

180-178

252703

随机 RNA 库筛选技术的发展与展望

王冰 江红 柯丽华

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

Random RNA Pool Selection: Developments and Prospects

Wang Bing Jiang Hong Ke Lihua

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

关键词 随机 RNA 库, 寡核苷酸, 体外筛选, 扩增**Key words** Random RNA pool, Oligonucleotide, Selection *in vitro*, Amplification

随着分子生物学的发展, 人们对体外分子进化有了进一步认识, 把组合化学策略与模拟进化思想结合起来, 构建了由各种各样合成分子组成的数目庞大的组合库(包括多肽、氨基酸、蛋白质、寡核苷酸), 这些组合库的构建及筛选不仅适合于筛选药物先导化合物, 而且适用于研究、诊断、治疗。随机筛选技术发展迅速, 由化学合成方法或分子生物学方法构建的随机多肽库、抗体库或随机 RNA 库, 其筛选过程无论称之为生物淘金(biopanning), 还是配体指数级富集系统进化(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment, 简称 SELEX), 都较为简单、快速有效^[1-5], 避免了药物先导化合物传统筛选方法的盲目性和复杂性。在一定控制条件下, 生物序列的选择可在容器中模拟自然界长期进化过程, 快速而系统地进行^[6]。以下叙述以寡核苷酸为组合库的随机 RNA 库筛选技术的发展与前景。

1 RNA 库筛选技术的发展

随机 RNA 库技术是近年发展起来的一项研究 RNA 作用、进化等的新技术。最初被用来分离与一系列小分子(如染料)或纯化蛋白质特异结合的 RNA(DNA)分子。经过几轮筛选与扩增, 可以从随机 RNA 库中分离出与靶分子稳定结合的 RNA 分子^[7]。那些与特定靶分子结合的最佳 RNA 分子最初浓度很低, 几乎低于总序列集合的 0.01%, 但是被筛选出来的微量目的 RNA 能够经随后扩增、筛选及纯化过程中通过指数级富集放大效应达到相当浓度和纯度。

Kinzler K W 等^[8]在每一轮 RNA 筛选后, 通过逆转录 PCR 技术使微量 RNA 扩增, 不断提高目的 RNA 浓度, 进一步克隆至原核载体中, 获得更高纯度目的 DNA(RNA)分子。他们用这种方法分离到与转录因子 III A(TF III A)结合的特定寡核苷酸序列, 并解决了分离过程中目的 RNA 容易损失的问题, 提高目的 RNA 分子的纯度。该方法的建立为 RNA 库筛选技术奠

定了基础。Ellington A 等^[9]在此基础上大胆创新,改进构建 RNA 库的设计方法,使之更有利于体外 RNA 转录、PCR 扩增及克隆。如:(1)在随机序列区域两侧设计了引物区及限制性内切酶切割位点,便于 PCR 扩增及克隆;(2)在其中一端插入一个 T7 启动子序列,便于高效率体外转录。用六种不同的有机染料(Cibacron Blue 3GA、Reactive Red 120、Reactive Yellow 86、Reactive Brown 10、Reactive Green 19、Reactive Blue 4)设计了六个亲和层析柱,五轮筛选后,各染料分离柱 RNA 结合率由最初的 0.1% 上升到 50%,将洗脱下来的 RNA 进行比较,发现彼此不存在序列同源性,表明结合在各个染料层析柱上的 RNAs 具有特异性,这些随机寡核苷酸链能够折叠形成各种稳定的三维结构,不但能够结合特定的配体分子,而且还具有类似核酶(Ribozyme)的“纺锤状”二级结构和催化的活性。

Gold L 对 RNA 库筛选技术的完善和发展起着重要作用,他不但建立了 SELEX 概念,还系统地改良了筛选方法^[6,7],将柱层析筛选改为在硝酸纤维素(NC)膜上筛选,既简单又便宜。用此方法,确定了与 T4 DNA 聚合酶结合的最佳 RNA 序列。同时筛选出两个不同序列的特异性 RNA,其中一个与野生噬菌体 mRNA 的一部分同源,而另一个则在链上四个位置上存在差异,但两者与 T4 DNA 聚合酶的亲和力相当。这些实验为 T4 DNA 聚合酶与核糖体中的 RNA 结合部位以及结合机制的研究奠定了基础。通过 RNA 库筛选技术可以获得比自然界中更理想的与特定靶分子结合的 RNA 分子,而它们的结合是通过伸展的 RNA 空间构象与蛋白质嵌合作用来实现的^[10]。

