疫原性小，有望直接用于活体分子成像和靶向药物。本文主要总结核酸适配体筛选技术及其在疾病诊断和肿瘤治疗中的基础研究与应用。

目前基于核酸适配体的分子医学研究整体仍处于初期，从基础研究、应用研究走向临床诊疗和产业化之前，仍存在一系列难题。首先，基于细胞和

活体筛选获得的核酸适配体与其靶标的鉴定过程耗时长, 而且基于应用场景的筛选还没有统一的标准, 从而限制了核酸适配体的实际应用。第二, 由于核酸适配体与蛋白质复合物结构表征复杂, 对核酸适配体与靶标高亲和力的机制以及构效关系认知不足, 限制了对核酸适配体优化改造及精准调控。第三, 核酸适配体作为寡聚核苷酸在活体内容易被酶降解, 半衰期短, 从而限制了核酸适配体药物偶联物在靶向治疗药物开发中的应用。尽管诸多研究报告可通过官能团修饰(人工碱基、胆固醇、聚乙二醇、磷酸骨架的硫代、溴、氨基、氟、甲基化等)、稳定分子构象或引入纳米载体用于提高核酸适配体在血液循环中的稳定性, 但大多数研究仍处于实验阶段, 而且实验室开发使用的核酸适配体靶标仅覆盖临床上少数靶分子如上皮细胞黏附分子、凝血酶, 走向临床应用还有一段路。近期, 基于核酸适配体的侧向层析技术在体外诊断领域得到应用, 譬如通过筛选得到的核酸适配体可实现对 SARS-CoV-2 核衣壳蛋白的检测。随着筛选技术的发展和核酸适配体性能的进一步提升, 以及核酸适配体作为核酸分子的可测序性, 相对抗体具备高通量、高灵敏检测的能力, 未来在分子医学中核酸适配体将得到更广泛的应用, 成为保障公众健康的重要武器。

参 考 文 献

- [1] Ellington A D, Szostak J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *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. *Science*, 1990, **249**(4968): 505-510
- [3] Yik E J, Medina E, Paegel B M, *et al.* Highly parallelized screening of functionally enhanced XNA aptamers in uniform hydrogel particles. *ACS Synth Biol*, 2023, **12**(7): 2127-2134
- [4] Schofield P, Taylor A I, Rihon J, *et al.* Characterization of an HNA aptamer suggests a non-canonical G-quadruplex motif. *Nucleic Acids Res*, 2023, **51**(15): 7736-7748
- [5] Narwade M, Shaikh A, Gajbhiye K R, *et al.* Advanced cancer targeting using aptamer functionalized nanocarriers for site-specific cargo delivery. *Biomater Res*, 2023, **27**(1): 42
- [6] He S, Du Y, Tao H, *et al.* Advances in aptamer-mediated targeted delivery system for cancer treatment. *Int J Biol Macromol*, 2023, **238**: 124173
- [7] Li Y, Tam W W, Yu Y, *et al.* The application of aptamer in biomarker discovery. *Biomark Res*, 2023, **11**(1): 70
- [8] Xu G, Zhao J, Yu H, *et al.* Structural insights into the mechanism of high-affinity binding of ochratoxin A by a DNA aptamer. *J Am Chem Soc*, 2022, **144**(17): 7731-7740
- [9] Xu G, Wang C, Yu H, *et al.* Structural basis for high-affinity recognition of aflatoxin B1 by a DNA aptamer. *Nucleic Acids Res*, 2023, **51**(14): 7666-7674
- [10] Liu H, Gao Y, Mathivanan J, *et al.* Crystal structures and identification of novel Cd²⁺-specific DNA aptamer. *Nucleic Acids Res*, 2023, **51**(9): 4625-4636
- [11] Randrianjatovo-Gbalou I, Rosario S, Sismeiro O, *et al.* Enzymatic synthesis of random sequences of RNA and RNA analogues by DNA polymerase theta mutants for the generation of aptamer libraries. *Nucleic Acids Res*, 2018, **46**(12): 6271-6284
- [12] Chen J, Chen M, Zhu T F. Directed evolution and selection of biostable L-DNA aptamers with a mirror-image DNA polymerase. *Nat Biotechnol*, 2022, **40**(11): 1601-1609
- [13] Yoshikawa A M, Rangel A E, Zheng L, *et al.* A massively parallel screening platform for converting aptamers into molecular switches. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 2336
- [14] Song P, Fan C. Selecting aptamers with programmed affinities. *Nat Chem*, 2023, **15**(6): 747-748
- [15] Yang K, Mitchell N M, Banerjee S, *et al.* A functional group-guided approach to aptamers for small molecules. *Science*, 2023, **380**(6648): 942-948
- [16] Santoni V, Molloy M, Rabilloud T. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible?. *Electrophoresis*, 2000, **21**(6): 1054-1070
- [17] Mackie E J, Chiquet-Ehrismann R, Pearson C A, *et al.* Tenascin is a stromal marker for epithelial malignancy in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**(13): 4621-4625
- [18] Daniels D A, Chen H, Hicke B J, *et al.* A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(26): 15416-15421
- [19] 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. *Mol Cell Proteomics*, 2007, **6**(12): 2230-2238
- [20] Shangguan D, Cao Z, Meng L, *et al.* Cell-specific aptamer probes for membrane protein elucidation in cancer cells. *J Proteome Res*, 2008, **7**(5): 2133-2139
- [21] Shangguan D, Li Y, Tang Z, *et al.* Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(32): 11838-11843
- [22] Yang M, Jiang G, Li W, *et al.* Developing aptamer probes for acute myelogenous leukemia detection and surface protein biomarker discovery. *J Hematol Oncol*, 2014, **7**: 5
- [23] Wu X, Liu H, Han D, *et al.* Elucidation and structural modeling of CD71 as a molecular target for cell-specific aptamer binding. *J Am Chem Soc*, 2019, **141**(27): 10760-10769
- [24] Wu X, Zhao Z, Bai H, *et al.* DNA aptamer selected against pancreatic ductal adenocarcinoma for *in vivo* imaging and clinical tissue recognition. *Theranostics*, 2015, **5**(9): 985-994
- [25] Jia W, Ren C, Wang L, *et al.* CD109 is identified as a potential

