

Aptámeros: agentes diagnósticos y terapéuticos

Frank J. Hernández¹, Juliana Andrea Botero Hincapié²

RESUMEN

Los aptámeros son ácidos nucleicos de cadena sencilla, ADN o ARN, que reconocen una gran variedad de moléculas. Cada aptámero posee una estructura tridimensional particular que le permite unirse con afinidad y especificidad altas a la molécula diana. Los aptámeros tienen propiedades de reconocimiento equiparables a las de los anticuerpos; sin embargo, por la naturaleza de su composición tienen ventajas significativas en cuanto a su tamaño, producción y modificación. Estas características los hacen excelentes candidatos para el desarrollo de nuevas plataformas biotecnológicas. Se han identificado aptámeros con propiedades terapéuticas que han sido evaluados exitosamente en modelos animales; entre ellos, algunos se encuentran en fase clínica y uno ya fue aprobado para tratamiento por la FDA (*Food and Drug Administration*). Todos estos avances ocurridos durante las dos últimas décadas permiten anticipar el protagonismo que tendrán los aptámeros como agentes diagnósticos y terapéuticos en un futuro cercano.

PALABRAS CLAVE

Ácidos Nucleicos; Conductas Terapéuticas; Diagnóstico Clínico; Investigación Biomédica; Marcadores Biológicos; Medicina Clínica; Terapia Biológica

SUMMARY

Aptamers: diagnostic and therapeutic agents

Aptamers are single-stranded DNA or RNA molecules that recognize a variety of target molecules with high levels of affinity and specificity, due to their particular three-dimensional structure. They are similar to antibodies regarding the recognition process. However, they offer significant advantages over antibodies based on their size, ease of production and various chemical modifications. Thus, they are excellent candidates for developing new biotechnological platforms. Up to date, several aptamers with therapeutic properties have been successfully evaluated in animal models and clinical trials. Moreover, one of them has

¹ Investigador Posdoctoral, Departamento de Medicina, Universidad de Iowa, Estados Unidos.

² Estudiante de Microbiología y Bioanálisis, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Correspondencia: Frank J. Hernández; frank-hernandez@uiowa.edu

Recibido: septiembre 12 de 2011

Aceptado: octubre 26 de 2011

already been approved by the FDA. Advances during the last two decades allow to foresee that aptamers will play a key role as diagnostic and therapeutic agents in the near future.

KEY WORDS

Biological Markers; Biomedical Research; Biological Therapy; Clinical Diagnostic; Clinical Medicine; Nucleic Acids; Therapeutical Approaches

INTRODUCCIÓN

Los aptámeros son ácidos nucleicos de cadena sencilla, ADN o ARN, con una estructura tridimensional específica que les permite unirse con alta afinidad a la molécula diana. Etimológicamente el término aptámero proviene del latín *aptus* que significa 'fijar' o 'unir' y del griego *meros* que significa 'partícula'. En 1990, dos grupos diferentes identificaron el método para la generación de aptámeros denominado SELEX (por la sigla en inglés de *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) (1,2). Este método utiliza la química combinatoria para la selección de ácidos nucleicos sintéticos con alta afinidad por su molécula diana. La química combinatoria consiste en la síntesis de un número significativo de moléculas de estructura similar que forman colecciones (bibliotecas) consiguiendo una gran diversidad química, y en la cual se puede tamizar una molécula diana para encontrar miembros (es decir, secuencias) de dicha biblioteca que presenten afinidad (3). En SELEX, estas secuencias individuales se han denominado aptámeros. El método SELEX (figura 1) consiste en la selección de los miembros de una biblioteca (aproximadamente 10^{15} secuencias diferentes) que se unen a la molécula diana. Se puede dividir este método en tres pasos principales: 1) la interacción entre los miembros de la biblioteca y la molécula diana; 2) la selección de los miembros que poseen afinidad por la molécula diana y 3) el enriquecimiento de la biblioteca mediante amplificación usando PCR (por la sigla en inglés de *polymerase chain reaction*). La composición natural de los aptámeros incluye ADN y ARN. Sin embargo, se han incorporado satisfactoriamente al proceso enzimático o de síntesis secuencias con

ácidos nucleicos modificados. Estos últimos han sido evaluados exitosamente mediante ensayos *in vitro* o modelos *in vivo* (4). En el caso de ADN-SELEX (5), la doble cadena se separa y una de sus cadenas sencillas es la forma funcional de la biblioteca. En ARN-SELEX (6) se requieren la transcripción para hacer funcional la biblioteca partiendo de ADN y la transcripción reversa para enriquecerla posteriormente mediante PCR (7).