2 随机 RNA 库与 SELEX

2.1 SELEX 概念

SELEX 是一种组合化学技术方法,首先制备一个能够扩增的随机核苷酸库,根据单链 RNA 结合性质或催化性质进行筛选及选择性扩增,通过重复筛选及扩增不断地提高特异性。通常一轮结合筛选和扩增称为一个“SELEX”循环。

正如 Janda K^[12]所叙述那样,理想的组合库设计,不仅仅是主键简单地重复结合。随机组合库中,由于结构、立体空间电子分布、非约束性空间构象等因素,使得溶液中单链核苷酸通过折叠形成各种各样复杂而稳定的空间结构,因此,RNA 库中各种不同结构的混合物具有极大的组合化学多样性,随机 RNA 库与随机肽库在这一点上具有相似之处。各种核苷酸衍生物也适合于 SELEX^[11,13],SELEX 已经被用来筛选鉴定新的核酶及脱氧核酶(deoxyribozymes)^[10,11]。

2.2 随机 RNA 库容量大小以及随机寡核苷酸长度

随机 RNA 库容量的大小通常由核酸随机化学合成的均一性决定,开始第一轮 SELEX 筛选的随机 RNA 库的容量一般为 $10^{14} \sim 10^{15}$ 。随机区域内每一个核苷酸位置存在四种可能性。如果随机区域的核苷酸位置有 n 个,那么随机序列的多样性为 n^4 ;如果将稀有碱基或人为修饰碱基考虑在内,同样长度区域内的随机序列多样性会更大^[14]。在一定长度范围内,随机区域越长,序列的多样性即形成的空间构象种类越多。一般 40 个寡核苷酸单链就可以形成一个稳定空间构象,只有当最佳单链 RNA 序列形成适当空间构象时,它们才可能与特定靶对象结合而被筛选出来^[15]。

那些带有一定长度随机区域的单链寡核苷酸很容易形成主要结构框架。最初 SELEX 筛选,随机区域长度一般为 30 个核苷酸,这 30 个简单的单链核苷酸经过加温处理后仍然可以形

成一定的空间模式,如:发卡型(hairpins)、带有螺旋的凸状结构(bulges within helices)、假结状结构(pseudoknots)以及 G-四分体结构(G-quartets)。采用同一个靶分子去筛选不同长度的随机序列,各种不同长度的随机 RNA 库均出现相同的空间模式及相同的核心序列,这意味着随机区域长度不是形成空间模式的关键。在一定范围内,短寡核苷酸与长寡核苷酸一样,能够形成稳定的空间构象,而且又可避免后者可能带来的复杂性问题。

2.3 用于随机 RNA 库筛选的靶分子

用于 SELEX 筛选的靶分子通常是已知的蛋白质,包括核苷酸结合蛋白、生长因子、蛋白水解酶、抗体、短肽等小分子^[10]。其中体内非功能性蛋白质靶分子包括不同的核苷酸结合蛋白、糖基化及非糖基化蛋白、酶、结构蛋白等,体外小分子靶对象包括小分子染料^[9]、制剂(茶碱)^[16]、氨基酸^[17,18]、核苷酸^[19]等。RNA 还可用于结合 NAD、NADH^[16]、大分子抗体^[33]、病毒蛋白^[20]等。随着研究的深入,研究及应用范围进一步扩大,可以作为 RNA 筛选的靶分子种类随之增加,各种具有重要生物学、医学价值的生物大分子均有可能成为筛选的靶分子。