- nasopharyngeal carcinoma biomarker using aptamer selected by cell-SELEX. *Oncotarget*, 2016, **7**(34): 55328-55342
- [26] Van Simaey D, Turek D, Champanhac C, *et al.* Identification of cell membrane protein stress-induced phosphoprotein 1 as a potential ovarian cancer biomarker using aptamers selected by cell systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Anal Chem*, 2014, **86**(9): 4521-4527
- [27] Wang L, Bing T, Liu Y, *et al.* Imaging of neurite network with an anti-L1CAM aptamer generated by neurite-SELEX. *J Am Chem Soc*, 2018, **140**(51): 18066-18073
- [28] Zhou W, Zhao L, Yuan H, *et al.* A new small cell lung cancer biomarker identified by Cell-SELEX generated aptamers. *Exp Cell Res*, 2019, **382**(2): 111478
- [29] Zhang H, Jin C, Zhang L, *et al.* CD71-specific aptamer conjugated with monomethyl auristatin E for the treatment of uveal melanoma. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, **14**(1): 32-40
- [30] Pan Z, Zhu H, Zhang Y, *et al.* Development of uveal melanoma-specific aptamer for potential biomarker discovery and targeted drug delivery. *Anal Chem*, 2023, **95**(11): 5095-5108
- [31] Mackie E J, Chiquet-Ehrismann R, Pearson C A, *et al.* Tenascin is a stromal marker for epithelial malignancy in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**(13): 4621-4625
- [32] Ferreira C S, Papamichael K, Guilbault G, *et al.* DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: design of aptamer-antibody sandwich ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours. *Anal Bioanal Chem*, 2008, **390**(4): 1039-1050
- [33] Min K, Jo H, Song K, *et al.* Dual-aptamer-based delivery vehicle of doxorubicin to both PSMA (+) and PSMA (–) prostate cancers. *Biomaterials*, 2011, **32**(8): 2124-2132
- [34] Min K, Song K M, Cho M, *et al.* Simultaneous electrochemical detection of both PSMA(+) and PSMA(–) prostate cancer cells using an RNA/peptide dual-aptamer probe. *Chem Commun*, 2010, **46**(30): 5566-5568
- [35] Qing M, Sun Z, Wang L, *et al.* CRISPR/Cas12a-regulated homogeneous electrochemical aptasensor for amplified detection of protein. *Sens Actuat B Chem*, 2021, **348**: 130713
- [36] Zhang Z, Pandey R, Li J, *et al.* High-affinity dimeric aptamers enable the rapid electrochemical detection of wild-type and B.1.1.7 SARS-CoV-2 in unprocessed saliva. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, **60**(45): 24266-24274
- [37] Curti F, Fortunati S, Knoll W, *et al.* A folding-based electrochemical aptasensor for the single-step detection of the SARS-CoV-2 Spike protein. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, **14**(17): 19204-19211
- [38] Jiang Y, Shi M, Liu Y, *et al.* Aptamer/AuNP biosensor for colorimetric profiling of exosomal proteins. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, **56**(39): 11916-11920
- [39] Liu C, Zhao J, Tian F, *et al.* Low-cost thermophoretic profiling of extracellular-vesicle surface proteins for the early detection and classification of cancers. *Nat Biomed Eng*, 2019, **3**(3): 183-193