La posibilidad de obtener aptámeros bajo condiciones diferentes a las fisiológicas abre la puerta para la selección de elementos de reconocimiento en condiciones no convencionales. Un ejemplo de la versatilidad en este aspecto es la toxicidad de una molécula diana. La selección de aptámeros no se ve limitada en ningún caso por la toxicidad u otras condiciones diferentes a las fisiológicas, dado que el proceso se lleva a cabo *in vitro*. Esta es una ventaja de los aptámeros con respecto a los anticuerpos, que generalmente solo pueden ser generados en condiciones fisiológicas (8), en las que la toxicidad es un factor determinante. Por lo anterior, es poco probable o no viable el desarrollo de anticuerpos para un gran número de toxinas. En la actualidad se ha seleccionado un buen número de aptámeros que reconocen una gran variedad de moléculas diana (9), entre las cuales se encuentran: toxinas, compuestos inorgánicos y orgánicos, nucleótidos y sus derivados, cofactores, aminoácidos, carbohidratos, antibióticos, péptidos y proteínas, al igual que estructuras complejas como células (7). Esta diversidad de aptámeros, aunada al hecho de que su selección se hace sin importar el pH o la toxicidad de la molécula diana, lleva a considerar el SELEX como un método genérico (10) que teóricamente permitiría seleccionar aptámeros para cualquier molécula bajo las condiciones elegidas.

La afinidad de los aptámeros se encuentra muy frecuentemente en un rango bajo de nanomolaridad, similar a la reportada para los anticuerpos (11). En los aptámeros la afinidad está ligada al número de ciclos de SELEX que se lleven a cabo y a la efectividad del proceso de separación de secuencias que se unen con alta o baja afinidad a la molécula diana. En algunos casos ha sido posible obtener aptámeros con afinidades destacadas que evidentemente superan a los anticuerpos y para las que se reportan valores de

un dígito picomolar (12). La especificidad mostrada por los aptámeros es otra característica interesante de estos elementos de biorreconocimiento, que se evidencia en su capacidad para diferenciar cambios estructurales mínimos entre la molécula diana y moléculas inespecíficas. Un ejemplo claro de esta característica es el aptámero antiteofilina, que distingue específicamente la teofilina de la cafeína, a pesar de que solo un grupo metilo diferencia estas dos moléculas (13). En la mayoría de las aplicaciones médicas, se logran altos niveles de afinidad y especificidad utilizando anticuerpos (14), pero existen limitaciones en el uso de estos en diversas pruebas clínicas. Algunas de estas limitaciones están relacionadas principalmente con su producción (se

requieren animales o células), variabilidad de cada lote de anticuerpos (15), frecuente inmunogenicidad, su tamaño que dificulta el acceso a compartimentos biológicos pequeños y su susceptibilidad en procesos de desnaturalización (12). En contraste, los aptámeros se seleccionan *in vitro* y se generan de forma reproducible utilizando procedimientos convencionales de síntesis en fase sólida con el método de la fósforo-amidita (16). De igual forma, se los puede modificar fácilmente en el proceso de síntesis para mejorar su estabilidad frente a nucleasas o adicionarles grupos funcionales (ejemplo: grupos fluorescentes) para incrementar su aplicabilidad (17). La tabla 1 muestra las principales ventajas y desventajas en el uso de aptámeros y anticuerpos.



Figura 1. SELEX (*systematic evolution of ligand by exponential enrichment*). A) El inicio consiste en la síntesis química de la biblioteca, que contiene aproximadamente 10^{15} secuencias diferentes. B) La biblioteca y la molécula diana entran en contacto y solo los miembros con afinidad permanecen unidos. C) Se separan los miembros de la biblioteca que se unen y se descartan las secuencias con poca afinidad por la molécula diana. D) Enriquecimiento mediante PCR en las bibliotecas de ADN o por transcripción inversa y PCR en el caso de las bibliotecas de ARN. E) Comienza un nuevo ciclo, que se repetirá hasta encontrar bibliotecas que contengan un grupo indeterminado de secuencias que se unen a la molécula diana. F) Secuenciación del último ciclo para determinar las secuencias individuales con alta afinidad