2.4 筛选的亲合力及特异性

寡核苷酸与靶分子之间的亲合力及特异性与 SELEX 筛选的次数有密切关系。筛选次数越多,亲合力越高,特异性越强^[21,34]。Jellinek D 等利用成纤维细胞生长因子家族,获得高度特异性核苷酸^[22]。Tuerk C 等发现对于一种逆转录病毒的逆转录酶具有高结合力的寡核苷酸配体,而对于另一种逆转录酶不具有高亲合力^[23,24]。通过 SELEX 获得的配体通常具有与自然配体相关的重要结构或序列^[25],有时筛选产生的配体与蛋白质之间的亲合力,甚至要比自然序列与蛋白质之间的亲合力更强。令人惊异的是寻常的蛋白质往往更适合于作为 SELEX 的靶分子^[26,27],非核苷酸结合蛋白往往比已知的核苷酸结合蛋白具有更高的结合特异性,用靶分子筛选获得的配体解离常数(Kd)一般为 100 nM。

SELEX 作为一种组合化学技术方法,可以获得象抗体一样的高结合力及特异性的寡核苷酸。SELEX 具有如此的优越性,关键在于随机单链核苷酸及序列稳定结构模式(motifs)、约束环(loop)的形成。核苷酸与任何结合对象之间完美的结合,要求它们彼此之间在分子结构、离子特性、疏水性等方面互补;并且在相当小的接触表面上,这些分子能具有非同寻常的亲合力及特异性^[7]。它们就象典型的配体-靶分子配对(生物素-亲和素)结合模式一样,极有可能成为一种研究原子生物学的方法。通常生物学研究中很难找到理想的结合配体,可能与有机体进化过程中亲和解离变化有关,通过长期的自然演变,逐渐形成适合的受体-配体结合,但是从亲合力及特异性方面考虑,结果不一定最佳。实验证实,精细结构模式的大分子蛋白质具有令人惊叹的动力学性质^[28-30]。目前,对寡核苷酸动力学知之甚少,通过 SELEX 筛选那些排列有序的寡核苷酸作为蛋白质有效、特异性结合的配体,在 SELEX 过程中寡核苷酸的动力学显得无关紧要。

3 随机 RNA 库的应用

3.1 基础研究方面的应用

寡核苷酸能够象蛋白质配体一样具有一定的空间结构模式,故筛选产生的特异寡核苷酸可以看作另一类抗体。在细胞内定位实验中,制备某一蛋白质抗体的步骤通常可用 SELEX 来补充或代替^[22,26]。SELEX 产物甚至可以被用来纯化蛋白质。

有关基因表达的调控可能比我们的想象复杂得多。基因组的 SELEX 被认为是一种新手

段、用来鉴定有机体内生物调节环存在的可能性。将基因组的DNA骨架解离以构建及筛选寡核苷酸库,通过这些核苷酸库研究RNA或DNA与配体之间的相互关系。例如,细胞内存在一些特异性、活性DNA片段,乳铁传递蛋白(lactoferrin)与这些DNA片段具有高亲和力的相互作用。只有两者作用后,乳铁传递蛋白才表现出传递活性。在体外,自然杀伤细胞(NK cells)的乳铁传递蛋白的活性能够被RNA或DNA抑制。SELEX被应用来寻找能与某些调节蛋白(如乳铁传递蛋白,铁反应因子-结合蛋白)特异性结合的核苷酸序列^[31,32]。对一个有机体来说,基因组的SELEX为鉴定蛋白质-寡核苷酸结合图谱提供了可能性。

天然的RNA分子在结构与功能上具有多样性,自然界中四膜虫的RNA在转录过程中存在自身剪切修饰的功能,被称为核酶。随后1995年Illangasekare M发现在 Mg^{+2} 、 Ca^{+2} 存在下,RNA能够在体外催化氨酰-RNA合成,就象氨酰化RNA酶一样,具有催化功能。单链RNA组合库在结构上的多样性和复杂性,为筛选与特定的靶分子特异性结合的RNA分子提供了可能性^[33-35],筛选出来的RNA分子经过反复扩增与筛选,最终分离出与靶分子结合最佳的RNA分子。Prudent J R等^[36]从随机RNA库中分离出来的RNA分子能够催化桥联式双苯分子进行异构体互换。该研究结果提示RNA催化反应的底物不仅仅是核酸或核酸衍生物,还可以是小分子的异构体。

