



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
2-0001908

(51)⁷ **G01N 33/551, C12N 15/115**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00164

(22) 21.12.2015

(67) 1-2016-01392

(45) 25.12.2018 369

(43) 27.06.2016 339

(73) **VIỆN VẬT LÝ, VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
(VN)**

Nhà 2H, 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) **Trần Hồng Nhung (VN), Vũ Văn Sơn (VN)**

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT PHỨC HỆ HẠT NANO SILICA VÀ APTAMER GẮN
POLYETYLEN GLYCOL ĐƯỢC SILAN HÓA ĐƠN CHỨC DÙNG LÀM ĐẦU
DÒ TRONG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH HUỖNH QUANG**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất phức hệ hạt nano silica và aptamer gắn polyetylen glycol được silan hóa đơn chức (dưới đây gọi tắt là mPEG-Silane) dùng làm đầu dò cho các phương pháp phân tích huỳnh quang, theo đó bằng cách gắn kín các vị trí trống (không có aptamer) trên bề mặt phức hệ hạt nano-aptamer bằng mPEG-Silane sẽ giúp kéo dài thời gian bảo quản của phức hệ, nâng cao hiệu quả của các phương pháp phân tích huỳnh quang. Quy trình này bao gồm các bước:

(i) hoạt hóa các nhóm chức carboxyl trên hạt nano silica chứa tâm màu hữu cơ có nhóm carboxyl bằng 1-etyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (dưới đây gọi tắt là EDC);

(ii) bổ sung aptamer vào dung dịch hạt silica đã hoạt hóa thu được ở trên;

(iii) bổ sung polyetylen glycol được silan hóa đơn chức vào phức hệ hạt nano silica-aptamer thu được ở bước (ii), ủ ở 4⁰C trong 5 giờ, sau đó rửa phức hệ 2 đến 3 lần bằng nước cất bằng cách ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ các thành phần dư như aptamer, mPEG-Silane, thu được phức hệ hạt nano silica@aptamer được gắn mPEG-Silane; và

(iv) phân tán phức hệ này trong nước vô trùng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất phức hệ chứa hạt nano silica chứa tâm màu hữu cơ (dưới đây gọi là hạt nano silica) và aptamer, dùng làm đầu dò trong phương pháp phân tích huỳnh quang như phương pháp đánh dấu y sinh, phương pháp phân tích sinh-hóa bao gồm: hiện ảnh tế bào bệnh và cảm biến sinh-hóa.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Công nghệ nano ngày càng phát triển và tạo ra một cuộc cách mạng trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu khoa học và cuộc sống. Các nghiên cứu ứng dụng công nghệ nano trong y-sinh đã mở ra một hướng mới: chẩn đoán nano ở mức độ phân tử - gen. Ưu điểm nổi bật của chẩn đoán nano là tính đặc hiệu và độ nhạy cao. Các kết quả chẩn đoán ở mức độ phân tử cho phép phát hiện bệnh sớm, ở giai đoạn hình thành, điều mà các phép chẩn đoán truyền thống không thể làm được. Các nano tinh thể phát quang chính được sử dụng trong đánh dấu sinh học là: các chấm lượng tử, các hạt nano đất hiếm, các hạt nano silica chứa tâm màu hữu cơ, hoặc hạt nano vàng. Các hạt nano này thường có độ chói hoặc khả năng tán xạ gấp hàng trăm, nghìn lần phân tử màu hữu cơ – chất đánh dấu sinh học truyền thống. Để sử dụng các hạt nano làm chất đánh dấu sinh học, phải gắn kết các hạt này với các phân tử sinh học để tạo thành các phức hệ. Nếu các hạt nano được gắn kết với các chất nhận biết sinh học như kháng thể, peptit hoặc aptamer, chúng sẽ trở thành các đầu dò để phát hiện tế bào bệnh.

Aptamer là các axit nucleotit (chuỗi ADN hoặc ARN đơn) có thể bám vào đích với ái lực và độ đặc hiệu lớn. Từ khi các phát hiện về aptamer của

Ellington và Louis được công bố và sau đó công nghệ chế tạo aptamer từ gen SELEX được xác định vào năm 1991, ngày càng có nhiều loại aptamer được chế tạo có khả năng bám vào các phối tử (ligand) đích khác nhau, từ các ion nhỏ, đơn phân tử, cho tới các protein, thậm chí cả các tế bào. Aptamer được coi như một chất “nhận biết – thụ cảm” có nhiều tiềm năng trong các ứng dụng phát hiện các phân tử sinh học, sưu tập và phát hiện tế bào, hiện ảnh và các ứng dụng lâm sàng khác.