Tabla 1. Principales ventajas y desventajas de los aptámeros y anticuerpos

	Aptámeros	Anticuerpos
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> - Producción sencilla y reproducible - Pueden ser modificados para incrementar su estabilidad frente a nucleasas (ácidos nucleicos modificados) y también para aumentar su tamaño (pegilación) y evitar la rápida filtración renal - Pueden ser desnaturalizados y utilizados repetidamente - Pueden ser seleccionados en condiciones fisiológicas y no fisiológicas - No son inmunogénicos 	<ul style="list-style-type: none"> - Son las moléculas más ampliamente usadas en terapia y diagnóstico clínico - Su tamaño (~150 Kda) reduce su eliminación mediante filtración renal, y generalmente su vida media es suficiente para la acción terapéutica - Son muy estables en condiciones fisiológicas, no presentan degradación por nucleasas - Pueden producirse sin pago de propiedad intelectual
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> - Su aplicación clínica esta en los primeros pasos - Por su tamaño (5-20 Kda) son eliminados rápidamente por filtración renal, generalmente se requieren modificaciones para alcanzar niveles terapéuticos - Son degradados por nucleasas en ambientes fisiológicos, generalmente deben ser modificados para uso clínico - SELEX es un método patentado que requiere pago de propiedad intelectual para uso comercial 	<ul style="list-style-type: none"> - Producción dependiente de animales o células (variabilidad en cada lote) - Su modificación genera en muchos casos reducción o pérdida de su capacidad de reconocimiento - Cualquier episodio de desnaturalización generalmente reduce o anula su capacidad de reconocimiento - Solo pueden ser seleccionados en condiciones fisiológicas - La inmunogenicidad es un problema asociado al uso de anticuerpos

Se ha explorado la utilización de aptámeros como elementos de biorreconocimiento en el desarrollo de numerosos tipos de biosensores, integrándolos de forma eficiente a distintos sistemas transductivos (18-20). Una ventaja de los aptámeros en el desarrollo de biosensores es la estabilidad durante su vida útil, que es generada por su naturaleza química. Los aptámeros pueden ser desnaturalizados mediante aumento de la temperatura o del pH, pero luego pueden retornar a su estado activo utilizando las condiciones óptimas de reconocimiento (buffer, temperatura, etc.) (21). Todo lo anterior contrasta con los anticuerpos en los que cualquier episodio de desnaturalización generalmente les produce una pérdida en la capacidad de reconocimiento y por lo tanto en su función en un sensor (22).

Es de destacar que algunos aptámeros han sido adaptados exitosamente a métodos convencionales como ELISA (23), PCR (24), citometría de flujo (25) y microscopía de fluorescencia (26). De igual forma, algunas técnicas mucho más sofisticadas han incorporado los aptámeros como moléculas de reconocimiento; entre ellas se encuentran SPR (por

la sigla en inglés de *superficial plasmon resonance*) (27) y AFM (por la sigla en inglés de *atomic force microscopy*) (28). Uno de los ejemplos más claros de la flexibilidad que ofrecen estos ácidos nucleicos es el aptámero antitrombina (TBA, por la sigla en inglés de *thrombin-binding aptamer*): es una secuencia de ADN con 15 oligonucleótidos (5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3') y es posiblemente el aptámero más popular y con el mayor número de aplicaciones científicas, con más de 400 publicaciones. TBA fue seleccionado por Bock y colaboradores (29) y desde entonces se lo ha utilizado como modelo en diversas aplicaciones nanotecnológicas (30,31). Una particularidad de este aptámero es su estructura G-cuádruple (figura 2), que ha facilitado su adaptación a diferentes biosensores entre los que se destacan los de tipo óptico (32), fluorescente (33) y electroquímico (21). Con la idea de profundizar en el diagnóstico clínico y la terapia basados en aptámeros, hemos seleccionado un ejemplo representativo en cada caso. Analizaremos los aptámeros anti-IgE y anti-VEGF en los contextos diagnóstico y terapéutico, respectivamente.