- [40] Bai H, Peng R, Wang D, *et al.* A minireview on multiparameter-activated nanodevices for cancer imaging and therapy. *Nanoscale*, 2020, **12**(42): 21571-21582
- [41] Feng Y, Yang Y, Xiao Y, *et al.* Multi-parameter inputted logic-gating on aptamer-encoded extracellular vesicles for colorectal cancer diagnosis. *Anal Chem*, 2023, **95**(2): 1132-1139
- [42] Xu Y, Phillips J A, Yan J, *et al.* Aptamer-based microfluidic device for enrichment, sorting, and detection of multiple cancer cells. *Anal Chem*, 2009, **81**(17): 7436-7442
- [43] Phillips J A, Xu Y, Xia Z, *et al.* Enrichment of cancer cells using aptamers immobilized on a microfluidic channel. *Anal Chem*, 2009, **81**(3): 1033-1039
- [44] Barok M, Balazs M, Nagy P, *et al.* Trastuzumab decreases the number of circulating and disseminated tumor cells despite trastuzumab resistance of the primary tumor. *Cancer Lett*, 2008, **260**(1-2): 198-208
- [45] Bamrungsap S, Chen T, Shukoor M I, *et al.* Pattern recognition of cancer cells using aptamer-conjugated magnetic nanoparticles. *ACS Nano*, 2012, **6**(5): 3974-3981
- [46] Borghei Y S, Hosseini M, Dadmehr M, *et al.* Visual detection of cancer cells by colorimetric aptasensor based on aggregation of gold nanoparticles induced by DNA hybridization. *Anal Chim Acta*, 2016, **904**: 92-97
- [47] Shahrajabian M, Hormozi-Nezhad M R. Design a new strategy based on nanoparticle-enhanced chemiluminescence sensor array for biothiols discrimination. *Sci Rep*, 2016, **6**: 32160
- [48] Wu Y X, Zhang X B, Zhang D L, *et al.* Quench-shield ratiometric upconversion luminescence nanoplatform for biosensing. *Anal Chem*, 2016, **88**(3): 1639-1646
- [49] Song Y, Shi Y, Huang M, *et al.* Bioinspired engineering of a multivalent aptamer-functionalized nanointerface to enhance the capture and release of circulating tumor cells. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, **58**(8): 2236-2240
- [50] Li X, Wang T, Xie T, *et al.* Aptamer-mediated enrichment of rare circulating fetal nucleated red blood cells for noninvasive prenatal diagnosis. *Anal Chem*, 2023, **95**(12): 5419-5427
- [51] Li J, Dong C, Gan H, *et al.* Nondestructive separation/enrichment and rolling circle amplification-powered sensitive SERS enumeration of circulating tumor cells via aptamer recognition. *Biosens Bioelectron*, 2023, **231**: 115273
- [52] Mankoff D A. A definition of molecular imaging. *J Nucl Med*, 2007, **48**(6): 18N, 21N
- [53] Yan L, Shi H, He X, *et al.* A versatile activatable fluorescence probing platform for cancer cells *in vitro* and *in vivo* based on self-assembled aptamer/carbon nanotube ensembles. *Anal Chem*, 2014, **86**(18): 9271-9277
- [54] Yang Y, Huang J, Yang X, *et al.* Aptamer-based FRET nanoflares for imaging potassium ions in living cells. *Chem Commun*, 2016, **52**(76): 11386-11389
- [55] Yuan B, Jiang X, Chen Y, *et al.* Metastatic cancer cell and tissue-specific fluorescence imaging using a new DNA aptamer developed by Cell-SELEX. *Talanta*, 2017, **170**: 56-62
- [56] Ding D, Zhao H, Wei D, *et al.* The first-in-human whole-body dynamic pharmacokinetics study of aptamer. *Research (Wash D*