Vì vậy, việc gắn kết các hạt nano quang với aptamer làm đầu dò sinh học là vấn đề nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới quan tâm phát triển.

US 20060014172 A1 mô tả quy trình chế tạo các aptamer, các phức hệ hạt nano-aptamer, các phương pháp phân tích, phát hiện các tế bào đích, mục tiêu cần phân tích. Các aptamer được chức hóa bằng các nhóm chức khác nhau như: thiol, amin, cacboxyl, biotin, v.v.. Hạt nano được chế tạo từ các vật liệu như kim loại (vàng, bạc, đồng, platin), vật liệu bán dẫn (CdSe, CdS) hay vật liệu từ tính (sắt từ v.v.). Hạt nano được gắn kết với aptamer dựa trên phản ứng hóa học của các nhóm chức hoặc dựa trên ái lực liên kết giữa biotin-avidin, biotin-streptavidin. US 20060014172 A1 cũng đề cập đến phương pháp phân tích, phát hiện mục tiêu cần phân tích trong mẫu bằng việc sử dụng đầu dò là phức hệ hạt nano và aptamer.

WO 2015088455 A1 mô tả quy trình chế tạo phức hệ hạt nano silica với aptamer, sau đó phức hệ được cố định lên một đế xốp rắn. Các chất cần phân tích được tạo thành dòng chảy tương tác với aptamer được gắn với hạt nano silica và giải phóng các tín hiệu phân tử. Từ đó phát hiện được các chất cần phân tích.

Phức hệ hạt nano vàng (hoặc vàng/silica) với aptamer (dưới đây gọi là nano@aptamer) được mô tả trong các công bố nêu trên không xử lý các vị trí trống trên bề mặt của hạt nano sau khi gắn kết với aptamer, do đó thường dẫn đến việc các phức hệ không bảo quản được lâu, bị kết đám trong các đệm sinh

học và các bắt cặp không đặc hiệu với kháng nguyên trong quá trình đánh dấu, làm cho kết quả hiện ảnh hoặc phân tích bị sai lệch. Do đó, có nhu cầu về quy trình sản xuất phức hệ nano với aptamer khắc phục được các nhược điểm trên.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là khắc phục nhược điểm nêu trên, cụ thể là đề xuất quy trình sản xuất phức hệ hạt nano silica chứa tâm màu hữu cơ với aptamer, mà phức hệ thu được được xử lý chỗ trống trên bề mặt, nhờ thế ngăn được hiện tượng kết đám của phức hệ, tăng độ chính xác của phương pháp phân tích huỳnh quang sử dụng phức hệ này.

Cụ thể, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất phức hệ hạt nano silica và aptamer gắn polyetylen glycol được silan hóa đơn chức (dưới đây gọi tắt là mPEG-Silane), dùng làm đầu dò cho các phương pháp phân tích huỳnh quang, quy trình này bao gồm các bước:

(i) hoạt hóa các nhóm chức carboxyl trên hạt nano silica chứa tâm màu hữu cơ có nhóm carboxyl (dưới đây gọi tắt là hạt silica-COOH) bằng cách trộn hạt silica-COOH với 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (dưới đây gọi tắt là EDC), ủ hỗn hợp trong vòng 30 phút ở nhiệt độ phòng để phản ứng xảy ra hoàn toàn; sau đó rửa hỗn hợp 2 lần bằng cách ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút để thu được hạt nano silica đã hoạt hóa;

(ii) bổ sung aptamer vào dung dịch nước của hạt silica đã hoạt hóa thu được ở trên, ủ lắc ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, sau đó ủ qua đêm ở 4°C để tạo ra phức hệ hạt nano silica-aptamer;

(iii) bổ sung polyetylen glycol được silan hóa đơn chức vào phức hệ hạt nano silica-aptamer thu được ở bước (ii), ủ ở 4°C trong 5 giờ, sau đó rửa phức hệ 2 đến 3 lần bằng cách ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ các thành phần dư như aptamer, mPEG-Silane, thu được phức hệ hạt nano silica và aptamer được gắn mPEG-Silane; và

(iv) phân tán phức hệ này trong nước vô trùng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là mô hình phức hệ hạt nano silica gắn kết với aptamer được gắn polyetylen glycol được silan hóa đơn chức: aptamer một đầu được chức hóa có nhóm chức amin ($-NH_2$) được gắn lên hạt nano silica. Hạt nano silica sau khi gắn kết với aptamer được gắn kín các vị trí trống bằng polyetylen glycol được silan hóa đơn chức.

