



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Kemiallisesti modifioidut aptameerit

Eila Henriksson

Kemia
LuK-tutkielma
Laajuus: 6 op

04.06.2026

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pääaine: Kemia

Tekijä(t): Eila Henriksson

Otsikko: Kemiallisesti modifioidut aptameerit

Ohjaaja(t): Tuomas Lönnberg

Sivumäärä: 17 sivua

Päivämäärä: 04.06.2026

Aptameerit ovat yksijuosteisia DNA- tai RNA-molekyylejä, jotka pystyvät sitoutumaan spesifisesti kohteeseensa kuten molekyyleihin tai soluihin. Aptameerit koostuvat nukleotideistä, joissa emäsosa on joko adeniini (A), sytosiini (C), guaniini (G), tymiini (T) tai urasiili (U). Nämä nukleotidit muodostavat nukleinihapposekvenssejä, jotka ovat noin 20–100 nukleotidin pituisia.

Aptameereilla on monia ominaisuuksia kuten selektiivisyys, muokattavuus sekä alhainen immunogeenisyys. Niitä on lisäksi halpaa ja nopeaa valmistaa SELEX-prosessin (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) avulla. Näiden monien hyvien ominaisuuksien ansiosta aptameerejä voidaan käyttää esimerkiksi lääkkeissä ja niiden kuljetuksessa sekä biosensoreina.

Kuitenkin aptameereilla on myös heikkouksia, jotka vaikeuttavat aptameerien hyödyntämistä hoidollisissa sovelluksissa. Näitä heikkouksia ovat muun muassa aptameerien stabiilisuus, riittämätön sitoutumisaffiniteetti sekä sitoutuminen muualle kuin haluttuun kohteeseen. Näitä ominaisuuksia voidaan kuitenkin parantaa modifioimalla aptameerejä kemiallisesti. Erilaisia muokkausmenetelmiä ovat esimerkiksi post-SELEX ja *in vivo* -SELEX, joissa aptameeriin voidaan liittää muun muassa funktionaalisia ryhmiä. Aptameerien kemiallinen modifiointi on osoittautunut toimivaksi menetelmäksi ja se mahdollistaa aptameerien käytön vaativissakin hoidollisissa sovelluksissa.

Sisällysluettelo

1. Johdanto	5
2. Muokkausmenetelmiä	7
2.1 post-SELEX.....	7
2.2 ExSELEX.....	8
2.3 dN*TP:iden entsyymaattinen polymerointi, AEGIS-SELEX, SELMA, napsautusreaktiot	9
2.4 LOOPER	10
3. Aptameerien kemialliset modifikaatiot	11
3.1 Fosfaattimodifikaatiot	11
3.2 Sokerimodifikaatiot	11
3.3 Spiegelmeerit.....	13
3.4 ApDCs	13
3.5 siRNA-aptameerikonjugaatiot.....	13
3.6 SOMAmeerit	14
3.7 BAB.....	14
3.8 Nukleoemäsmodifikaatiot	14
4. Kemiallisesti modifioitujen aptameerien sovelluksia	15
5. Yhteenveto	17
6. Lähdeluettelo	18

Lyhenteet

PEG, polyetyleeniglykoli

SELEX, Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment

ApDCs, Aptamer Drug Conjugates

LNA, Locked Nucleic Acid

PCR, polymeraasiketjureaktio

SAR, structure-activity relationship

SOMameeri, Slow Off-rate Modified Aptamers

BAB, base-appended-base

LOOPER, Ligase-catalyzed Oligonucleotide Polymerizatio

AEGIS-SELEX, artificially expanded genetic information systems SELEX

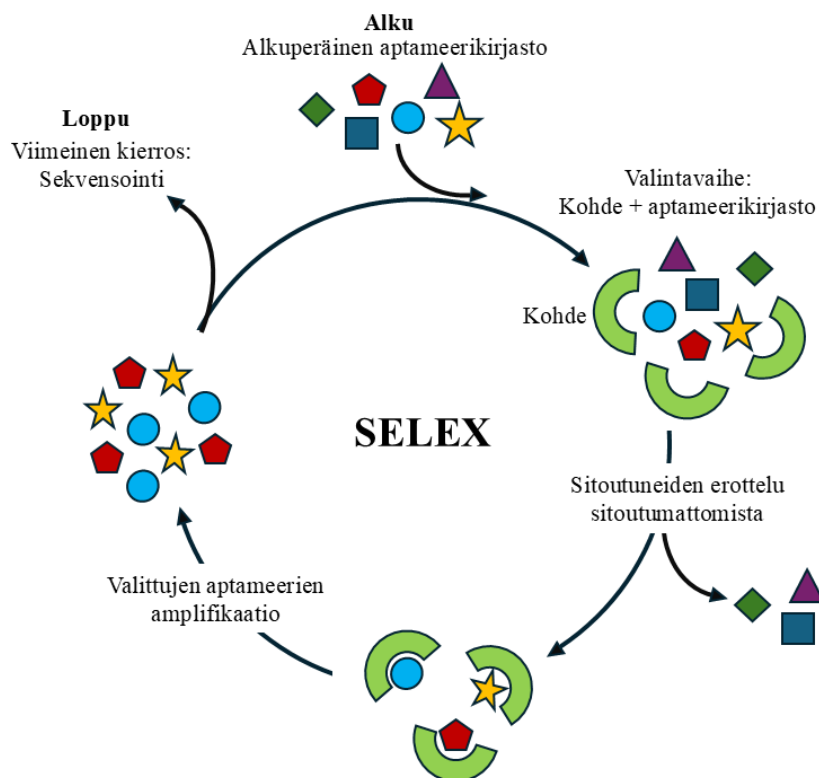
1. Johdanto

Aptameerit koostuvat nukleotideistä, joita ovat adeniini (A), sytosiini (C), guaniini (G), tymiini (T) ja urasiili (U). [1] Nämä nukleotidit muodostavat nukleiinihapposekvenssejä, jotka ovat noin 20–100 nukleotidin pituisia. [2] Aptameerit voivat sitoutua kohteeseensa vetysidoksien, van der Waalsin voimien, ionivuorovaikutuksien, hydrofobisten vuorovaikutuksien, emästen pinoutumisvuorovaikutuksien ja muodon komplementaarisuuden avulla. [3] Sitoutuessaan kohteisiinsa aptameerit laskostuvat kolmiulotteisiksi rakenteiksi. [4]

Aptameereillä on monia ominaisuuksia, kuten selektiivisyys, hyvä sitoutumisaffiniteetti, muokattavuus sekä alhainen immunogeenisyys. Niitä on lisäksi halpaa ja nopeaa valmistaa SELEXin avulla. Koska aptameereillä on monia hyviä ominaisuuksia, niitä voidaan käyttää esimerkiksi lääkkeissä, lääkkeiden kuljetuksessa sekä biologisissa analyyseissä. [2]

Aptameereja valmistetaan SELEX-prosessilla. Aluksi DNA-kirjastoon, joka sisältää tavallisesti 10^{14} molekyyliä, lisätään kiinteään kantajaan sidottu kohde. Tämän jälkeen sitoutumattomat DNA-molekyylit poistetaan ja aktiiviset molekyylit valitaan talteen. Nämä aktiiviset molekyylit monistetaan PCR:llä ja ne lisätään seuraavalle valintakierrokselle. [2] RNA-aptameerien valitsemiseksi sitoutuneet RNA:t monistetaan RT-PCR:llä, josta syntyneet DNA-templaattit transkriptoidaan seuraavaksi. [4] Aptameerien valintaan voidaan vaikuttaa muuttamalla valintaprotokollan parametrejä kuten esimerkiksi konsentraatiota, pH:ta tai lämpötilaa. Lopuksi rikastettu populaatio sekvensoidaan ja saatujen yksittäisten aptameerisekvenssien kykyä sitoutua kohteeseen kokeillaan. [2]

Ympäristöstä johtuvaa sitoutumisaffiniteetin heikkenemistä voidaan kehittää *in vivo* SELEXin avulla. Tällöin aptameerin valintakokeet tehdään SELEXin avulla suoraan siinä ympäristössä, missä sen halutaan toimivankin, esimerkiksi elävissä soluissa tai eläimissä. [2] *In vivo* SELEXissä valinta- ja monistusvaiheet tapahtuvat käyttämällä retroviruspohjaista replikaatiojärjestelmää. [6] *In vivo* SELEX voidaan yhdistää myös *in vitro* SELEXin kanssa, jolloin voidaan parantaa sekä sitoutumisaffiniteettia että spesifisyyttä. [2]



Kaavio 1. Aptameerien valmistus pääpiirteittäin SELEX-protokollalla. Mukailtu lähteestä [3].

Verrattuna vasta-aineisiin, aptameerit toimivat paremmin ja tehokkaammin. Esimerkiksi aptameereillä on parempi sitoutumisaffiniteetti eli ne sitoutuvat tiukemmin kohteeseensa. Ne ovat myös spesifisempiä eli ne sitoutuvat oikeaan kohteeseen useammin kuin vasta-aineet, ja ne tunkeutuvat tehokkaammin kohdekudokseen. Aptameerien halkaisija on vain noin 1–2 nm, kun taas vasta-aineiden halkaisija on noin 10–15 nm. Niitä on lisäksi helppo syntetisoida suuria määriä. Lisäksi aptameereilla on alhainen immunogeenisyys eli ne eivät aiheuta soluissa immuunireaktioita niitä vastaan. [2] Aptameerit ovat myös stabiilimpia kuin proteiinit. Proteiinit denaturoituvat helposti ja menettävät tertiäärisen rakenteensa korkeissa lämpötiloissa, kun taas oligonukleotidit pystyvät säilyttämään rakenteensa toistuvissa denaturaatio-renaturaatiosykleissä. [5]

Toisaalta aptameereillä on myös heikkouksia, esimerkiksi stabiilisuus, puutteellinen sitoutuminen sekä sitoutuminen muuhun kuin kohteeseen. Jotta aptameerejä voitaisiin soveltaa tautien hoidossa ja lääkkeiden kuljetuksessa, niillä tulee olla alhainen dissosiaatiovakio sekä korkea spesifisyys. Kuitenkaan kaikilla valmistetuilla aptameereillä ei ole näitä molempia ominaisuuksia. Esimerkiksi on vaikeaa muodostaa korkean sitoutumisaffiniteetin aptameerejä, sillä aptameerit ovat varautuneet negatiivisesti ja ne sitoutuvat huonosti esimerkiksi proteiinikohteisiin, joissa ei ole positiivisesti varautuneita kationialueita. [7,8]