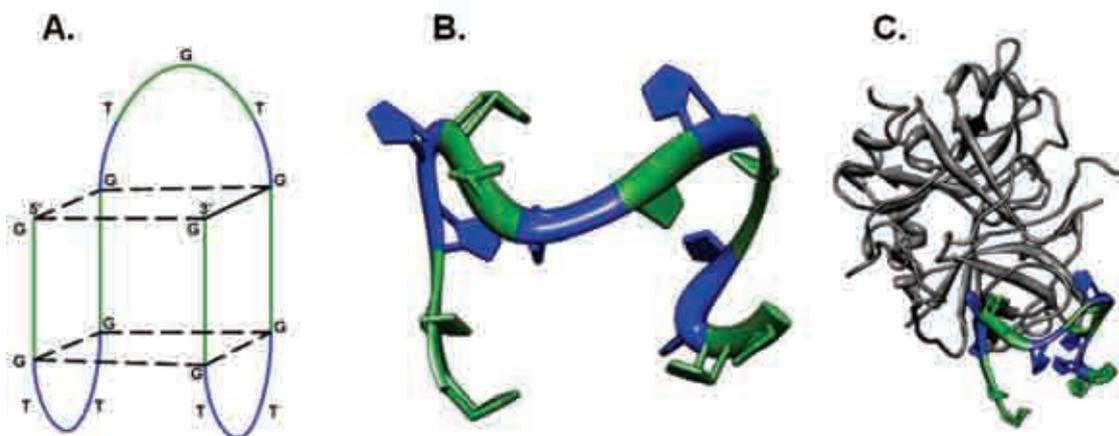


Figura 2. A) Esquema de la estructura G-cuádruple de TBA. B) Estructura 3D de TBA, utilizando resonancia magnética nuclear. C) Su interacción con trombina (gris). Las guaninas están representadas en verde y las timinas en azul

Aptámeros en el diagnóstico clínico

A pesar de los grandes avances en la identificación de aptámeros y la utilidad demostrada como moléculas de biorreconocimiento, solo en algunos casos se los ha utilizado en el diagnóstico en muestras clínicas. Por esa razón, se puede decir que aún falta un paso definitivo que genere evidencia sobre su aplicabilidad en dicho diagnóstico. Sin embargo, un gran avance en esta dirección lo están llevando a cabo Gold y colaboradores (34). Recientemente han descrito un sensor proteómico basado en aptámeros que mide simultáneamente 813 proteínas diferentes provenientes de una pequeña muestra de sangre. La efectividad clínica de este multisensor se demostró mediante la identificación del perfil de proteínas de enfermedades como la falla renal crónica y el cáncer de pulmón. Es, sin duda, un buen comienzo para la entrada definitiva de los aptámeros en el campo del diagnóstico clínico. Otro buen ejemplo en este sentido es el aptámero anti-IgE que se utilizó en la identificación de IgE presente en el suero sanguíneo de 50 muestras clínicas (35). Utilizaremos este aptámero como modelo ilustrativo de la aplicabilidad de estos elementos de biorreconocimiento en muestras clínicas.

Aptámero anti-IgE

Las personas que sufren cuadros alérgicos presentan con frecuencia niveles elevados de IgE comparadas

con las no alérgicas. Por lo tanto, se puede deducir la importancia de cuantificar los niveles de IgE en el tratamiento de un episodio alérgico (36). La determinación de IgE se hace generalmente mediante ELISA o radioinmunoanálisis (RIA). Sin embargo, estos métodos son costosos y consumen mucho tiempo (37). Partiendo de la necesidad de una detección de IgE mucho más rápida y confiable, Yao y colaboradores desarrollaron un sensor basado en aptámeros que mide en 15 minutos los niveles de IgE, de forma específica y reproducible (35). Este sensor utiliza una microbalanza de cristal de cuarzo en la que previamente se ha inmovilizado el aptámero anti-IgE. Una vez que dicho aptámero reconoce la IgE en solución (suero), el biosensor traduce su nivel que es directamente proporcional a la masa depositada en él (figura 3). Este tipo de dispositivos abre una puerta hacia la utilización generalizada de aptámeros en muestras clínicas, campo en el que aún predominan los anticuerpos como moléculas de biorreconocimiento. Es posible entonces, que la tecnología basada en aptámeros sea una alternativa futura para el diagnóstico clínico, cuando se generen sensores eficientes y de bajo costo que puedan competir con los métodos convencionales.