- C), 2023, **6**: 0126
- [57] Anonymous. Pegaptanib sodium (Macugen) for macular degeneration. *Med Lett Drug Ther*, 2005, **47**(1212): 55-56
- [58] Anonymous. New drug treats form of age-related macular degeneration. Macugen inhibits progression of wet AMD and also may restore some vision. *Health News*, 2005, **11**(5): 3-4
- [59] Anonymous. Intravitreal injection of Macugen. *Pharm Unserer Zeit*, 2007, **36**(6): 470
- [60] Eriksson E S, Joshi L, Billeter M, *et al.* *De novo* tertiary structure prediction using RNA123-benchmarking and application to Macugen. *J Mol Model*, 2014, **20**(8): 2389
- [61] Frenkel R E, Mani L, Toler A R, *et al.* Intraocular pressure effects of pegaptanib (Macugen) injections in patients with and without glaucoma. *Am J Ophthalmol*, 2007, **143**(6): 1034-1035
- [62] Hariprasad S M, Shah G K, Blinder K J. Short-term intraocular pressure trends following intravitreal pegaptanib (Macugen) injection. *Am J Ophthalmol*, 2006, **141**(1): 200-201
- [63] Katz B, Goldbaum M. Macugen (pegaptanib sodium), a novel ocular therapeutic that targets vascular endothelial growth factor (VEGF). *Int Ophthalmol Clin*, 2006, **46**(4): 141-154
- [64] Jin B, Guo Z, Chen Z, *et al.* Aptamers in cancer therapy: problems and new breakthroughs. *J Mater Chem B*, 2023, **11**(8): 1609-1627
- [65] Yu Y, Wang L, Ni S, *et al.* Targeting loop3 of sclerostin preserves its cardiovascular protective action and promotes bone formation. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 4241
- [66] Gelinas A D, Tan T K, Liu S, *et al.* Broadly neutralizing aptamers to SARS-CoV-2: a diverse panel of modified DNA antiviral agents. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2023, **31**: 370-382
- [67] Chu X, Du X, Yang L, *et al.* Targeting tumor necrosis factor receptor 1 with selected aptamers for anti-inflammatory activity. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, **15**(9): 11599-11608
- [68] Patel S S, Lally D R, Hsu J, *et al.* Avacincaptad pegol for geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration: 18-month findings from the GATHER1 trial. *Eye (Lond)*, 2023. doi:10.1038/s41433-023-02497-w
- [69] Lupold S E, Hicke B J, Lin Y, *et al.* Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells *via* the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res*, 2002, **62**(14): 4029-4033
- [70] Dhar S, Gu F X, Langer R, *et al.* Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt (IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(45): 17356-17361
- [71] Chu T C, Marks J W, Lavery L A, *et al.* Aptamer:toxin conjugates that specifically target prostate tumor cells. *Cancer Res*, 2006, **66**(12): 5989-5992
- [72] Mcnamara J O, Andrechek E R, Wang Y, *et al.* Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol*, 2006, **24**(8): 1005-1015
- [73] Xiao Z, Shangguan D, Cao Z, *et al.* Cell-specific internalization study of an aptamer from whole cell selection. *Chemistry*, 2008, **14**(6): 1769-1775
- [74] Huang Y F, Shangguan D, Liu H, *et al.* Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells. *Chembiochem*, 2009, **10**(5): 862-868
- [75] Shangguan D, Tang Z, Mallikaratchy P, *et al.* Optimization and modifications of aptamers selected from live cancer cell lines. *Chembiochem*, 2007, **8**(6): 603-606
- [76] Castano A P, Mroz P, Hamblin M R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6**(7): 535-545
- [77] Taghdisi S M, Abnous K, Mosaffa F, *et al.* Targeted delivery of daunorubicin to T-cell acute lymphoblastic leukemia by aptamer. *J Drug Target*, 2010, **18**(4): 277-281
- [78] He J, Peng T, Peng Y, *et al.* Molecularly engineering triptolide with aptamers for high specificity and cytotoxicity for triple-negative breast cancer. *J Am Chem Soc*, 2020, **142**(6): 2699-2703
- [79] Deng Z, Yang Q, Peng Y, *et al.* Polymeric engineering of aptamer-drug conjugates for targeted cancer therapy. *Bioconj Chem*, 2020, **31**(1): 37-42
- [80] Tan Y, Peng Y, Ai L, *et al.* Aptamer enables consistent maytansine delivery through maintaining receptor homeostasis for HER2 targeted cancer therapy. *Bioconj Chem*, 2020, **31**(7): 1766-1774
- [81] Huang Z, Wang D, Long C Y, *et al.* Regulating the anticancer efficacy of sgc8-combretastatin A4 conjugates: a case of recognizing the significance of linker chemistry for the design of aptamer-based targeted drug delivery strategies. *J Am Chem Soc*, 2021, **143**(23): 8559-8564
- [82] Wang D, Li S, Zhao Z, *et al.* Engineering a second-order DNA logic-gated nanorobot to sense and release on live cell membranes for multiplexed diagnosis and synergistic therapy. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, **60**(29): 15816-15820
- [83] He S, Gao F, Ma J, *et al.* Aptamer-PROTAC conjugates (APCs) for tumor-specific targeting in breast cancer. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, **60**(43): 23299-23305
- [84] Xie S, Sun W, Fu T, *et al.* Aptamer-based targeted delivery of functional nucleic acids. *J Am Chem Soc*, 2023, **145**(14): 7677-7691
- [85] Zhang W, Kohane D S. Keeping nanomedicine on target. *Nano Lett*, 2021, **21**(1): 3-5
- [86] Liu Q, Zou J, Chen Z, *et al.* Current research trends of nanomedicines. *Acta Pharm Sin B*, 2023. doi: 10.1016/j.apsb.2023.05.018
- [87] He J, Duan Q, Ran C, *et al.* Recent progress of aptamer-drug conjugates in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*, 2023, **13**(4): 1358-1370
- [88] Zhang L, Radovic-Moreno A F, Alexis F, *et al.* Co-delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs from nanoparticle-aptamer bioconjugates. *ChemMedChem*, 2007, **2**(9): 1268-1271
- [89] Wang J, You M, Zhu G, *et al.* Photosensitizer-gold nanorod composite for targeted multimodal therapy. *Small*, 2013, **9**(21): 3678-3684
- [90] Huang F, You M, Chen T, *et al.* Self-assembled hybrid nanoparticles for targeted co-delivery of two drugs into cancer cells. *Chem Commun*, 2014, **50**(23): 3103-3105