Aptameerien spesifisyyteen vaikuttavat pH ja ionivahvuus, mitkä voivat rajoittaa aptameerien käyttöä bioanalyseissa. [1] Hianik et al. tutkimuksessa pH:n ja ionivahvuuden vaikutusta aptameerin sitoutumisaffiniteettiin tutkittiin hyödyntämällä detektiossa elektrokemiallisia indikaattoreita ja kvartsikristalli-mikrovaakaa (QCM). Tutkimuksessa huomattiin, että pH pitää yllä aptameerin kolmiulotteista rakennetta, ja että Na⁺-ionit heikensivät trombiinin sitoutumista aptameeriin, johtuen luultavasti ionien suojaavasta vaikutuksesta aptameerin sidoskohdissa. [9] Aptameerien spesifisyyteen voi vaikuttaa myös muutos ympäristössä: aptameeri tunnistaa kohteensa paremmin *in vitro* -valintakokeen puskurissa kuin solu-ympäristössä. [10] Korkea sitoutumisaffiniteetti ja spesifisyys voivat sulkea toisensa pois aptameerien valmistuksessa, sillä eri vaiheissa karsiutuu pois yhdisteitä, joilla on samanlaisuuksia kohteen rakenteen tai kemiallisten ominaisuuksien kanssa, jolloin tarvittavia yhdisteitä voi jäädä pois. [11]

Lämpötila vaikuttaa myös paljon aptameerien sitoutumistehokkuuteen, sillä lämpötilan nousu saattaa häiritä aptameerien sekundääristen ja tertiääristen rakenteiden muodostumista, joiden avulla ne sitoutuvat kohteeseensa. [12,13] Myös aptameerien stabiilisuudessa on puutteita. Lämpötila kiihdyttää myös aptameereille soluissa tapahtuvia endo- ja eksonukleaasientsyymeistä johtuvia hydrolyysireaktioita. [14] Lisäksi pienet aptameerit poistuvat liian tehokkaasti kehosta esimerkiksi munuaisten toimesta, mikä haastaa aptameerien käytön hoidollisissa *in vivo* -sovelluksissa. [2]

Näitä heikkouksia voidaan kuitenkin parantaa muokkaamalla aptameereja kemiallisesti. Aion opinnäytetyössäni perehtyä juuri erilaisiin kemiallisesti muokattuihin aptameereihin ja niiden valmistusmenetelmiin, sekä aptameerien sovelluksiin.

2. Muokkausmenetelmiä

2.1 post-SELEX

Muokkaamattomat aptameerit ovat alttiita nukleaasien aiheuttamalle *in vivo* -hajoamiselle, ja ne myös poistuvat liian nopeasti kehosta munuaisten toimesta. Näitä heikkouksia voidaan kuitenkin lievittää muokkaamalla aptameerejä post-SELEXillä, jolloin aptameereihin voidaan lisätä kemiallisesti modifioituja yksiköitä kuten 2'-F, 2'-OMe- tai LNA-nukleotideja. Nukleaasien aiheuttamaa hajoamista vastaan voidaan aptameerin 2'-OH-ryhmä korvata joko fluoriatomilla (2'-F) tai metoksi- (2'-OMe) ja aminoryhmillä (2'-NH₂). [2]

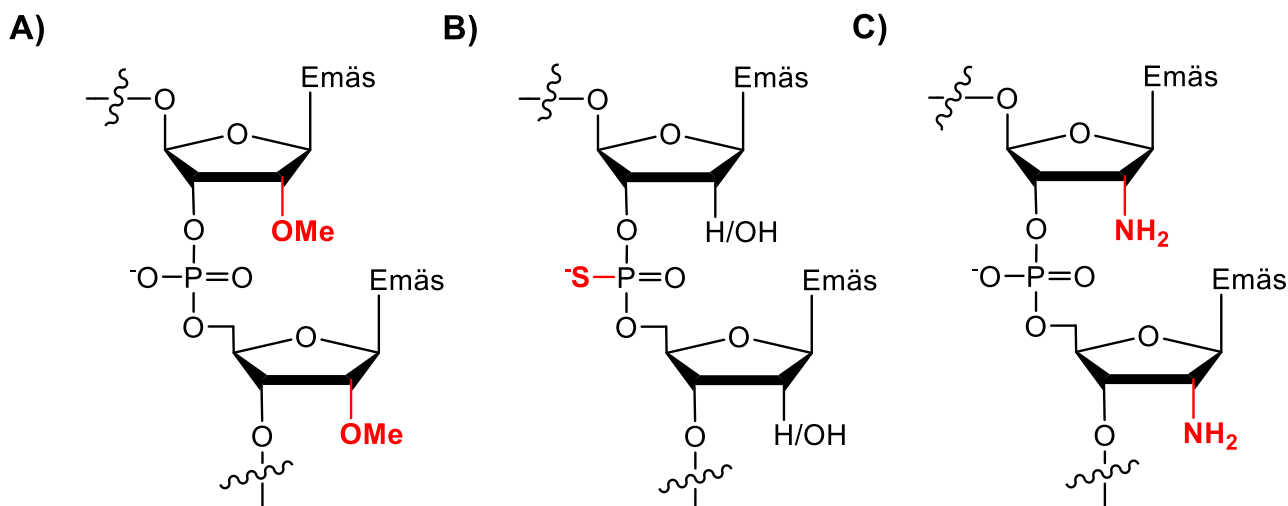
Munuaisten suodattamista vastaan voidaan aptameeriin liittää pieniä molekyyliä kuten esimerkiksi kolesterolia [15] tai PEG:tä (polyetyleeniglykoli), sillä nämä molekyylit lisäävät merkittävästi aptameerien kestävyttä *in vivo*. [16] PEG-yksiköt ovat myrkyttömiä ja amfiilisiä polymeereja, jotka liitetään joko aptameerin 3'- tai 5'-päähen post-SELEXillä. [17] Muita esimerkkejä post-SELEX modifikaatioista, jotka hidastavat suodattumista, ovat 3'-biotiini-streptavidini (SA) biokonjugaatti, liposomit, proteiinit, dendrimeerit sekä epäorgaaniset nanopartikkelit. [20–29]

SELEXin jälkeinen aptameerin kemiallinen muokkaaminen tapahtuu kiinteän faasin oligonukleotidisynteesillä. Tämä muokkaus kohdistuu oligonukleotidien sisäisiin osiin tai sen 3'- ja 5'-päihin. [30] Automatisoidussa kiinteän faasin oligonukleotidisynteesissä aktivoidut ja muokatut fosforiamidiitti-yksiköt liitetään peräkkäin kasvavaan oligonukleotidiketjuun alkaen ensimmäisestä immobilisoidusta nukleosidista. [31,32]

Kun synteesi on valmis, oligonukleotidit irrotetaan kiinteästä kantajasta ja samalla poistetaan nukleoemäksen suojaryhmät käsittelemällä niitä ammoniakkin vesiliuoksella. Jotta saataisiin puhtaita oligonukleotideja täytyy ne lopuksi puhdistaa HPLC:llä tai geelielektroforeesilla. [2]

2.2 ExSELEX

ExSELEX-valintaprotokollalla kehitetään aptameereja, joilla on laajennettu geneettinen koodi. [7,33] Tässä protokollassa kaksijuosteiset oligonukleotidit viedään kiinteäfaasisysteemillä spesifisiin ja ennalta määrättyihin paikkoihin DNA-kirjastoissa. Näitä kaksijuosteisia nukleotideja sisältäviä DNA-kirjastoja voidaan tämän jälkeen inkuboida kohteella ja talteen otetut sekvenssit monistetaan PCR:llä kuudella nukleosiditriposfaatilla. [12,34]



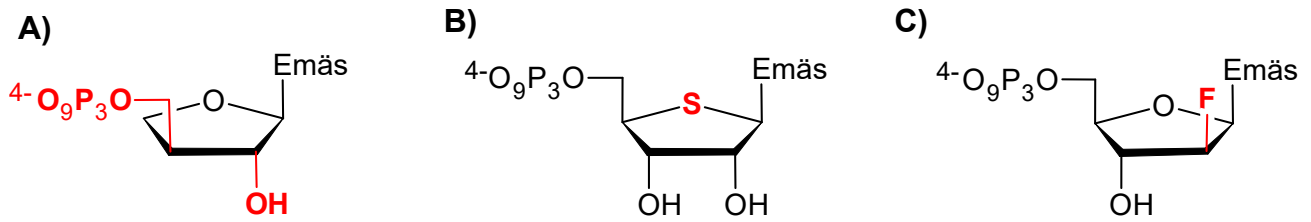
Kuva 1. Muutama esimerkki kemiallisesti modifioiduista aptameereistä. A) 2'-metoksi-RNA: OH-ryhmä on korvattu metoksiryhmällä. B) Fosforotioaatti-DNA/RNA: Yksi fosfaatin hapista on korvattu rikillä. C) 2'-amino-RNA: OH-ryhmä on korvattu aminoryhmällä. Mukailtu lähteestä [2].

2.3 dN*TP:iden entsyymaattinen polymerointi, AEGIS-SELEX, SELMA, napsautusreaktiot

Aptameerien tukirakennetta voidaan muokata kemiallisesti hyödyntämällä kiinteäfaasisynteesiä. Tämä post-SELEX-muokkausmenetelmä on hyödyllinen, kun halutaan tuottaa aptameereja suurella skaalalla. Kuitenkin tässä menetelmässä modifioitujen aptameerien, joilla on samat K_d -arvot kuin modifioimattomilla vastineilla, tunnistamiseen vaaditut SAR-tutkimukset eivät ole täysin luotettavia. Lisäksi joidenkin synteesivaiheiden ankarat olosuhteet eivät sovellu tietyille funktionaalisille ryhmille ja muutenkin oligonukleotidien kiinteäfaasisysteemi soveltuu vain lyhyille, alle sadan nukleotidin pituisille sekvensseille. [35–39]

Nämä ongelmat voitaisiin ratkaista dN*TP:iden entsyymaattisella polymeroinnilla, jossa syntetisoidaan polymeerejä biosyntetisten reittien kautta eristettyjen entsyymien avulla. Tällöin (d)N*TP:itä käytetään vektoreina DNA:n ja RNA:n modifioinnissa edellyttäen, että polymeraasit hyväksyvät ne substraateiksi. [35–39]

dN*TP:iden entsyymaattisen polymeroinnin avulla nukleiinihappoihin voidaan liittää esimerkiksi aminohappomaisia ryhmiä, siirtymämetallien ligandeja ja metallikomplekseja, karboraania, organokatalyysiä välittäviä sivuketjuja, lukittuja ja modifioituja sokerinukleotideja, sekä entsyymejä. [40–49] Tällä metodilla voidaan syntetisoida sekä yksi- että kaksijuosteisia sekvenssejä. [50] Tämä modifioitu SELEX-lähestymistapa on varteenotettava menetelmä, sillä tässä syntyvät aptameerit eivät vaadi SAR-tutkimuksia jälkikäteen. [51,52]



Kuva 2. Esimerkkejä sokerimuokatuista dN*TPs:tä. A) TNA; B) 4'-tio-N*TP; C) FANA. Mukailtu lähteestä [2].