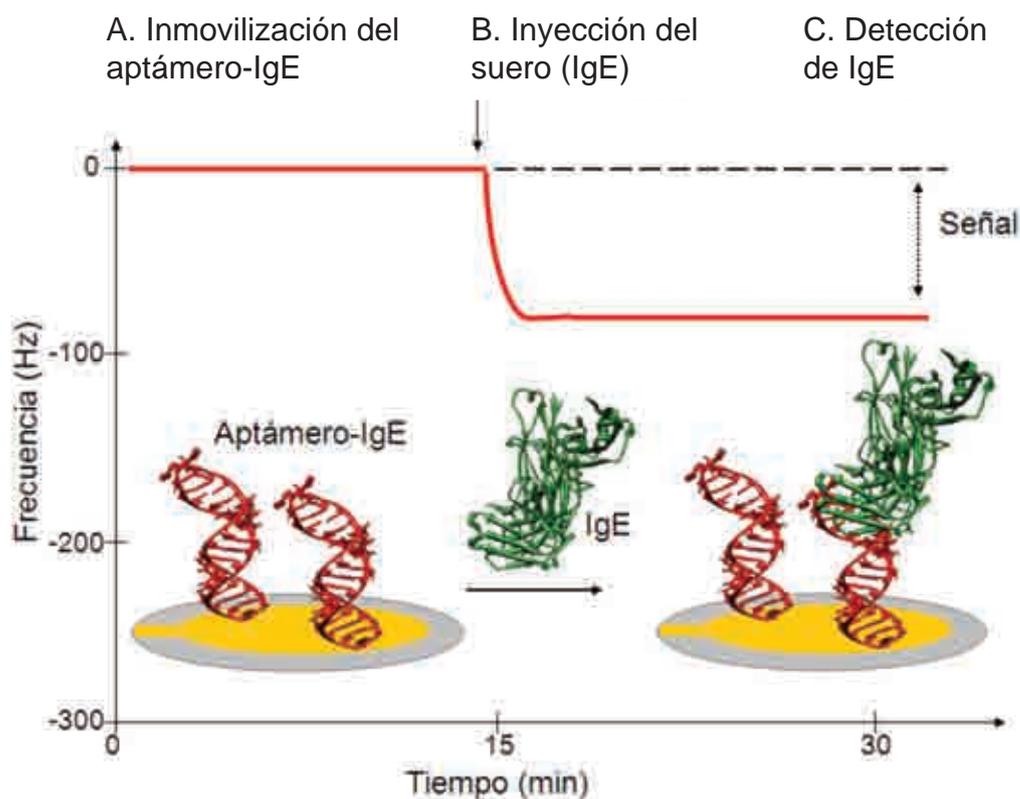


Figura 3. Esquema de la detección de IgE utilizando aptámeros: el dispositivo desarrollado por Yao y colaboradores utiliza una microbalanza de cuarzo, en la que previamente se inmoviliza el aptámero anti-IgE (A). Se inyecta el suero sanguíneo (B) y la IgE presente en la muestra se detecta por el aptámero anti-IgE. La unión entre el aptámero anti-IgE y la IgE presente en la solución genera un aumento de la masa en la superficie del sensor (C). Este cambio de masa se traduce en un cambio de frecuencia (señal) que es directamente proporcional a la concentración de IgE

Aptámeros como agentes terapéuticos

Los aptámeros han tenido un gran impacto en el desarrollo de nuevas terapias; se destacan las orientadas a las enfermedades hematológicas (38), el cáncer (39) y la infección por VIH (40). En la revisión llevada a cabo por Keefe y colaboradores, se recopilaron los aptámeros más destacados en modelos terapéuticos (12). Los aptámeros se pueden usar en dos formas diferentes en el desarrollo de procesos terapéuticos: 1. Como moléculas efectoras para reconocer un receptor y ejercer directamente la función terapéutica (41); 2. Como vehículos para la entrega de una molécula secundaria. En este caso, se utiliza el aptámero únicamente como elemento

de biorreconocimiento, que es modificado con la molécula secundaria encargada de la acción terapéutica (42,43). Dada la facilidad de modificación de los aptámeros, incluso en el proceso de síntesis, actualmente están compitiendo con péptidos (44) y anticuerpos (45) en el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos, lo que evidencia el notorio avance logrado durante los últimos años en este campo. En la actualidad ocho aptámeros se encuentran en fase clínica y uno ya fue aprobado para uso clínico (tabla 2). Este último es el aptámero anti-VEGF (por la sigla en inglés de *vascular endothelial growth factor*) y lo analizaremos más detenidamente a manera de ejemplo.

Tabla 2. Aptámeros en fase clínica

Aptámero	Molécula diana	Uso/Indicación	Fase clínica	Ref.
Pegaptanib –sódico (Macugen®)	VEGF ₁₆₅	Degeneración macular asociada a la edad (DMAE)	Aprobado	[46]
		Retinopatía diabética	Fase III	[47]
		Oclusión de la vena retiniana	Fase II	[48]
ARC1779 (Archemix)	Factor von Willebrand	Microangiopatía trombótica	Fase II	[49]
E10030 (Ophthotech)	PDGF-B	DMAE	Fase II	NCT01-089517
AS1411 -AGRO001 (Antisoma – Archemix)	Nucleolin	Leucemia mieloide aguda	Fase II	[50]
REG-1 – RB006/RB007 (Regado Bioscience)	Factor IXa	Intervención coronaria percutánea	Fase II	[51]
NU172 (ARCA Biopharma)	Trombina	Cirugía de derivación de las arterias coronarias	Fase II	[52]
ARC1905 (Ophthotech)	C5	DMAE	Fase I	[53]
NOX-A12 (NOXXON Pharma)	SDF-1α	Linfoma	Fase I	[54]
NOX-E36 (NOXXON Pharma)	CCL2	Diabetes tipo 2 y nefropatía diabética	Fase I	[54]