- [91] 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. *Nanoscale*, 2014, **6**(15): 8754-8761
- [92] Wang D, Peng R, Peng Y, *et al.* Hierarchical fabrication of DNA wireframe nanoarchitectures for efficient cancer imaging and targeted therapy. *ACS Nano*, 2020, **14**(12): 17365-17375
- [93] Garcia Melian M F, Moreno M, Cerecetto H, *et al.* Aptamer-based immunotheranostic strategies. *Cancer Biother Radiopharm*, 2023, **38**(4): 246-255
- [94] 周灵丽,叶茂. 核酸适配体介导的肿瘤免疫治疗研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2022, **49**(6): 1036-1044
Zhou L, Ye M. *Prog Biochem Biophys*, 2022, **49**(6): 1036-1044
- [95] Xiong X, Liu H, Zhao Z, *et al.* DNA aptamer-mediated cell targeting. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, **52**(5): 1472-1476
- [96] Herrmann A, Priceman S J, Swiderski P, *et al.* CTLA4 aptamer delivers STAT3 siRNA to tumor-associated and malignant T cells. *J Clin Invest*, 2014, **124**(7): 2977-2987
- [97] 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. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2015, **4**(4): e237
- [98] Chen Z, Zeng Z, Wan Q, *et al.* Targeted immunotherapy of triple-negative breast cancer by aptamer-engineered NK cells. *Biomaterials*, 2022, **280**: 121259
- [99] Thomas B J, Porciani D, Burke D H. Cancer immunomodulation using bispecific aptamers. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, **27**: 894-915
- [100] Fu J, Yao F, An Y, *et al.* Novel bispecific aptamer targeting PD-1 and nucleolin for cancer immunotherapy. *Cancer Nanotechnol*, 2023, **14**(1): 27
- [101] Zhang J, Li W, Qi Y, *et al.* PD-L1 aptamer-functionalized metal-organic framework nanoparticles for robust photo-immunotherapy against cancer with enhanced safety. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2023, **62**(5): e202214750