AEGIS-SELEX käyttää luonnottomia nukleotidien muotoja, epästandardeja P:tä ja Z:taa, normaalin neljään emäkseen perustuvan kirjaston lisäksi. Tämä lisää sekvenssien monimuotoisuutta ja laajentaa siten valintatehoa. Tällä menetelmällä voidaan luoda aptameereja, jotka pystyvät sitoutumaan proteiinien hydrofobisiin onteloihin. Lisäksi tällä menetelmällä luoduilla aptameereilla on pieni K_d -arvo, suurempi sekvenssivariaatio ja useita laskoksia. [6]

AEGIS-SELEX:ssä modifioitujen nukleotidien sijainti sekvenssissä selvitetään vaihtoehdoisella sekvensointiprotokollalla. Tässä protokollassa valintakokeesta peräisin oleva rikastettu populaatio monistetaan PCR-menetelmällä käyttäen neljää luonnollista dNTP:tä sekä dPTP:tä ainoana modifikaatioina. Kaikki populaation dZ:at ohjaavat dP-nukleotidien sisällyttämistä, jolloin dZTP:n puuttuminen liittyy virheellisesti luonnolliset dT:n ja dC:n sekvenssissä kaikkia dP-nukleotideja vastapäätä. [53]

SELMA-metodissa jäljitellään hiilihydraatti-proteiini-vuorovaikutuksia. [54] Tässä metodissa modifioituja DNA-kirjastoja luodaan korvaamalla dTTP DNA-hiusneulamallien alustavissa pidennysreaktioissa 5-etyynyli-dUTP:llä. [55] SELMA:n etuja ovat fenotyypin ja genotyypin välinen ero, mikä poistaa tarpeen muuttaa modifioitu DNA modifioimattomaksi DNA:ksi. Lisäksi sen etuna on mahdollisuus liittää kovalenttisesti suuria modifikaatioita oligonukleotideihin. [56]

Etyynyliyksiköillä varustettua DNA-kirjastoa voidaan muokata myös napsautusreaktioilla anindoliatsidin kanssa. Tässä metodissa modifioitua DNA-kirjastoa altistetaan useille valintakierroksille, joiden tuloksena syntyy niin kutsuttu "clickmer" eli napsautusmeeri. [57]

2.4 LOOPER

Emäsmodifioituja DNA-kirjastoja voidaan luoda myös DNA-ligaaseilla dN*TP:iden polymeroinnin sijaan. LOOPER-menetelmässä 5'-fosforyloidut pentanukleotidit, jotka sisältävät yhden C8-modifioidun adenosiininukleotidin kodonia kohden, sisällytetään T4-DNA-ligaasiin. [58,59] LOOPERissa käytetään C8-modifioituja adenosiininukleotideja, koska ne omaksuvat synkonfiguraation N-glykosididoksen ympärillä. Tämä heikentää dupleksien lämpöstabiilisuutta ja lisää samanaikaisen ligaatioreaktion tarkkuutta. [58,60] Kuitenkin tämä SELEX-protokolla vaatii yhä mDNA:n muuntamista modifioimattomaksi DNA:ksi PCR:llä. [61,62]

3. Aptameerien kemialliset modifikaatiot

Kemiallisesti modifioidut aptameerit tarkoittaa aptameereja, joihin on lisätty funktionaalisia ryhmiä, joita ei esiinny luonnollisissa nukleotideissa. Aptameerien kemiallinen modifointi antaa niille useita spatiaalisia konformaatioita ja lisää niiden affiniteettia kohdemolekyyleihin, mikä antaa aptameereille uusia käyttömahdollisuuksia. [1]

3.1 Fosfaattimodifikaatiot

Fosfaattirungon kemialliset modifikaatiot eivät ole yhtä monipuolisia kuin nukleoemäksen ja sokeriryksiköiden modifikaatiot. α -Fosforotioaatit ovat yleisin fosfaattimodifikaatio, joka voidaan lisätä aptameerisiin tukirakenteisiin joko post-SELEXillä tai sisällyttämällä α -tio-(d)N*TP:t valintaprotokollaan. α -tio-(d)N*TP:iden synteessin aikana muodostuu kaksi diastereomeeriä: [Sp] ja [Rp]. Useimmat DNA- ja RNA-polymeraasit hyväksyvät vain [Sp]-konfiguraation substraatit. [Rp]-fosforotioaattia sisältäviä oligonukleotideja saadaan, kun polymerisaatioreaktioissa tapahtuu konfiguraation inversio. [63]

Fosforotioaateissa yksi fosfaatin ei-silloittavista hapista on korvattu rikillä, mikä parantaa aptameerien vastustuskykyä nukleaasien katalysoimaa hajoamista vastaan. [64,65] Fosforoditioaattimodifikaatiossa, eli PS2-modifikaatiossa, molemmat ei-silloittavista hapista on korvattu rikkiatomeilla. [66,67] Aptameerien PS2-modifikaatiot lisäävät aptameerin sitoutumisaffiniteettia sekä nukleaasihajoamisen vastustusta. [68]

3.2 Sokerimodifikaatiot

Post-SELEXillä voidaan liittää aptameereihin myös sokerimuokattuja nukleotidianalogeja kuten HNA:ta (Hexitol Nucleic Acid) tai muokattuja LNA-nukleotideja. [69,70] Synteettisiä geneettisiä

polymeerejä, joissa on sokerimodifikaatioita (kuten FANA, LNA, HNA ja TNA), kutsutaan usein XNA:ksi, eli ksenonukleiinihappoksi. [71,72]

LNA-yksiköitä (Locked Nucleic Acid) voidaan lisätä aptameerisekvensseihin post-SELEXin optimointivaiheessa, joka vaatii rakenne-aktiivisuussuhteen (SAR, structure-activity relationship) tutkimuksia. Näissä tutkimuksissa LNA-yksiköitä lisätään aptameerien rakenteellisiin elementteihin, kuten runkoon tai silmukoihin, minkä jälkeen tutkitaan näiden lisäyksien vaikutuksia aptameerien sitoutumisaffiniteettiin. Vain mutantit, joilla on parhaat sitoutumisaffiniteetit, säilytetään muita *in vivo* -tutkimuksia varten. [73,74]

Kun RNA:ta jäljitteleviä LNA-yksiköitä listataan DNA- tai RNA-aptameereihin, ne lisäävät dupleksien lämpöstabiilisuutta. LNA:ssa sokeri saadaan C3'-endo-konfiguraatioon metyleenilinkkerin avulla, joka yhdistää O2':n sokerin C4'-asemaan. [75] Tämän kaiken lisäksi LNA:n lisääminen on osoittanut parantavan oligonukleotidien vastustuskykyä nukleolyyttistä hajoamista vastaan. [76,77]

UNA (Unlocked Nucleic Acid) on asyklinen RNA:n analogi, josta puuttuu C2'-C3'-sidoks. [78] Tämä rakenne tekee UNA:sta joustavamman, mutta se toisaalta myös laskee muokattujen dupleksien lämpöstabiilisuutta. [79] UNA-modifikaation joustavuutta ja rajallista rakenteellista vaikutusta duplekseihin voidaan hyödyntää sitoutumisaffiniteetin parantamisessa. [80]

FANA on 2'-deoksi-2'-fluori- β -D-arabinoosisubstituutio, eli yksi 2'-modifikaatioista. [81] FANA:n substituutiokuvio lukitsee sokerin B-DNA:n kaltaiseen 2'-endo-konformaatioon. Modifioituilla FANA-oligonukleotideilla on parempi affiniteetti sekä komplementaarisiin DNA- että RNA-sekvensseihin. [82]

1,5-anhydroheksitolinukleiinihapot, eli HNA:t, ovat sokerimodifikaatioita, joissa (deoksi)riboosi on korvattu kuusijäsenisellä heksitoliosalla. [83] HNA muodostaa stabiileja duplekseja komplementaaristen HNA-, RNA- ja joissain määrin myös DNA-sekvenssien kanssa. Se on myös resistentti nukleasien aiheuttamalle hajoamiselle. [84]

Kun nukleiinihapon riboosista poistetaan yksi hiili, saadaan luonnotonta sokeria treosia sisältävä TNA, eli α -L-treosinukleiinihappo, joka on RNA:n analogi. TNA muodostaa stabiileja duplekseja DNA:n, RNA:n ja itsensä kanssa. Sillä on myös korkea biologinen stabiilisuus. [85,86]

3.3 Spiegelmeerit

Spiegelmeerit ovat aptameerejä, jotka koostuvat D-DNA- ja RNA-rungon sijaan L-rungosta, joka on peilikuva villityypin nukleiinihapoille. [87,88] L-nukleotidimuokkaus aptameereissä tekee niistä stabiilimman plasmassa ja veriseerumissa, sekä tekee niistä immunologisesti passiivisia, sillä immuunijärjestelmä eivätkä nukleaasit tunnista nukleiinihappojen peilikuvia. [89] Siis D-riboosin korvaaminen L-riboosilla tekee peilikuva-aptameerista stabiilin. [6]

Spiegelmeerejä valmistetaan kaksivaiheisella SELEX-post-SELEX-protokollalla. Ensimmäisessä vaiheessa D-aptameerit valitaan SELEXillä käyttämällä synteettisiä kohteita, jotka ovat halutun kohteen enantiomeerejä. Seuraavaksi hyödynnetään post-SELEXiä, jossa aptameerit muutetaan vastaaviksi L-oligonukleotideiksi käyttämällä L-fosforamidiittia. [90] Spiegelmeerien kohteena voi olla proteiinien lisäksi luonnollinen D-RNA, koska L-nukleiinihapot eivät pysty sitoutumaan luonnollisiin D-sekvensseihin Watson-Crick-emäspariutumalla. [91]