Aptámero anti-VEGF

El anti-VEGF (pegaptanib - Macugen®) es el primer aptámero aprobado por la FDA y se lo utiliza en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) (55,56). Esta enfermedad oftalmológica se caracteriza por el deterioro de la mácula, tejido de color amarillento sensible a la luz, localizado en el centro de la retina, cuya función está ligada a la nitidez visual; por lo tanto, está encargado de las percepciones visuales finas (57). El proceso patológico consiste en la pérdida de nitidez y agudeza visuales. De hecho, la DMAE es la principal causa mundial de ceguera (58). Por esta razón, se han hecho esfuerzos significativos para el desarrollo de nuevas terapias para esta enfermedad. Una de las estrategias se basa en utilizar el aptámero anti-VEGF inyectado intravítreo que reconoce la molécula VEGF₁₆₅, lo que inhibe la unión a su receptor natural y es así como se genera el proceso terapéutico, porque se evita la proliferación y migración de vasos sanguíneos hacia el humor vítreo

(59). Los reportes de la utilización de este aptámero son promisorios: ha generado una inhibición de 65% y 80% en modelos animales y 80% de los pacientes que participaron en las pruebas clínicas se estabilizaron o mejoraron después de tres meses de tratamiento (49). En la actualidad más de 50.000 pacientes han sido tratados con pegaptanib con resultados satisfactorios (49). Con base en aptámeros hay, sin lugar a dudas, una posibilidad real de desarrollar nuevos enfoques terapéuticos y cabe destacar que se están adelantando pruebas clínicas para otros aptámeros de los que se tendrán noticias en los próximos años. Esperamos entonces que el aptámero anti-VEGF sea solo el inicio de una generación de nuevos agentes terapéuticos.

CONCLUSIÓN

Los aptámeros son moléculas muy versátiles que se han adaptado a diversas plataformas de detección,

contribuyendo a mejorar el campo de los biosensores. Entre sus principales ventajas se encuentran la toxicidad e inmunogenicidad bajas y la facilidad para producirlos y modificarlos. En cuanto a su aplicación en muestras clínicas aún está en los primeros pasos. Sin embargo, recientemente se han informado indicios significativos del potencial en este campo. Desde el punto de vista terapéutico, se los puede considerar como los nuevos candidatos en el desarrollo de estrategias biotecnológicas. Dado el número de aptámeros que se encuentran actualmente en fase clínica, es muy probable que un número significativo de ellos esté disponible comercialmente en un futuro cercano. Hay muchos puntos por mejorar en esta nueva plataforma tecnológica, pero los avances significativos en los últimos años, tales como la incorporación enzimática de ácidos nucleicos modificados, o las modificaciones post-SELEX, que aumentan la estabilidad en ambientes fisiológicos, permiten anticipar que los aptámeros serán utilizados como elementos genéricos de reconocimiento que podrían solucionar algunas de las dificultades terapéuticas actuales.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran la ausencia de conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990 Aug 30;346(6287):818–22.
2. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*. 1990 Aug 3;249(4968):505–10.
3. Renner S, Popov M, Schuffenhauer A, Roth H-J, Breitenstein W, Marzinzik A, et al. Recent trends and observations in the design of high-quality screening collections. *Future Med Chem*. 2011 Apr;3(6):751–66.
4. Wang RE, Wu H, Niu Y, Cai J. Improving the stability of aptamers by chemical modification. *Curr Med Chem*. 2011 Jan;18(27):4126–38.
5. Sefah K, Shangguan D, Xiong X, O'Donoghue MB, Tan W. Development of DNA aptamers using Cell-SELEX. *Nat Protoc*. 2010 Jan;5(6):1169–85.
6. Lau JL, Baksh MM, Fiedler JD, Brown SD, Kussrow A, Bornhop DJ, et al. Evolution and protein packaging of small-molecule RNA aptamers. *ACS nano*. 2011 Oct 25;5(10):7722–9.
7. Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX: A revolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng*. 2007 Oct;24(4):381–405.
8. Fahrner RL, Knudsen HL, Basey CD, Galan W, Feuerhelm D, Vanderlaan M, et al. Industrial purification of pharmaceutical antibodies: development, operation, and validation of chromatography processes. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2001 Jan;18:301–27.
9. Tombelli S, Mascini M. Aptamers biosensors for pharmaceutical compounds. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2010 Aug;13(7):641–9.
10. Freeman R, Li Y, Tel-Vered R, Sharon E, Elbaz J, Willner I. Self-assembly of supramolecular aptamer structures for optical or electrochemical sensing. *Analyst*. 2009 Apr;134(4):653–6.
11. Famulok M, Mayer G. Aptamer modules as sensors and detectors. *Acc Chem Res*. 2011 Dec 20;44(12):1349–58.
12. Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Jul;9(7):537–50.
13. Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science*. 1994 Mar 11;263(5152):1425–9.
14. Chiarella P. Production, novel assay development and clinical applications of monoclonal antibodies. Recent patents on anti-cancer drug discovery. 2011 May;6(2):258–67.
15. Siegel DL. Recombinant monoclonal antibody technology. *Transfus Clin Biol*. 2002 Jan;9(1):15–22.
16. Cobb AJA. Recent highlights in modified oligonucleotide chemistry. *Org Biomol Chem*. 2007 Oct 21;5(20):3260–75.
17. Weisbrod SH, Marx A. Novel strategies for the site-specific covalent labelling of nucleic acids. *Chem Commun (Camb)*. 2008 Nov 30;(44):5675–85.