3.2 抗病毒方面的应用

与众多的抗菌药物相比较,抗病毒药物发展较慢,缺乏象抗菌素那样特效的抗病毒药物,其主要原因是由病毒本身特性所决定。尽管病毒增殖过程(如病毒的吸附、融合、脱壳、基因组及蛋白质合成、包装、释放等)都已为人所知,也针对各个环节不同的机制开发了许多抗病毒的药物,甚至把几种不同机制的抗病毒药物联合起来使用,但收效不大。由于病毒与宿主细胞关系密切,专性细胞内寄生,病毒的生理过程依赖于宿主细胞的生理代谢,以至于要求抗病毒药物能够识别病毒相关的酶,而这一点恰恰很难做到^[37]。

近十多年来,人们探索用最新的高科技技术防治病毒性疾病,抗病毒研究已取得可喜的进展,但是抗动物病毒的基因工程研究及人类病毒病药物治疗尚需努力探索。最近,随机RNA库筛选技术用于抗病毒研究显示出良好前景,成为一项抗病毒新策略。Pan W H和Wang J F^[38]首次将这种技术应用于抗罗氏肉瘤病毒(RSV)的研究。他们将具有感染性的完整RSV作为受体,经过多轮体外筛选,从随机RNA库中分离出能够特异结合RSV的RNA及RNAs衍生物,这些RNA分子对受感染细胞没有毒性作用。我研究组江红等(1998)采用类似的方法,从随机RNA库中筛选到在细胞水平抗草鱼出血病病毒(GCHV)的RNAs(待发表)。这些研究结果提示,随机RNA库技术有可能成为在体外筛选抗病毒生物制剂的重要途径,开拓抗病毒研究的领域。

随机RNA库筛选方法的优点:不需要了解病毒的蛋白质和基因组结构以及复杂的病毒感染过程,而只要选出的特异性RNAs分子能够与病毒表面感染相关的活性位点结合,就达到阻断病毒侵染细胞的效果。另外,PCR等技术的运用使筛选过程具有简单、快速等特点。

单链RNA分子抗病毒复制的机理可能与下列因素有关:(1)RNAs与病毒表面的蛋白结合后,改变了病毒表面蛋白质的结构,使得这些蛋白质在病毒感染的关键过程中不能发挥作用,如病毒的吸附、侵入或细胞膜融合;(2)某些结构的改变会激发另一种抑制病毒复制的途径,产生这种抑制通常发生在病毒进入细胞后,如抑制病毒的脱壳及表达。这两种机制以前已

经被许多类似的、由抗体诱导的病毒中和实验所证实。

3.3 诊断、治疗及药物开发方面的应用

SELEX 具有筛选与靶分子特异结合的寡核苷酸的特点,当一种已知的靶分子进行 SELEX 筛选时,它只能与其结构嵌合的 RNA 配体相结合。结合 AMP 及茶碱的寡核苷酸不能结合咖啡碱;而结合某一种氨基酸的 RNA 不能结合其结构对映体。利用这一筛选特异性进行鉴别诊断很有价值。寡核苷酸作为另一类诊断试剂,开始用于鉴定筛选凝血酶的拮抗剂^[39]。

目前,加快药物开发是药物工业面临的一个严峻挑战。以往的筛选方法及药物设计方案已不能适应当前药物发展的需要。合理的药物设计和筛选,一方面迫切需要一个容量庞大、且含有各种各样空间构象的组合库作为筛选对象;另一方面需要一个与之相应快速、自动的高效率筛选技术。SELEX 系统进化方法能够使特定的配体达到指数级富集,这种筛选过程产生的特异性寡核苷酸具有与特定靶蛋白嵌合的空间构象,因此它可以作为一种独特的先进技术去筛选新型药物。这种新技术的诞生,扩展了人们以往的概念,成为药物研究与开发的新思路^[7]。