3.4 ApDCs

Kemiallisesti muokattuja aptameerejä on pääosin käytetty hoidollisissa sovelluksissa, sillä ne ovat parantaneet spesifisyyttä ja ehkäisseet sivuvaikutuksia. [92] Kuitenkin aptameerien hyvä sitoutumisaffiniteetti ja alhainen vuorovaikutus kohteen ulkopuolella tekevät aptameereistä hyviä vaihtoehtoja myös lääkkeiden ohjaamiseen niille tarkoitettuihin kohteisiin. [27,93–95]

Näitä lääkkeitä kuljettavia aptameerejä kutsutaan ApDC:ksi (Aptamer Drug Conjugates). Tavallisesti ApDC:t sisältävät muokkaamattomia DNA- tai RNA-aptameereisekvenssejä, jotka on kytketty lääkelastiin joko suoraan tai epäsuorasti linkkeriyksikön kautta. [96]

3.5 siRNA-aptameerikonjugaatit

On myös kehitetty siRNA-aptameerikonjugaatteja, joissa on muokattuja nukleotidejä. siRNA:t ovat spesifisiä ja niillä on alhainen immunogeenisyys. [97] Kuitenkin niillä on kuljetusongelmia plasmasta soluihin ja myös kohteen ulkopuoliset vaikutukset. [98] On kuitenkin huomattu, että siRNA:n kimeerinen konjugointi modifioituihin aptameereihin lisää siRNA:n terapeuttista tehoa. [99] siRNA-aptameerejä on käytetty esimerkiksi HIV-1:n, munasarjasyövän sekä papilloomavirus E6:n ja E7:n hoitoon. [99–101]

3.6 SOMAmeerit

Aptameerit ovat negatiivisesti varautuneita molekyyliä, joten niiden sitoutuminen negatiivisesti varautuneeseen proteiiniin tai proteiiniin, jolla ei ole kolmiulotteista sitoutumisepitooppia, on huono. Tämän vuoksi on kehitetty SOMAmeereja. [4]

SOMAmeerit valmistetaan sisällyttämällä SELEX-protokollaan dUTP-analogeja, jotka on varustettu hydrofobisilla linkitetyillä C5-amidisivuketjuilla luonnollisen vastineen sijaan. Modifioidut sivuketjut luovat hydrofobisia pintoja, jotka vuorovaikuttavat proteiinikohteissa olevien aminohappojen hydrofobisten alueiden kanssa. [8,102–105]

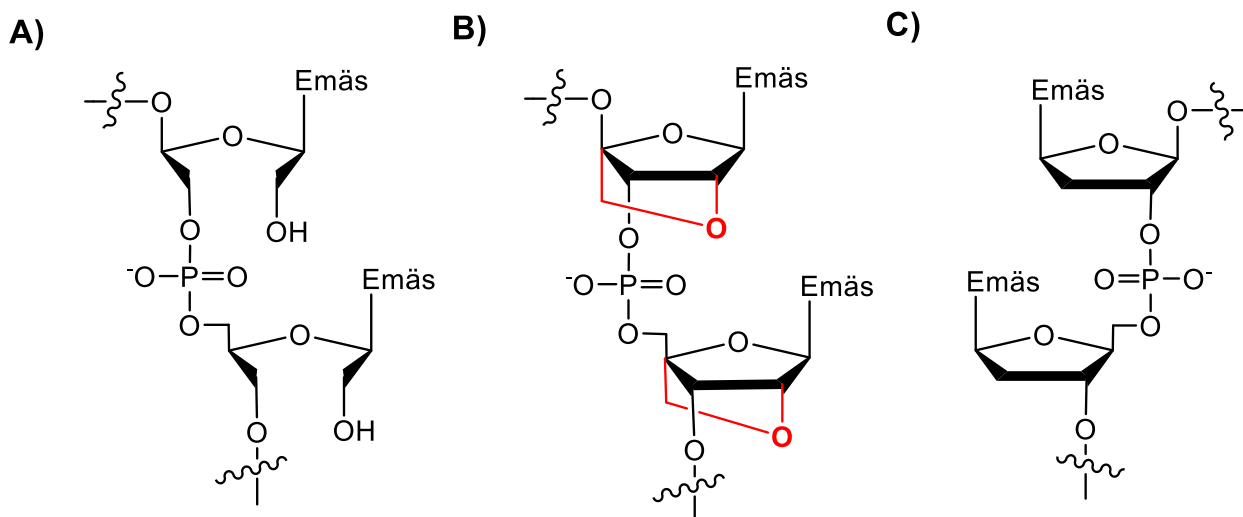
3.7 BAB

SELEXissä on käytetty aminohappomaisten sivuketjujen sijaan myös ylimääräisillä nukleiinihappoemäksillä varustettuja trifosfaatteja eli emäkseen-liitetty-emäs (BAB) -modifikaatiota. [106,107] Kun dUTP:hen lisätään ylimääräinen adensiinin nukleoemäs, se antaa modifioituille DNA-kirjastoille lisää vuorovaikutusmahdollisuuksia sekä vetysidosverkkoja aptameerien sitoutumistehokkuuden parantamiseksi pieniin molekyyliin. [108] Myös muita funktionaalisia ryhmiä, jotka eivät ole aminohapon tai nukleiinihapon kaltaisia, kuten esimerkiksi boorihappo, on otettu mukaan *in vitro* -valintakokeisiin. [109]

3.8 Nukleoemäsmodifikaatiot

Modifikaation sijainnin valinta nukleoemäksessä määräytyy empiiristen sääntöjen mukaan. Esimerkiksi pyrimidiinien C5-asemaan ja 7-deatsapuriinien 7-asemaan jäykkien alkynyli- tai alkenyylilinkkerihaarojen kautta liitetyt funktionaaliset ryhmät johtavat siihen, että lukuisat DNA-polymeraasit hyväksyvät substraatit paremmin. [44,110,111]

Nukleoemäksen tasolla tehdyt modifikaatiot voivat lisätä aptameerien affiniteettia lisäämällä vuorovaikutuksia kohteiden kanssa ja luomalla uusia, sekä sekundäärisiä että tertiäärisiä laskoksia ja rakenteita. [112] Lisäksi, jos nukleoemäkseen lisätään hydrofobisia tähteitä, se vaikuttaa aptameerien stabiilisuuteen positiivisesti, sillä nukleasivälitteiset hajoamiset vähenevät. [113,114] Hydrofobiset sivuketjut vähentävät myös aptameerien poistumaa munuaisten kautta. [115]



Kuva 3. Aptameereja, joilla on hyvä nukleasiresistenssi. A) UNA; B) LNA; C) Spiegelmeeri. Mukailtu lähteestä [2].

4. Kemiallisesti modifioitujen aptameerien sovelluksia

Tavallisimmat käyttökohteet kemiallisesti modifioituille aptameereille ovat lääkkeet, lääkkeenkuljetus sekä muut hoidolliset sovellukset. Aptameereja voidaan lisäksi käyttää myös esimerkiksi biosensoreina ja biomarkkereina.

Biosensoria, jossa on aptameeri tunnistuselementtinä, kutsutaan aptasensoriksi. Näitä voidaan rakentaa eri menetelmillä, ja niitä on moniin eri tarkoituksiin, kuten sähkökemiallisiin, optisiin ja massaherkkyttä vaativiin sovelluksiin. [5] Niitä voidaan käyttää esimerkiksi diagnostiikassa ja detektioteknologiassa. Aptasensorissa on yleensä aptameerinen osa, jota on muokattu transduktiivisella elementillä. Tämä elementti muuntaa kohteen sitoutumistapahtuman tunnistuselementtiin analyttisesti havaittavaksi ja mitattavaksi signaaliksi. Aptasensorien transduktiiviset elementit ovat monipuolisia ja koostuvat koettimista, jotka voivat olla fluoresoivia, luminoivia, tai redox-aktiivisia. Näitä koettimia ovat esimerkiksi fluoreseiini, Tb(III), ferroseeni ja Ru(II)-kompleksit. [116–119]

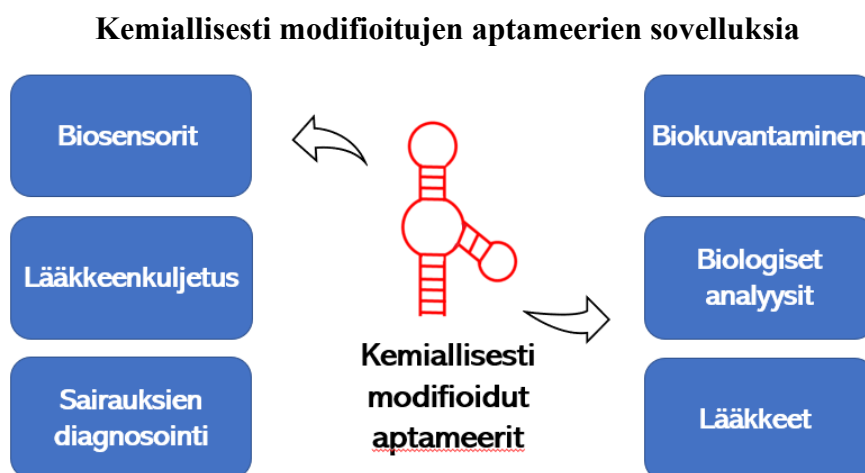
Aptameerien kemiallinen post-SELEX-funktionalisointi biosensoritarkoituksiin tähtää pääasiassa näiden oligonukleotidien ankkurointiin tai immobilisoimiseen pinnoille. [27] Nämä menetelmät sisältävät biotinylaation tai 3'- tai 5'-tioli- tai aminotähteiden liittämisen suoraan kultananopartikkeleihin, kvanttipisteisiin tai grafeenioksideihin, sekä pyreenileimauksen ei-kovalenttista kytkentää varten grafeeniin. [120–124] Aptameerit saadaan immobilisoitua eri pinnoille liittämällä aptameerien päihin erilaisia funktionaalisia ryhmiä. Joitain nukleoemäs- ja

sokerimodifioituja sekvenssejä käytetään parantamaan biosensorien kapasiteettia. Esimerkiksi Spiegelmeerejä käytetään, kun tarvitaan nukleiinihappoja, jotka ovat emäs- tai nukleasiresistenttejä. [125]