Applications of Aptamers in Molecular Medicine*

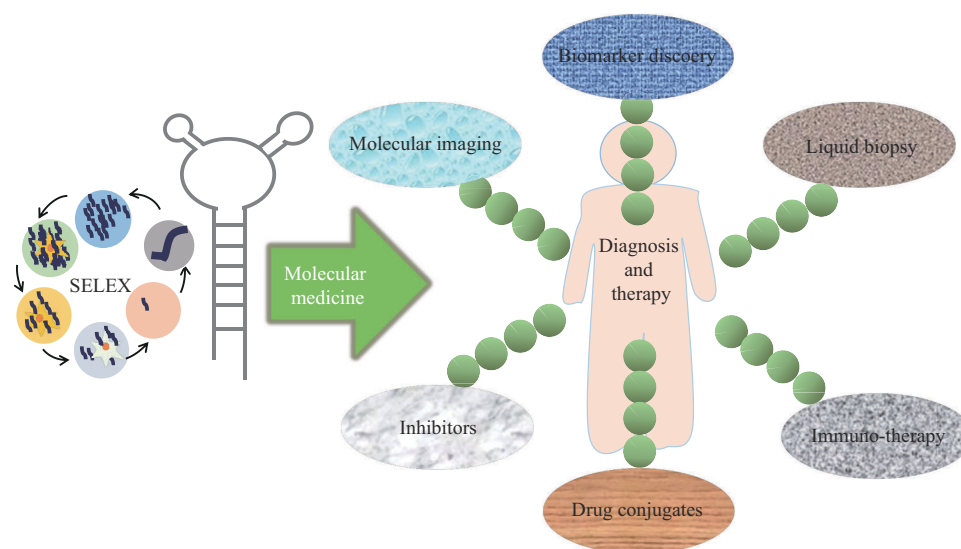
ZHANG Xin-Na^{1,2)}, HUANG Zhi-Yong³⁾, PENG Rui-Zi^{1,3)**}

⁽¹⁾Institute of Basic Medicine and Cancer (IBMC), Chinese Academy of Sciences, The Key Laboratory of Zhejiang Province for Aptamers and Theranostics, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China;

⁽²⁾College of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

⁽³⁾College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Graphical abstract



Abstract Molecular medicine focus on understanding the diseases based on molecular level, and developing personalized medicine strategies for diagnostics and therapeutics. However, powerful molecular recognition tool is still limited for cancer diagnosis and therapy, which impeding cancer research. Aptamers are generated from systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) also known as *in vitro* selection, ranging from synthetic single-stranded DNA, RNA or XNA (enhanced modified nucleotides), HNA (nucleotides of specific structures such as G quadruplex). The main advantages of aptamers including high specificity, high affinity, simple and rapid synthesis, easy chemical modification, wide target range, good tissue penetration and low immunogenicity. As a molecular recognition tool in molecular medicine, aptamer shows wide applications in developing personalized prediction, diagnosis and therapeutics for its high specificity and high affinity against target. This review discusses the applications of aptamers in disease diagnosis, including aptamer-based tumor

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (22104035), the Zhejiang Leading Innovation and Entrepreneurship Team (2022R01006), and Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (2022JJ40039).

** Corresponding author.

Tel: 86-571-88121030, E-mail: r_peng@hnu.edu.cn

Received: August 16, 2023 Accepted: September 8, 2023

marker discovery, liquid biopsy, and molecular imaging. Moreover, the applications of aptamer-based cancer therapy are reviewed, including aptamer-based inhibitors, aptameric drug conjugates, nanomedicines, and aptamer-mediated immunotherapy. Finally, it is promising aptamer will be extensively employed in the future including fundamental research, diagnosis and therapeutics. However, following issues are still need to be addressed. First, the application scenarios-dependent SELEX procedures lack studying which limits the clinical applications of aptamers. Second, the structure of aptamer-target complex has not been fully elucidated, which restricts the precise regulation of aptamers. Third, aptamer is easily degraded by enzymes *in vivo* and has a short half-life period, which hinders the applications of aptamer-drug conjugates in the development of targeted drugs. With the advancement of screening technology and the further enhancement of aptamer performance, it is expected that aptamers will find more extensive utilization in the field of molecular medicine in the future.

Key words aptamer, molecular medicine, diagnosis, therapy

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0333