筛选获得的寡核苷酸有可能直接作为治疗试剂,例如肿瘤学研究中一个重要的环节是肿瘤的血管再生,为肿瘤细胞提供大量营养,以满足肿瘤快速生长的需要^[22,26]。肿瘤细胞能够分泌其中一种血管生成素,敏感的内皮细胞还能以较高水平表达某些关键受体,SELEX 被用来产生封闭这些血管生成素的拮抗剂^[40]。

4 有待探讨的问题

防止 RNA 在体外或体内被 RNA 酶降解以及延长 RNAs 在体内的活性时间等是核酸试剂作为药物所面临的问题。体外操作时,通常以抗核酸酶物质(如核酸酶抑制剂)来抵抗核酸酶对 RNA 分子的破坏,如果 RNA 作为核酸药物使用时则不可避免地遭到体内核酸酶的破坏。为解决此难题,已经有报道采用修饰性寡核苷酸(如 2'-氨基嘧啶核苷酸、2'-氟嘧啶核苷酸、5'-碘代嘧啶核苷酸)进行 SELEX 筛选,以抵抗 RNA 酶的降解作用,延长活性时间^[11,13,38]。筛选获得的 RNA 衍生物不但具有同样的功能,而且它对核酸酶的耐受性更强,活性时间更长^[41]。

此外,机体内部是一个复杂、有序的生理环境,那些经过优选、改造的寡核苷酸在人体内功效的发挥及安全性问题,将有待进一步研究。

5 RNA 库的发展前景展望

成熟的组合化学技术,必须具备以下特点:(1)有庞大的混合物容量,能够为任何靶对象快速提供高结合力的不同分子,并且为靶分子提供多价的结合表位,各种各样的筛选对象具有足够能力去形成饱和的空间结构模式;(2)这些被筛选出的配体对它们各自的靶对象具有很高的亲和力以及特异性。治疗性药物制剂的筛选,还需要进一步的有关医药化学方面的特殊实验。如药物效果、药物毒理及遗传学实验等。

由于融入了组合策略及模拟进化思想,组合化学技术不仅仅是混合物的简单合成,使得错综复杂的自然演变及选择能够在实验室内进行。如果可能,该技术提供的混合物能够直接用于动物实验,在此基础上才有可能尝试应用于人类疾病的治疗,那么 SELEX 将会带来理想的治疗效果。SELEX 筛选作为一种潜在的核酸药物开发研究很有前途,将成为筛选新型抗病毒药物的重要途径。