Biomarkkereilla saadaan runsaasti tietoa niiden kohteista, mikä auttaa diagnosoimaan sairauksia tarkemmin. Siksi niiden kanssa käytetään aptameereja, jotka pystyvät tunnistamaan kohteensa spesifisesti, ja niitä voidaan myös käyttää sairauksien havaitsemisessa. Jotkut biomarkerit eivät kuitenkaan löydä vastaavia aptameerejä luonnollisia nukleiinihappoja seulomalla. Aptameerien muokkaaminen kemiallisesti mahdollistaa niiden useat spatiaaliset konformaatiot, mikä taas lisää haluttujen nukleiinihappoaptameerien seulonnan todennäköisyyttä. [1]

Kemiallisesti modifioituja aptameereja voidaan soveltaa esimerkiksi syövän hoidossa. Tavallisesti syöpään käytetyt lääkkeet tappavat myös jonkin verran terveitä soluja. Kuitenkin kemiallisesti modifioidut aptameerit ovat hyvin spesifisiä, joten ne voidaan kohdistaa hyvin syöpäsoluihin. Tällöin spesifiset aptameerilääkkeet eivät aiheuta samoja sivuvaikutuksia kuin lääkkeet, joita ei voida kohdistaa suoraan syöpäsoluihin. [1]

Aptameereihin voidaan liittää lisäksi nukleoemäsmodifikaatioita, kuten esimerkiksi SOMAmeereja. [126] Jotta aptameerit voivat havaita mikroympäristön rakenteellisia muutoksia, niissä tulee olla fluoresoivia emäsmodifikaatioita, joiden havaitseminen perustuu emissio-ominaisuuksiin. [127] Aptameereihin perustuvia sensoreita on tärkeä kehittää, sillä niitä voidaan käyttää esimerkiksi hoitopaikkapisteiden diagnostisissa sovelluksissa. [2]



Kuva 4. Muutamia tärkeimpiä kemiallisesti modifioitujen aptameerien sovelluksia. Mukailtu lähteestä [5].

5. Yhteenveto

Aptameerien kemiallinen modifiointi on ratkaisu funktionaalisten nukleinihappojen puutteiden korjaamiseksi [2]. Kemiallisesti modifioituilla aptameereilla on korkeampi affiniteetti ja stabiilisuus kuin muokkaamattomilla aptameereilla. Syy tähän löytyy niiden funktionaalisista ryhmistä, joiden avulla aptameerit muodostavat stabiileja vetysidoksia ja erilaisia aktiivisia kohtia. Aptameerien kemiallinen muokkaus funktionaalisilla ryhmillä aiheuttaa aptameereissa konformaatiomuutoksia. Näin funktionaalisten ryhmien lisääminen aptameereihin lisää niiden ominaisuuksia. [1]

Aptameerien modifiointi voidaan saavuttaa joko täydentämällä satunnaisia kirjastoja funktionaalisilla ryhmillä suoraan SELEX-protokollalla tai post-SELEXin kiinteäfaasisynteisillä. Post-SELEXillä voidaan ottaa käyttöön fosforotioaattiyksiköt, joilla parannetaan nukleasihajoamisresistenssiä. Sillä voidaan myös liittää aptameereihin kemiallisia kokonaisuuksia, jotka vähentävät munuaissuodatusta. [2]

Suuremmat modifikaatiot aiheuttavat kuitenkin usein pieniä rakenteellisia muutoksia, jotka häiritsevät aptameerien sitoutumistehokkuutta. Post-SELEXin optimointi vaatii tämän takia SAR-tutkimuksia sellaisten mutanttien tunnistamiseksi, joilla on hyväksyttävä sitoutumiskyky. Kun funktionalisoidut kirjastot sisällytetään SELEX-protokollaan, syntyville aptameereille ei tarvitse tehdä SAR-tutkimuksia, ja ne voidaan samalla varustaa kemiallisilla kokonaisuuksilla, jotka suosivat vuorovaikutusta niiden kohteiden kanssa. SELEXillä syntetisoituja aptameereja, joissa on (d)N*TP:itä, voidaan myös modifioida edelleen post-SELEX optimoinnilla. [2]

Kemialla on tärkeä rooli kehitettäessä tulevaisuuden modifioituja aptameereja, joilla on paremmat ominaisuudet sekä lääkkeenkuljetuksessa että lääkkeinä. Nukleinihappokemian kehittyminen auttaa kuromaan umpeen aptameerien ja vasta-aineiden välistä kuilua ja myös edesauttaa aptameerien sisällyttämistä klinisiin ja kaupallisiin sovelluksiin. [2] Lisäksi on tärkeää kehittää uusia aptameereja ja jatkaa niiden tutkimista, ja myös kehittää tehokkaampia menetelmiä kemiallisesti muokattujen aptameerien valmistamiseksi, jotta voimme hyödyntää aptameereja yhä tehokkaammin.

6. Lähdeluettelo

- [1] Shen R., Tan J., & Yuan Q. (2020). Chemically Modified Aptamers in Biological Analysis. *ACS Applied Bio Materials*, 3(5), 2816–2826. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00062>.
- [2] Röthlisberger, P., & Hollenstein M. (2018). Aptamer chemistry. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 134, 3–21. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.007>.
- [3] Kinghorn A. B., Fraser L. A., Liang S., Shiu S.C.-C., & Tanner J. A. (2017). Aptamer Bioinformatics. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2516/1. <https://doi.org/10.3390/ijms18122516>.
- [4] Nimjee S. M., White R. R., Becker R. C., & Sullenger B. A. (2017). Aptamers as Therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 57, 61–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558>.
- [5] Song K.-M., Lee S., & Ban C. (2012). Aptamers and their biological applications. *Sensors*, 12(1), 612–631. <https://doi.org/10.3390/s120100612>.
- [6] Ali M. H., Elsherbiny M. E., & Emara M. (2019). Updates on aptamer research. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2511. <https://doi.org/10.3390/ijms20102511>.
- [7] Hirao I., Kimoto M., & Lee K. H. (2017). DNA aptamer generation by ExSELEX using genetical alphabet expansion with a mini-hairpin DNA stabilization method. *Biochimie*, 145, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.09.007>.
- [8] Gelinias A. D., Davies D. R., Edwards T. E., Rohloff J. C., Carter J. D., Zhang C., Gupta S., Ishikawa Y., Hirota M., Nakaishi Y., Jarvis T. C., & Janjic N. (2014). Crystal structure of interleukin-6 in complex with a modified nucleic acid ligand. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 8720–8734. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.532697>
- [9] Hianik T., Ostatná V., Sonlajtnerova M., & Grman I. (2007). Influence of ionic strength, pH and aptamer configuration for binding affinity to thrombin. *Bioelectrochemistry*, 70, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2006.03.012>.
- [10] Shamah S. M., Healy J. M., & Cload S. T. (2008). Complex Target SELEX. *Accounts of Chemical Research*, 41, 130–138. <https://doi.org/10.1021/ar700142z>.
- [11] Dunn M. R., Jimenez R. M., & Chaput J. C. (2017). Analysis of aptamer discovery and technology. *Nature Review Chemistry*, 1. <https://doi.org/10.1038/S41570-017-0076>
- [12] Matsunaga K., Kimoto M., Hanson C., Sanford M., Young H. A., & Hirao I. (2015). Architecture of high-affinity unnatural-base DNA aptamers toward pharmaceutical applications. *Scientific Reports*, 5(7). <https://doi.org/10.1038/srep18478>.

- [13] Harkness R. W., V, Slavkovic S., Johnson P. E., & Mittermaier A. K. (2016). Rapid characterization of folding and binding interactions with thermolabile ligands by DSC. *Chemical Communications*, 52, 13471-13474. <https://doi.org/10.1039/c6cc05576a>.
- [14] Griffin L. C., Tidmarsh G. F., Bock L. C., Toole J. J., & Leung L. L. K. (1993). In Vivo Anticoagulant Properties of a Novel Nucleotide-Based Thrombin Inhibitor and Demonstration of Regional Anticoagulation in Extracorporeal Circuits. *Blood*, 81, 3271-3276. <https://doi.org/10.1182/blood.V81.12.3271.3271>.
- [15] Pfeiffer F., & Mayer G. (2016). Selection and biosensor application of aptamers for small molecules. *Frontiers in Chemistry*, 4(25). <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00025>.
- [16] Rusconi C. P., Roberts J. D., Pitoc G. A., Nimjee S. M., White R. R., Quick G., Scardino E., Fay W. P., & Sullenger B. A. (2004). Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo. *Nature Biotechnology*, 22, 1423–1428. <https://doi.org/10.1038/nbt1023>.
- [17] Burmeister P. E., Lewis S. D., Silva R. F., Preiss J. R., Horwitz L. R., Pendergrast P. S., McCauley T. G., Kurz J. C., Epstein D. M., Wilson C., & Keefe A. D. (2005). Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF. *Cell Chemical Biology*, 12, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.10.017>.
- [18] Boomer R. M., Lewis S. D., Healy J. M., Kurz M., Wilson C., & McCauley T. G. (2005). Conjugation to polyethylene glycol polymer promotes aptamer biodistribution to healthy and inflamed tissues. *Oligonucleotides*, 15, 183–195. <https://doi.org/10.1089/oli.2005.15.183>.
- [19] Greenwald R. B., Choe Y. H., McGuire J., & Conover C. D. (2003). Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 217–250. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00180-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00180-1).
- [20] Dougan H., Lyster D. M., Vo C. V., Stafford A., Weitz J. I., & Hobbs J. B. (2000). Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood. *Nuclear Medicine and Biology*, 27, 289–297. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(99\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(99)00103-1).
- [21] Willis M. C., Collins B., Zhang T., Green L. S., Sebesta D. P., Bell C., Kellogg E., Gill S.C., Magallanez A., Knauer S., Bendele R. A., Gill P. S., & Janjic N. (1998). Liposome-associated vascular endothelial growth factor aptamers. *Bioconjugate Chemistry*, 9, 573–582. <https://doi.org/10.1021/bc980002x>.
- [22] Ara M. N., Matsuda T., Hyodo M., Sakurai Y., Hatakeyama H., Ohga N., Hida K., & Harashima H. (2014). An aptamer ligand based liposomal nanocarrier system that targets tumor endothelial cells. *Biomaterials*, 35, 7110–7120. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.087>.