18. Mairal T, Ozalp VC, Lozano Sánchez P, Mir M, Katakis I, O'Sullivan CK. Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal Bioanal Chem*. 2008 Feb;390(4):989–1007.
19. Szpechciński A, Grzanka A. [Aptamers in clinical diagnostics]. *Postepy Biochem*. 2006 Jan;52(3):260–70.
20. Tombelli S, Minunni M, Mascini M. Analytical applications of aptamers. *Biosens Bioelectron*. 2005 Jun 15;20(12):2424–34.
21. Radi A-E, Acero Sánchez JL, Baldrich E, O'Sullivan CK. Reagentless, reusable, ultrasensitive electrochemical molecular beacon aptasensor. *J Am Chem Soc*. 2006 Jan 11;128(1):117–24.
22. Jayasena SD. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem*. 1999 Sep;45(9):1628–50.
23. Tennico YH, Hutanu D, Koesdjojo MT, Bartel CM, Remcho VT. On-chip aptamer-based sandwich assay for thrombin detection employing magnetic beads and quantum dots. *Anal Chem*. 2010 Jul 1;82(13):5591–7.
24. Pinto A, Bermudo Redondo MC, Ozalp VC, O'Sullivan CK. Real-time apta-PCR for 20 000-fold improvement in detection limit. *Mol Biosyst*. 2009 May;5(5):548–53.
25. Soontornworajit B, Wang Y. Nucleic acid aptamers for clinical diagnosis: cell detection and molecular imaging. *Anal Bioanal Chem*. 2011 Feb;399(4):1591–9.
26. Chen F, Hu Y, Li D, Chen H, Zhang X-L. CS-SELEX generates high-affinity ssDNA aptamers as molecular probes for hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *PloS one*. 2009 Jan;4(12):e8142.
27. Hernandez FJ, Dondapati SK, Ozalp VC, Pinto A, O'Sullivan CK, Klar TA, et al. Label free optical sensor for Avidin based on single gold nanoparticles functionalized with aptamers. *J Biophotonics*. 2009 Apr;2(4):227–31.
28. Diculescu VC, Chiorcea-Paquim A-M, Eritja R, Oliveira-Brett AM. Thrombin-Binding Aptamer Quadruplex Formation: AFM and Voltammetric Characterization. *J Nucleic Acids*. 2010 Jan;2010.
29. Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*. 1992 Feb 6;355(6360):564–6.
30. Willner I, Zayats M. Electronic aptamer-based sensors. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2007 Jan;46(34):6408–18.
31. Bing T, Liu X, Cheng X, Cao Z, Shangguan D. Bifunctional combined aptamer for simultaneous separation and detection of thrombin. *Biosens Bioelectron*. 2010 Feb 15;25(6):1487–92.
32. Lin P-H, Chen R-H, Lee C-H, Chang Y, Chen C-S, Chen W-Y. Studies of the binding mechanism between aptamers and thrombin by circular dichroism, surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011 Dec 1;88(2):552–8.
33. Hong H, Goel S, Zhang Y, Cai W. Molecular imaging with nucleic acid aptamers. *Curr Med Chem*. 2011 Jan;18(27):4195–205.
34. Gold L, Ayers D, Bertino J, Bock C, Bock A, Brody EN, et al. Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. *PloS one*. 2010 Jan;5(12):e15004.
35. Yao C, Qi Y, Zhao Y, Xiang Y, Chen Q, Fu W. Aptamer-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE. *Biosens Bioelectron*. 2009 Apr 15;24(8):2499–503.
36. Hamilton RG. Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S284–96.
37. Wang X, Chen H, Lin J-M, Ying X. Development of a highly sensitive and selective microplate chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of free thyroxine in human serum. *Int J Biol Sci*. 2007 Jan;3(5):274–80.
38. Shigdar S, Ward AC, De A, Yang CJ, Wei M, Duan W. Clinical applications of aptamers and nucleic acid therapeutics in haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2011 Oct;155(1):3–13.
39. Cerchia L, Hamm J, Libri D, Tavitian B, de Franciscis V. Nucleic acid aptamers in cancer medicine. *FEBS Lett*. 2002 Sep 25;528(1-3):12–6.
40. Neff CP, Zhou J, Remling L, Kuruvilla J, Zhang J, Li H, et al. An aptamer-siRNA chimera suppresses HIV-1 viral loads and protects from helper CD4(+) T cell decline in humanized mice. *Sci Transl Med*. 2011 Jan 19;3(66):66ra6.
41. Cerchia L, Ducongé F, Pestourie C, Boulay J, Aissouni Y, Gombert K, et al. Neutralizing aptamers from

whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase. *PLoS Biol.* 2005 Apr;3(4):e123.

42. Dassie JP, Liu X-Y, Thomas GS, Whitaker RM, Thiel KW, Stockdale KR, et al. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nat Biotechnol.* 2009 Sep;27(9):839–49.
43. Min K, Jo H, Song K, Cho M, Chun Y-S, Jon S, et al. Dual-aptamer-based delivery vehicle of doxorubicin to both PSMA (+) and PSMA (-) prostate cancers. *Biomaterials.* 2011 Mar;32(8):2124–32.
44. Johnson RM, Harrison SD, Maclean D. Therapeutic applications of cell-penetrating peptides. *Methods Mol Biol.* 2011 Jan;683:535–51.
45. Janowitz T. Biopharmaceuticals and monoclonal antibodies in oncology trials--a cross-sectional analysis. *Protein Eng Des Sel.* 2011 Jan;24(1-2):105–11.
46. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, Feinsod M, Guyer DR. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2004 Dec 30;351(27):2805–16.
47. Nicholson BP, Schachat AP. A review of clinical trials of anti-VEGF agents for diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2010 Jul;248(7):915–30.
48. Wroblewski JJ, Wells JA, Adamis AP, Buggage RR, Cunningham ET, Goldbaum M, et al. Pegaptanib sodium for macular edema secondary to central retinal vein occlusion. *Arch Ophthalmol.* 2009 Apr;127(4):374–80.
49. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Jun;5(6):471–84.
50. Bates PJ, Laber DA, Miller DM, Thomas SD, Trent JO. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp Mol Pathol.* 2009 Jun;86(3):151–64.
51. Yu D, Wang D, Zhu F-G, Bhagat L, Dai M, Kandimalla ER, et al. Modifications incorporated in CpG motifs of oligodeoxynucleotides lead to antagonist activity of toll-like receptors 7 and 9. *J Med Chem.* 2009 Aug 27;52(16):5108–14.
52. Sheehan JP, Lan HC. Phosphorothioate oligonucleotides inhibit the intrinsic tenase complex. *Blood.* 1998 Sep 1;92(5):1617–25.
53. Esposito CL, Catuogno S, de Franciscis V, Cerchia L. New insight into clinical development of nucleic acid aptamers. *Discov Med.* 2011 Jun;11(61):487–96.
54. Sayyed SG, Hägele H, Kulkarni OP, Endlich K, Segerer S, Eulberg D, et al. Podocytes produce homeostatic chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12, which contributes to glomerulosclerosis, podocyte loss and albuminuria in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2009 Nov;52(11):2445–54.
55. Emerson MV, Lauer AK. Current and emerging therapies for the treatment of age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol.* 2008 Jun;2(2):377–88.
56. Spitzer MS, Yoeruek E, Sierra A, Wallenfels-Thilo B, Schraermeyer U, Spitzer B, et al. Comparative antiproliferative and cytotoxic profile of bevacizumab (Avastin), pegaptanib (Macugen) and ranibizumab (Lucentis) on different ocular cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007 Dec;245(12):1837–42.
57. Yuan A, Kaiser PK. Emerging therapies for the treatment of neovascular age related macular degeneration. *Semin Ophthalmol.* 2011 May;26(3):149–55.
58. Trujillo CA, Nery AA, Alves JM, Martins AH, Ulrich H. Development of the anti-VEGF aptamer to a therapeutic agent for clinical ophthalmology. *Clin Ophthalmol.* 2007 Dec;1(4):393–402.
59. Ng EWM, Shima DT, Calias P, Cunningham ET, Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Feb;5(2):123–32.