参 考 文 献

- 1 Houghten R A, Pinilla C, Blondelle S E *et al.* Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature*, 1991, 354:84 - 86
- 2 Scott J K, Smith G P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 1990, 249:386 - 390
- 3 Cwirla S E, Peter E A, Barrett R W *et al.* Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:6378 - 6382
- 4 Houghten R A. Peptide libraries: criteria and trends. *Trent Genet*, 1993, 9:235 - 239
- 5 Scott J K, Craig L. Random peptide libraries. *Current Opinion in Biotechnology*, 1994, 5:40 - 48
- 6 Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, 249:505 - 510
- 7 Gold L. Oligonucleotides as research, diagnostic, and therapeutic agents. *J Biol Chem*, 1995, 270:13581 - 13584
- 8 Kinzler K W, Vogelstein B. Whole genome PCR: application to the identification of sequences bound by gene regulatory proteins. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17:3645 - 3653
- 9 Ellington A, Szostak J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990, 346:818 - 822
- 10 Gold L. Diversity of oligonucleotide functions. *Annu Rev Biochem*, 1995, 64:763 - 797
- 11 Pieken W A, Olsen D B, Benseler F *et al.* Kinetic characterization of ribonuclease-resistant 2'-modified hammerhead ribozymes. *Science*, 1991, 253:314 - 317
- 12 Janda K D. Tagged versus untagged libraries: Methods for the generation and screening of combinatorial chemical libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:10779 - 10785
- 13 Eaton B E. Ribonucleosides and RNA. *Annu Rev Biochem*, 1995, 64:837 - 863
- 14 Switzer C Y, Moroney S E, Benner S A. Enzymatic recognition of the base pair between isocytidine and isoguanosine. *Biochemistry*, 1993, 32:10489 - 10496
- 15 Schneider T D, Storm G D, Gold L. Information content of binding sites on nucleotide sequences. *J Mol Biol*, 1986, 188:415 - 435
- 16 Jenison R D, Gill S C, Pardi A *et al.* High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science*, 1994, 263:1425 - 1429
- 17 Zuker M. On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science*, 1989, 244:48 - 52
- 18 Connell G J, Yarus M. RNAs with dual specificity and dual RNAs with similar specificity. *Science*, 1994, 264:1137 - 1141
- 19 Sassenfar M, Szostak J W. An RNA motif that binds ATP. *Nature*, 1993, 364:550 - 553
- 20 Urvil P T, Kakiuchi N, Zhou D M *et al.* Selection of RNA aptamers that bind specifically to the NS3 protease of hepatitis C virus. *Eur J Biochem*, 1997, 248:130 - 138
- 21 Blackwell T K, Kretzner L, Blackwood E M *et al.* Sequence-specific DNA binding by the c-myc protein. *Science*, 1990, 250:1149 - 1151
- 22 Jellinek D, Lynoct C K, Rifkin D B *et al.* High-affinity RNA ligands to basic fibroblast growth factor inhibit receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:11227 - 11234
- 23 Tuerk C, Macdougall S, Gold L. RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:6988 - 6992
- 24 Chen H, Gold L. Selection of high-affinity RNA ligands to reverse transcriptase: inhibition of cDNA synthesis and RNase H activity. *Biochemistry*, 1994, 33:8746 - 8756
- 25 Schneider D, Tuerk C, Gold L. Selection of high affinity RNA ligands to the bacteriophage R17 coat protein. *J Mol Biol*, 1992, 228:862 - 869
- 26 Jellinek D, Green L S, Bell C *et al.* Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor. *Biochemistry*, 1994, 33:10450 - 10456
- 27 Abelson J. Directed evolution of nucleic acids by independent replication and selection. *Science*, 1990, 249:488 - 489

- 28 Careaga C L, Sutherland J, Sabeti J *et al*. Large amplitude twisting motions of an interdomain hinge: a disulfide trapping study of galactose - glucose binding protein. *Biochemistry*, 1995, 34:3048 - 3055
- 29 Shoichet B K, Baase W A, Kuroki K *et al*. A relationship between protein stability and protein function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:452 - 456
- 30 Frauenfelder H, Sligar S G, Wolynes S P *et al*. The energy landscapes and motions of proteins. *Science*, 1991, 254:1598 - 1603
- 31 Klausner R D, Rouault T A, Harford J B. Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell*, 1993, 72:19 - 28
- 32 He J, Furmanski P. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature*, 1995, 373:721 - 724
- 33 Kenan D J, Tsai D E, Keene J D. Exploring molecular diversity with combinatorial shape libraries. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19:57 - 64
- 34 Irvine D, Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment with integrated optimization by non - linear analysis. *J Mol Biol*, 1991, 222:739 - 761
- 35 Joyce G F. Amplification, mutation and selection of catalytic RNA. *Gene*, 1989, 82:83 - 87
- 36 Prudent J R, Uno T, Schultz P G. Expanding the scope of RNA catalysis. *Science*, 1994, 264:1924 - 1927
- 37 Van der Sys I H, Wiltink E H. Antiviral drugs: present status and future prospects. *Int J Biochem*, 1994, 26:621 - 630
- 38 Pan W H, Craven R C, Wang J F *et al*. Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:11509 - 11513
- 39 Griffin L C, Toole J J, Leung L L K. The discovery and characterization of novel nucleotide-based thrombin inhibitor. *Gene*, 1993, 137:25 - 31
- 40 Brooks P C, Montgomery A M P, Rosenfeld M *et al*. Integrin 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, 1994, 79:1157 - 1164
- 41 Lin Y, Qiu Q, Gill S C *et al*. Modified RNA sequence pools for *in vitro* selection. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22:5229 - 5234