- [23] Cao Z. H., Tong R., Mishra A., Xu W. C., Wong G. C. L., Cheng J. J., & Lu Y. (2009). Reversible cell specific drug delivery with aptamer-functionalized liposomes. *Angewandte Chemie International Edition*, 48, 6494–6498. <https://doi.org/10.1002/anie.200901452>.
- [24] Heo K., Min S. W., Sung H. J., Kim H. G., Kim H. J., Kim Y. H., Choi B. K., Han S., Chung S., Lee E. S., Chung J., & Kim I. H. (2016). An aptamer-antibody complex (oligobody) as a novel delivery platform for targeted cancer therapies. *Journal of Controlled release*, 229, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.006>.
- [25] Wang R. W., Lu D. Q., Bai H. R., Jin C., Yan G. B., Ye M., Qiu L. P., Chang R. S., Cui C., Liang H., & Tan W. H. (2016). Using modified aptamers for site specific protein-aptamer conjugations. *Chemical Science*, 7, 2157–2161. <https://doi.org/10.1039/c5sc02631h>.
- [26] Zhou J., Soontornworajit B., Martin J., Sullenger B. A., Gilboa E., & Wang Y. (2009). A hybrid DNA aptamer-dendrimer nanomaterial for targeted cell labeling. *Macromolecular Bioscience*, 9, 831–835. <https://doi.org/10.1002/mabi.200900046>.
- [27] Röthlisberger P., Gasse C., & Hollenstein M. (2017). Nucleic acid aptamers: emerging applications in medical imaging, nanotechnology, neurosciences, and drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 2430. <https://doi.org/10.3390/ijms18112430>.
- [28] Latorre A., Posch C., Garcimartin Y., Celli A., Sanlorenzo M., Vujic I., Ma J., Zekhtser M., Rappersberger K., Ortiz-Urda S., & Somoza A. (2014). DNA and aptamer stabilized gold nanoparticles for targeted delivery of anticancer therapeutics. *Nanoscale*, 6, 7436–7442. <https://doi.org/10.1039/c4nr00019f>.
- [29] Niu W. J., Chen X. G., Tan W. H., & Veige A. S. (2016). N-heterocycliccarbene-gold(I) complexes conjugated to a leukemia-specific DNA aptamer for targeted drug delivery. *Angewandte Chemie International Edition*, 55, 8889–8893. <https://doi.org/10.1002/anie.201602702>.
- [30] Ni S. J., Yao H. Z., Wang L. L., Lu J., Jiang F., Lu A. P., & Zhang G. (2017). Chemical modifications of nucleic acid aptamers for therapeutic purposes. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(21). https://doi.org/10.1007/978-3-476-04345-0_3.
- [31] Taskova M., Mantsiou A., & Astakhova K. (2017). Synthetic nucleic acid analogues in gene therapy: an update for peptide-oligonucleotide conjugates. *Chembiochem*, 18, 1671–1682. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700229>.
- [32] Roy S., & Caruthers M. (2013). Synthesis of DNA/RNA and their analogs via phosphoramidite and H-phosphonate chemistries. *Molecules*, 18, 14268–14284. <https://doi.org/10.3390/molecules181114268>.

- [33] Kimoto M, Yamashige R., Matsunaga K, Yokoyama S., & Hirao I. (2013). Generation of high affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet. *Nature Biotechnology*, 31. <https://doi.org/10.1038/nbt.2556>.
- [34] Yamashige R., Kimoto M., Takezawa Y., Sato A., Mitsui T., Yokoyama S., & Hirao I. (2012). Highly specific unnatural base pair systems as a third base pair for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 40(14). <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1068>.
- [35] Sakthivel K., & Barbas C. F. (1998). Expanding the potential of DNA for binding and catalysis: highly functionalized dUTP derivatives that are substrates for thermostable DNA polymerases. *Angewandte Chemie International Edition*, 37, 2872–2875. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19981102\)37:20<2872::AID-ANIE2872>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19981102)37:20<2872::AID-ANIE2872>3.0.CO;2-5).
- [36] Jager S., Rasched G., Kornreich-Leshem H., Engeser M, Thum O., & Famulok M. (2005). A versatile toolbox for variable DNA functionalization at high density. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 15071–15082. <https://doi.org/10.1021/ja051725b>.
- [37] Raindlová V., Pohl R., & Hocek M. (2012). Synthesis of aldehyde-linked nucleotides and DNA and their bioconjugations with lysine and peptides through reductive amination. *Chemistry – A European Journal*, 18, 4080–4087. <https://doi.org/10.1002/chem.201103270>.
- [38] Hollenstein M. (2013). Deoxynucleoside triphosphates bearing histamine, carboxylic acid, and hydroxyl residues – synthesis and biochemical characterization. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 11, 5162–5172. <https://doi.org/10.1039/C3OB40842F>.
- [39] Wang Y. J., Ng N., Liu E. K., Lam C. H., & Perrin D. M. (2017). Systematic study of constraints imposed by modified nucleoside triphosphates with protein-like side chains for use in in vitro selection. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 15, 610–618. <https://doi.org/10.1039/c6ob02335e>.
- [40] Kalachova L., Pohl R., Bednarova L., Fanfrlik J., & Hocek M. (2013). Synthesis of nucleosides and dNTPs bearing oligopyridine ligands linked through an octadiyne tether, their incorporation into DNA and complexation with transition metal cations. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 11, 78–89. <https://doi.org/10.1039/c2ob26881g>.
- [41] Vrabel M., Horakova P., Pivonkova H., Kalachova L., Cernocka H., Cahova H., Pohl R., Sebest P., Havran L., Hocek M., & Fojta M. (2009). Base-modified DNA labeled by Ru(bpy)(3) (2+) and Os(bpy)(3) (2+) complexes: construction by polymerase incorporation of modified nucleoside triphosphates, electrochemical and luminescent properties, and applications. *Chemistry – A European Journal*, 15, 1144–1154. <https://doi.org/10.1002/chem.200801538>.

- [42] Weizman H., & Tor Y. (2002). Redox-active metal-containing nucleotides: synthesis, tunability, and enzymatic incorporation into DNA. *Journal of the American Chemical Society*, *124*, 1568–1569. <https://doi.org/10.1021/ja017193q>.
- [43] Balintova J., Simonova A., Bialek-Pietras M., Olejniczak A., Lesnikowski Z. J., & Hocek M. (2017). Carborane-linked 2'-deoxyuridine 5'-O-triphosphate as building block for polymerase synthesis of carborane-modified DNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *27*, 4786–4788. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.09.064>.
- [44] Hollenstein M. (2012). Synthesis of deoxynucleoside triphosphates that include proline, urea, or sulfonamide groups and their polymerase incorporation into DNA. *Chemistry – A European Journal*, *18*, 13320–13330. <https://doi.org/10.1002/chem.201201662>.
- [45] Diafa S., Evequoz D., Leumann C. J., & Hollenstein M. (2017). Enzymatic synthesis of 7,5-Bicyclo-DNA oligonucleotides. *Chemistry – An Asian Journal*, *12*, 1347–1352. <https://doi.org/10.1002/asia.201700374>.
- [46] Kempeneers V., Vastmans K., Rozenski J., & Herdewijn P. (2003). Recognition of threosyl nucleotides by DNA and RNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, *31*, 6221–6226. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg833>.
- [47] Baccaro A., Steck A. L., & Marx A. (2012). Barcoded nucleotides. *Angewandte Chemie International Edition*, *51*, 254–257. <https://doi.org/10.1002/anie.201105717>.
- [48] Verga D., Welter M., Steck A. L., & Marx A. (2015). DNA polymerase-catalyzed incorporation of nucleotides modified with a G-quadruplex-derived DNAzyme. *Chemical Communications*, *51*, 7379–7381. <https://doi.org/10.1039/c5cc01387a>.
- [49] Welter M., Verga D., & Marx A. (2016). Sequence-specific incorporation of enzyme nucleotide chimera by DNA polymerases. *Angewandte Chemie International Edition*, *55*, 10131–10135. <https://doi.org/10.1002/anie.201604641>.
- [50] Menova P., Raindlova V., & Hocek M. (2013). Scope and limitations of the nicking enzyme amplification reaction for the synthesis of base-modified oligonucleotides and primers for PCR. *Bioconjugate Chemistry*, *24*, 1081–1093. <https://doi.org/10.1021/bc400149q>.
- [51] Aschenbrenner J., & Marx A. (2017). DNA polymerases and biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology*, *48*, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.04.005>.
- [52] Houlihan G., Arangundy-Franklin S., & Holliger P. (2017). Engineering and application of polymerases for synthetic genetics. *Current Opinion in Biotechnology*, *48*, 168–179. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.04.004>.

- [53] Yang Z. Y., Chen F., Alvarado J. B., & Benner S. A. (2011). Amplification, mutation, and sequencing of a six-letter synthetic genetic system. *Journal of the American Chemical Society*, *133*, 15105–15112. <https://doi.org/10.1021/ja204910n>.
- [54] Horiya S., MacPherson I. S., & Krauss I. J. (2014). Recent strategies targeting HIV glycans in vaccine design. *Nature Chemical Biology*, *10*, 990–999. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1685>.
- [55] Röthlisberger P., Levi-Acobas F., & Hollenstein M. (2017). New synthetic route to ethynyl dUTP: a means to avoid formation of acetyl and chloro vinyl base-modified triphosphates that could poison SELEX experiments. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *27*, 897–900. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.01.009>.
- [56] MacPherson I. S., Temme J. S., Habeshian S., Felczak K., Pankiewicz K., Hedstrom L., & Krauss I. J. (2011). Multivalent glycocluster design through directed evolution. *Angewandte Chemie International Edition*, *50*, 11238–11242. <https://doi.org/10.1002/anie.201105555>.
- [57] Tolle F., Brandle G. M., Matzner D., & Mayer G. (2015). A versatile approach towards nucleobase-modified aptamers. *Angewandte Chemie International Edition*, *54*, 10971–10974. <https://doi.org/10.1002/anie.201503652>.
- [58] Kong D. H., Yeung W., & Hili R. (2016). Generation of synthetic copolymer libraries by combinatorial assembly on nucleic acid templates. *ACS Combinatorial Science*, *18*, 355–370. <https://doi.org/10.1021/acscmbosci.6b00059>.
- [59] Hili R., Niu J., & Liu D. R. (2013). DNA ligase-mediated translation of DNA into densely functionalized nucleic acid polymers. *Journal of the American Chemical Society*, *135*, 98–101. <https://doi.org/10.1021/ja311331m>.
- [60] Kong D. H., Lei Y., Yeung W., & Hili R. (2016). Enzymatic synthesis of sequence-defined synthetic nucleic acid polymers with diverse functional groups. *Angewandte Chemie International Edition*, *55*, 13164–13168. <https://doi.org/10.1002/anie.201607538>.
- [61] Holzberger B., Strohmeier J., Siegmund V., Diederichsen U., & Marx A. (2012). Enzymatic synthesis of 8-vinyl- and 8-styryl-2'-deoxyguanosine modified DNA-novel fluorescent molecular probes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *22*, 3136–3139. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.03.056>.
- [62] Hottin A., & Marx A. (2016). Structural insights into the processing of nucleobase-modified nucleotides by DNA polymerases. *Accounts of Chemical Research*, *49*, 418–427. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00544>.
- [63] Eckstein F. (2014). Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acid Therapeutics*, *24*, 374–387. <https://doi.org/10.1089/nat.2014.0506>.

- [64] Eckstein F. (2000). Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them? *Nucleic Acid Therapeutics*, 10, 117–121. <https://doi.org/10.1089/oli.1.2000.10.117>.
- [65] Campbell J. M., Bacon T. A., & Wickstrom E. (1990). Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal-fluid. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 20, 259–267. [https://doi.org/10.1016/0165-022X\(90\)90084-P](https://doi.org/10.1016/0165-022X(90)90084-P).
- [66] Nielsen J., Brill W. K. D., & Caruthers M. H. (1988). Synthesis and characterization of dinucleoside phosphorodithioates. *Tetrahedron Letters*, 29, 2911–2914. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(88\)85045-7](https://doi.org/10.1016/0040-4039(88)85045-7).
- [67] Yang X. B., Fennewald S., Luxon B. A., Aronson J., Herzog N. K., & Gorenstein D. G. (1999). Aptamers containing thymidine 3'-O-phosphorodithioates: synthesis and binding to nuclear factor-kappa B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9, 3357–3362. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(99\)00600-9](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(99)00600-9)
- [68] Abeydeera N. D., Egli M., Cox N., Mercier K., Conde J. N., Pallan P. S., Mizurini D. M., Sierant M., Hibti F. E., Hassell T., Wang T. Z., Liu F. W., Liu H. M., Martinez C., Sood A. K., Lybrand T. P., Frydman C., Monteiro R. Q., Gomer R. H., Nawrot B., & Yang X. B. (2016). Evoking picomolar binding in RNA by a single phosphorodithioate linkage. *Nucleic Acids Research*, 44, 8052–8064. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw725>.
- [69] Kolb G., Reigadas S., Boiziau C., van Aerschot A., Arzumanov A., Gait M. J., Herdewijn P., & Toulme J. J. (2005). Hexitol nucleic acid-containing aptamers are efficient ligands of HIV-1 TAR RNA. *Biochemistry*, 44, 2926–2933. <https://doi.org/10.1021/bi048393s>.
- [70] Morihiro K., Kasahara Y., & Obika S. (2017). Biological applications of xeno nucleic acids. *Molecular Omics*, 13, 235–245. <https://doi.org/10.1039/C6MB00538A>.
- [71] Herdewijn P., & Marlière P. (2009). Toward safe genetically modified organisms through the chemical diversification of nucleic acids. *Chemistry & Biodiversity*, 6, 791–808. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900083>.
- [72] Pinheiro V. B., & Holliger P. (2012). The XNA world: progress towards replication and evolution of synthetic genetic polymers. *Current Opinion in Chemical Biology*, 16, 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.05.198>.
- [73] Darfeuille F., Hansen J. B., Orum H., Primo C. D., & Toulme J. J. (2004). LNA/DNA chimeric oligomers mimic RNA aptamers targeted to the TAR RNA element of HIV-1. *Nucleic Acids Research*, 32, 3101–3107. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh636>.
- [74] Schmidt K. S., Borkowski S., Kurreck J., Stephens A. W., Bald R., Hecht M., Friebe M., Dinkelborg L., & Erdmann V. A. (2004). Application of locked nucleic acids to improve aptamer in

vivo stability and targeting function. *Nucleic Acids Research*, 32, 5757–5765. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh862>.

[75] Singh S. K., & Wengel J. (1998). Universality of LNA-mediated high-affinity nucleic acid recognition. *Chemical Communications*, 1247–1248. <https://doi.org/10.1039/a801571f>.

[76] Wahlestedt C., Salmi P., Good L., Kela J., Johnsson T., Hokfelt T., Broberger C., Porreca F., Lai J., Ren K. K., Ossipov M., Koshkin A., Jakobsen N., Skouv J., Oerum H., Jacobsen M. H., & Wengel J. (2000). Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 5633–5638. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5633>.

[77] Glud S. Z., Bramsen J. B., Dagnaes-Hansen F., Wengel J., Howard K. A., Nyengaard J. R., & Kjems J. (2009). Naked siLNA-mediated gene silencing of lung bronchoepithelium EGFP expression after intravenous administration. *Oligonucleotides*, 19, 163–168. <https://doi.org/10.1089/oli.2008.0175>.

[78] Nielsen P., Dreioe L. H., & Wengel J. (1995). Synthesis and evaluation of oligodeoxynucleotides containing acyclic nucleosides- introduction of 3 novel analogs and a summary. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 3, 19–28. [https://doi.org/10.1016/0968-0896\(94\)00143-Q](https://doi.org/10.1016/0968-0896(94)00143-Q).

[79] Pasternak A., & Wengel J. (2010). Thermodynamics of RNA duplexes modified with unlocked nucleic acid nucleotides. *Nucleic Acids Research*, 38, 6697–6706. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq561>.

[80] Pasternak A., Hernandez F. J., Rasmussen L. M., Vester B., & Wengel J. (2011). Improved thrombin binding aptamer by incorporation of a single unlocked nucleic acid monomer. *Nucleic Acids Research*, 39, 1155–1164. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq823>.

[81] Wilds C. J., & Damha M. J. (2000). 2'-Deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleosides and oligonucleotides (2' F-ANA): synthesis and physicochemical studies. *Nucleic Acids Research*, 28, 3625–3635. <https://doi.org/10.1093/nar/28.18.3625>.

[82] Anzahae M. Y., Watts J. K., Alla N. R., Nicholson A. W., & Damha M. J. (2011). Energetically important C–H···F–C pseudohydrogen bonding in water: evidence and application to rational design of oligonucleotides with high binding affinity. *Journal of the American Chemical Society*, 133, 728–731. <https://doi.org/10.1021/ja109817p>.

[83] Herdewijn P. (2010). Nucleic acids with a six-membered 'carbohydrate' mimic in the backbone. *Chemistry & Biodiversity*, 7, 1–59. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900185>.

[84] Hendrix C., Rosemeyer H., Verheggen I., Seela F., VanAerschot A., & Herdewijn P. (1997). 1',5'-anhydrohexitol oligonucleotides: synthesis, base pairing and recognition by regular

- oligodeoxyribonucleotides and oligoribonucleotides. *Chemistry – A European Journal*, 3, 110–120. <https://doi.org/10.1002/chem.19970030118>.
- [85] Anosova I., Kowal E. A., Sisco N. J., Sau S., Liao J. Y., Bala S., Rozners E., Egli M., Chaput J. C., & Van Horn W. D. (2016). Structural insights into conformation differences between DNA/TNA and RNA/TNA chimeric duplexes. *Chembiochem*, 17, 1705–1708. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600349>.
- [86] Culbertson M. C., Temburnikar K. W., Sau S. P., Liao J. Y., Bala S., & Chaput J. C. (2016). Evaluating TNA stability under simulated physiological conditions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26, 2418–2421. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.03.118>.
- [87] Nolte A., Klussmann S., Bald R., Erdmann V. A., & Furste J. P. (1996). Mirror-design of L oligonucleotide ligands binding to L-arginine. *Nature Biotechnology*, 14, 1116–1119. <https://doi.org/10.1038/nbt0996-1116>
- [88] Klussmann S., Nolte A., Bald R., Erdmann V. A., & Furste J. P. (1996). Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nature Biotechnology*, 14, 1112–1115. <https://doi.org/10.1038/nbt0996-1112>.
- [89] Oberthur D., Achenbach J., Gabdulkhakov A., Buchner K., Maasch C., Falke S., Rehders D., Klussmann S., & Betzel C. (2015). Crystal structure of a mirror-image L-RNA aptamer (Spiegelmer) in complex with the natural L-protein target CCL2. *Nature Communications*, 6(11). <https://doi.org/10.1038/ncomms7923>.
- [90] Purschke W. G., Hoehlig K., Buchner K., Zboralski D., Schwoebel F., Vater A., & Klussmann S. (2014). Identification and characterization of a mirror-image oligonucleotide that binds and neutralizes sphingosine 1-phosphate, a central mediator of angiogenesis. *Biochemical Journal*, 462, 153–162. <https://doi.org/10.1042/BJ20131422>.
- [91] Sczepanski J. T., & Joyce G. F. (2013). Binding of a structured D-RNA molecule by an L-RNA aptamer. *Journal of the American Chemical Society*, 135, 13290–13293. <https://doi.org/10.1021/ja406634g>.
- [92] Dunn M. R., Jimenez R. M., & Chaput J. C. (2017). Analysis of aptamer discovery and technology. *Nature Reviews Chemistry*, 1, 0076. <https://doi.org/10.1038/S41570-017-0076>.
- [93] Zhou J. H., & Rossi J. (2017). Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16, 181–202. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.199>.
- [94] Chen K., Liu B., Yu B., Zhong W., Lu Y., Zhang J. N., Liao J., Liu J., Pu Y., Qiu L. P., Zhang L. Q., Liu H. X., & Tan W. H. (2017). Advances in the development of aptamer drug conjugates for targeted drug delivery. *Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 9, 15. <https://doi.org/10.1002/wnan.1438>.

- [95] Keefe A. D., Pai S., & Ellington A. (2010). Aptamers as therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 537–550. <https://doi.org/10.1038/nrd3141>.
- [96] Zhu G. Z., Niu G., & Chen X. Y. (2015). Aptamer-drug conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, 26, 2186–2197. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00291>.
- [97] Davidson B. L., & McCray P. B. (2011). Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nature Reviews Genetics*, 12, 329–340. <https://doi.org/10.1038/nrg2968>.
- [98] Lee S. H., Kang Y. Y., Jang H. E., & Mok H. (2016). Current preclinical small interfering RNA (siRNA)-based conjugate systems for RNA therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 104, 78–92. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.10.009>.
- [99] McNamara J. O., Andrechek E. R., Wang Y., Viles K. D., Rempel R. E., Gilboa E., Sullenger B. A., & Giangrande P. H. (2006). Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer siRNA chimeras. *Nature Biotechnology*, 24, 1005–1015. <https://doi.org/10.1038/nbt1223>.
- [100] Shaw B. R., Moussa L., Sharaf M., Cheek M., & Dobrikov M. (2008). Boranophosphate siRNA aptamer chimeras for tumor-specific downregulation of cancer receptors and modulators. *Nucleic Acids Symposium Series*, 52, 655–656. <https://doi.org/10.1093/nass/nrn331>.
- [101] Zhou J., & Rossi J. J. (2010). Aptamer-targeted cell-specific RNA interference. *Silence*, 1(4). <https://doi.org/10.1186/1758-907X-1-4>.
- [102] Pi F., Zhang H., Li H., Thiviyanathan V., Gorenstein D. G., Sood A. K., & Guo P. (2017). RNA nanoparticles harboring annexin A2 aptamer can target ovarian cancer for tumor-specific doxorubicin delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13, 1183–1193. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.11.015>.
- [103] Vaught J. D., Bock C., Carter J., Fitzwater T., Otis M., Schneider D., Rolando J., Waugh S., Wilcox S. K., & Eaton B. E. (2010). Expanding the chemistry of DNA for in vitro selection. *Journal of the American Chemical Society*, 132, 4141–4151. <https://doi.org/10.1021/ja908035g>.
- [104] Ren X. M., Gelinis A. D., von Carlowitz I., Janjic N., & Pyle A. M. (2017). Structural basis for IL-1 alpha recognition by a modified DNA aptamer that specifically inhibits IL-1 alpha signaling. *Nature Communications*, 8(13). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00864-2>.
- [105] Davies D. R., Gelinis A. D., Zhang C., Rohloff J. C., Carter J. D., O'Connell D., Waugh S. M., Wolk S. K., Mayfield W. S., Burgin A. B., Edwards T. E., Stewart L. J., Gold L., Janjic N., & Jarvis T. C. (2012). Unique motifs and hydrophobic interactions shape the binding of modified DNA ligands to protein targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 19971–19976. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213933109>.
- [106] Jarvis T. C., Davies D. R., Hisaminato A., Resnicow D. I., Gupta S., Waugh S. M., Nagabukuro A., Wadatsu T., Hishigaki H., Gawande B., Zhang C., Wolk S. K., Mayfield W. S.,

- Nakaishi Y., Burgin A. B., Stewart L. J., Edwards T. E., Gelinas A. D., Schneider D. J., & Janjic N. (2015). Non-helical DNA triplex forms a unique aptamer scaffold for high affinity recognition of nerve growth factor. *Structure*, 23, 1293–1304. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.03.027>.
- [107] Imaizumi Y., Kasahara Y., Fujita H., Kitadume S., Ozaki H., Endoh T., Kuwahara M., & Sugimoto N. (2013). Efficacy of base-modification on target binding of small molecule DNA aptamers. *Journal of the American Chemical Society*, 135, 9412–9419. <https://doi.org/10.1021/ja4012222>.
- [108] Minagawa H., Onodera K., Fujita H., Sakamoto T., Akitomi J., Kaneko N., Shiratori I., Kuwahara M., Horii K., & Waga I. (2017). Selection, characterization and application of artificial DNA aptamer containing appended bases with sub-nanomolar affinity for a salivary biomarker. *Scientific Reports*, 7(9). <https://doi.org/10.1038/srep42716>.
- [109] Li M. Y., Lin N., Huang Z., Du L. P., Altier C., Fang H., & Wang B. H. (2008). Selecting aptamers for a glycoprotein through the incorporation of the boronic acid moiety. *Journal of the American Chemical Society*, 130. <https://doi.org/10.1021/ja801510d>.
- [110] Jager S., Rasched G., Kornreich-Leshem H., Engeser M., Thum O., & Famulok M. (2005). A versatile toolbox for variable DNA functionalization at high density. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 15071–15082. <https://doi.org/10.1021/ja051725b>.
- [111] Hocek M. (2014). Synthesis of base-modified 2'-deoxyribonucleoside triphosphates and their use in enzymatic synthesis of modified DNA for applications in bioanalysis and chemical biology. *The Journal of Organic Chemistry*, 79, 9914–9921. <https://doi.org/10.1021/jo5020799>.
- [112] Dellafiore M. A., Montserrat J. M., & Iribarren A. M. (2016). Modified nucleoside triphosphates for in-vitro selection techniques. *Frontiers in Chemistry*, 4, 13. <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00018>.
- [113] Rohloff J. C., Gelinas A. D., Jarvis T. C., Ochsner U. A., Schneider D. J., Gold L., & Janjic N. (2014). Nucleic acid ligands with protein-like side chains: modified aptamers and their use as diagnostic and therapeutic agents. *Molecular Therapy – Nucleic Acids*, 3, 13. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.49>.
- [114] Gupta S., Hirota M., Waugh S. M., Murakami I., Suzuki T., Muraguchi M., Shibamori M., Ishikawa Y., Jarvis T. C., Carter J. D., Zhang C., Gawande B., Vrkljan M., Janjic N., & Schneider D. J. (2014). Chemically modified DNA aptamers bind interleukin-6 with high affinity and inhibit signaling by blocking its interaction with interleukin-6 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 8706–8719. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.532580>.
- [115] Gupta S., Drolet D. W., Wolk S. K., Waugh S. M., Rohloff J. C., Carter J. D., Mayfield W. S., Otis M. R., Fowler C. R., Suzuki T., Hirota M., Ishikawa Y., Schneider D. J., & Janjic N. (2017).

- Pharmacokinetic properties of DNA aptamers with base modifications. *Nucleic Acid Therapy*, 27, 345–353. <https://doi.org/10.1089/nat.2017.0683>.
- [116] Huang R., Xi Z., Deng Y., & He N. (2016). Fluorescence based aptasensors for the determination of hepatitis B virus e antigen. *Scientific Reports*, 6, 31103. <https://doi.org/10.1038/srep31103>.
- [117] Zhang J., Zhang X., Yang G., Chen J., & Wang S. (2013). A signal-on fluorescent aptasensor based on Tb³⁺ and structure-switching aptamer for label-free detection of Ochra toxin A in wheat. *Biosensors and Bioelectronics*, 41, 704–709. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.09.053>.
- [118] Xu Q., Liu Z., Fu J., Zhao W., Guo Y., Sun X., & Zhang H. (2017). Ratiometric electrochemical aptasensor based on ferrocene and carbon nanofibers for highly specific detection of tetracycline residues. *Scientific Reports*, 7, 14729. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15333-5>.
- [119] Wenjuan Y., Le Goff A., Spinelli N., Holzinger M., Diao G.-W., Shan D., Defrancq E., & Cosnier S. (2013). Electrogenerated trisbipyridyl Ru(II)-nitritoltriacetic-polypyrene copolymer for the easy fabrication of label-free photoelectrochemical immunosensor and aptasensor: application to the determination of thrombin and anti-cholera toxinantibody. *Biosensors and Bioelectronics*, 42, 556–562. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.11.013>.
- [120] Carrasquilla C., Li Y. F., & Brennan J. D. (2011). Surface immobilization of structure-switching DNA aptamers on macroporous sol-gel-derived films for solid-phase biosensing applications. *Analytical Chemistry*, 83, 957–965. <https://doi.org/10.1021/ac102679r>.
- [121] Jo H., & Ban C. (2016). Aptamer-nanoparticle complexes as powerful diagnostic and therapeutic tools. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(9). <https://doi.org/10.1038/emm.2016.44>.
- [122] Zhou D. J. (2012). Quantum dot-nucleic acid/aptamer bioconjugate-based fluorimetric bio sensors. *Biochemical Society Transactions*, 40, 635–639. <https://doi.org/10.1042/BST20120059>.
- [123] Nellore B. P. V., Kanchanapally R., Pramanik A., Sinha S. S., Chavva S. R., Hamme A., & Ray P. C. (2015). Aptamer-conjugated graphene oxide membranes for highly efficient capture and accurate identification of multiple types of circulating tumor cells. *Bioconjugate Chemistry*, 26, 235–242. <https://doi.org/10.1021/bc500503e>.
- [124] Wu G. F., Dai Z. W., Tang X., Lin Z. H., Lo P. K., Meyyappan M., & Lai K. W. C. (2017). Graphene field-effect transistors for the sensitive and selective detection of Escherichia coli using pyrene-tagged DNA aptamer. *Advanced Healthcare Materials*, 6(9). <https://doi.org/10.1002/adhm.201700736>.

- [125] Brumbt A., Ravelet C., Grosset C., Ravel A., Villet A., & Peyrin E. (2005). Chiral stationary phase based on a biostable L-RNA aptamer. *Analytical Chemistry*, 77, 1993–1998. <https://doi.org/10.1021/ac048344l>.
- [126] Gold L., Ayers D., Bertino J., Bock C., Bock A., Brody E. N., Carter J., Dalby A. B., Eaton B. E., Fitzwater T., Flather D., Forbes A., Foreman T., Fowler C., Gawande B., Goss M., Gunn M., Gupta S., Halladay D., Heil J., Heilig J., Hicke B., Husar G., Janjic J., Jarvis T., Jennings S., Katilius E., Keeney T. R., Kim N., Koch T. H., Kraemer S., Kroiss L., Le N., Levine D., Lindsey W., Lollo B., Mayfield W., Mehan M., Mehler R., Nelson S. K., Nelson M., Nieuwlandt D., Nikrad M., Ochsner U., Ostroff R. M., Otis M., Parker T., Pietrasiewicz S., Resnicow D. I., Rohloff J., Sanders G., Sattin S., Schneider D., Singer B., Stanton M., Sterkel A., Stewart A., Stratford S., Vaught J. D., Vrkljan M., Walker J. J., Watrobka M., Waugh S., Weiss A., Wilcox S. K., Wolfson A., Wolk S. K., Zhang C., & Zichi D. (2010). Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. *PLoS One*, 5(17). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015004>.
- [127] Cservenyi T. Z., Van Riesen A. J., Berger F. D., Desoky A., & Manderville R. A. (2016). A simple molecular rotor for defining nucleoside environment within a DNA aptamer protein complex. *ACS Chemical Biology*, 11, 2576–2582. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00437>.