Hình 2 là sơ đồ quy trình tạo phức hệ hạt nano silica@aptamer, trong đó aptamer được chức hóa đầu 3' với nhóm amin, polyetylen glycol được silan hóa đơn chức.

Hình 3 là hình ảnh thể hiện việc sử dụng phức hệ hạt nano silica@aptamer để hiện ảnh huỳnh quang của tế bào: (A) Ảnh huỳnh quang của tế bào BT-474 và (B) Ảnh huỳnh quang của tế bào HeLa (B) khi ủ với phức hệ silica@aptamer đặc hiệu HER2.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

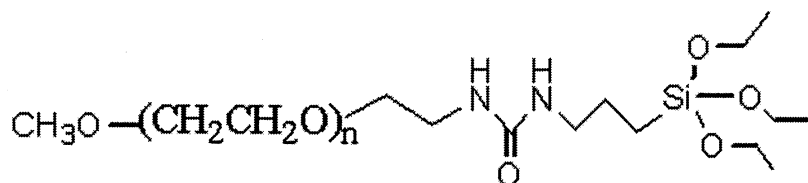
Hạt nano silica dùng trong giải pháp hữu ích là hạt nano silica (SiO_2) dạng hình cầu chứa tâm màu hữu cơ, kích thước 70nm, phân tán trong nước, được cấu thành từ các mạng SiO_2 . Các hạt nano silica này được biến đổi từ trước để có nhóm chức carboxyl – $COOH$ trên bề mặt.

Aptamer là một đoạn oligonucleotit (một chuỗi các axit nucleotit) có thể là dạng ADN hoặc ARN. Aptamer có khả năng bắt cặp đặc hiệu với các kháng nguyên cần phát hiện, và không có độc tính sinh học. Trong giải pháp hữu ích này, các tác giả ưu tiên sử dụng aptamer đặc hiệu kháng nguyên HER2 trên tế bào ung thư vú được chức hóa nhóm amin ở đầu 3' có cấu trúc như sau:



Polyetylen glycol (PEG) có công thức phân tử: $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$, PEG là một polyme có tính trơ về mặt hóa học và có tính tương thích sinh

học cao, loại PEG đơn chức thích hợp dùng trong giải pháp hữu ích là loại PEG được chức hóa bằng một nhóm chức silan. Tốt nhất nếu trọng lượng phân tử của PEG là 2kDa. mPEG-Silane có công thức hóa học như sau:



Trong giải pháp hữu ích này, phức hệ được sản xuất dựa trên phản ứng giữa nhóm amin trên aptamer với cacboxyl đã hoạt hóa trên hạt nano silica tạo thành liên kết peptit.

Điều khác biệt của phức hệ nano@aptamer trong giải pháp hữu ích này là phức hệ này đã được xử lý vị trí trống bằng cách gắn PEG đơn chức. Bản chất của việc gắn PEG đơn chức lên vị trí trống của phức hệ là phản ứng hóa học tạo liên kết giữa nhóm chức trên PEG với vị trí trống trên bề mặt hạt nano trong phức hệ. Cụ thể là, đối với phức hệ nano silica@aptamer, PEG được chức hóa bằng một nhóm silan. Hạt nano silica được cấu thành từ các mạng SiO₂. Nhờ phản ứng thủy phân và ngưng tụ của nhóm silan lên trên mạng nền SiO₂ tạo liên kết giữa PEG với các vị trí trống trên bề mặt hạt nano silica trong phức hệ nano silica@aptamer.

Như thể hiện trên Hình 1 hạt nano có dạng hình cầu, kích thước nanomet; aptamer ADN dạng sợi đơn được chức hóa một đầu để gắn lên trên hạt nano. Các vị trí trống trên hạt nano được xử lý bằng cách gắn kín bằng PEG đơn chức.

Quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm hai công đoạn chính:

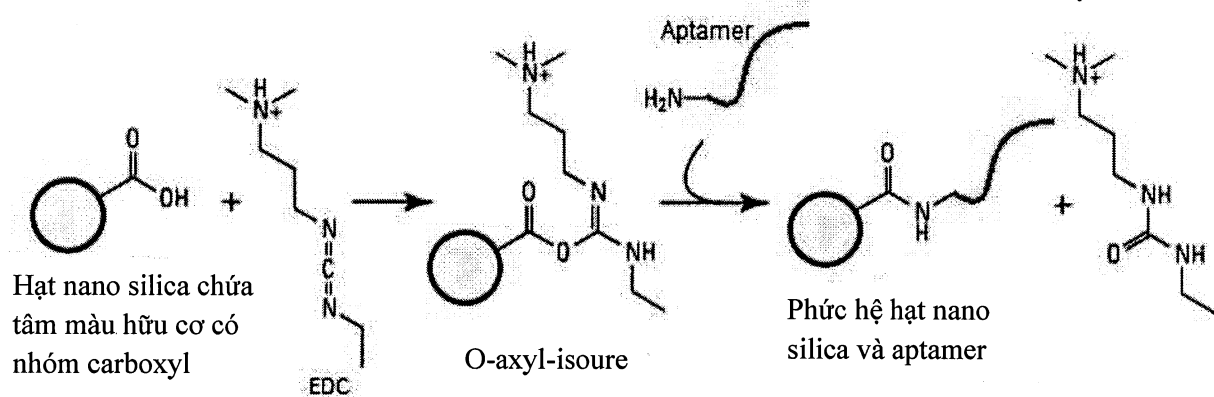
Gắn kết tạo phức hệ giữa các loại hạt nano và aptamer. Sau công đoạn này, sản phẩm là phức hệ hạt nano@aptamer có một số nhược điểm như sau: i) thời gian bảo quản không được lâu; ii) bị tụ đám khi phân tán trong các đệm sinh học; iii) bị tụ đám khi ủ với tế bào; iv) bắt cặp với các kháng

nguyên không đặc hiệu tế bào đích (do có sự phù hợp ngẫu nhiên giữa các nhóm chức trên bề mặt hạt nano với cấu trúc hóa học của kháng nguyên) dẫn tới việc nhận biết tế bào không đặc hiệu.

Gắn kín, hoặc bọc kín, các vị trí trống (không có aptamer) của bề mặt hạt nano bằng PEG đơn chức sẽ khắc phục vấn đề trên. Sản phẩm sau công đoạn này là phức hệ hạt nano@aptamer được gắn PEG đã khắc phục được các nhược điểm so với phức hệ hạt nano@aptamer không gắn PEG như: i) thời gian bảo quản dài, từ 2 đến 3 tháng; ii) dễ dàng phân tán trong các đệm sinh học; iii) không bị tụ đám khi ủ với tế bào; iv) giảm thiểu hiện tượng bắt cặp không đặc hiệu với tế bào đích.

Hình 2 là sơ đồ khối thể hiện vắn tắt các bước tạo ra phức hệ hạt nano silica và aptamer gắn mPEG-Silane.

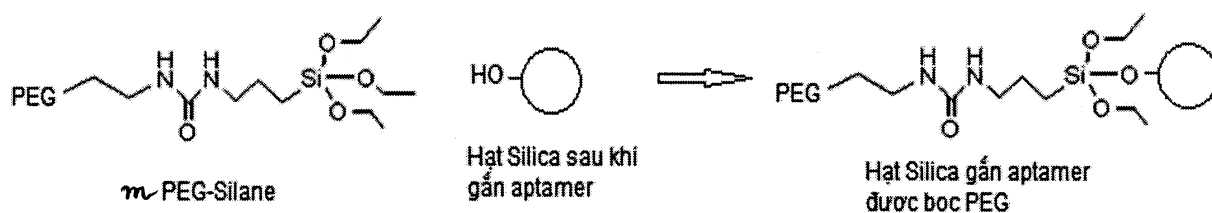
Trước khi gắn kết tạo phức hệ, hạt nano silica-COOH (1), hạt này chứa tâm màu hữu cơ cần phải được hoạt hóa nhóm -COOH trên bề mặt hạt bằng EDC (2): Lấy 500 μ l hạt silica-COOH (1) (nồng độ 6×10^{12} hạt/ml) trộn với 10 μ l EDC (2) 0,5% hoặc theo lượng dư EDC. Ủ hỗn hợp trong vòng 30 phút ở nhiệt độ phòng để phản ứng xảy ra hoàn toàn. Phản ứng xảy ra như sau:



Sau đó, rửa hỗn hợp 2 lần bằng nước cất bằng cách ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút, trong vòng 5 phút để loại EDC dư. Thu được hạt nano silica-COOH đã hoạt hóa (3).

Tiếp theo, tạo liên kết giữa hạt nano silica-COOH đã hoạt hóa (3) với aptamer-NH₂ (4) bằng phản ứng cộng hóa trị giữa nhóm carboxyl (-COOH) và nhóm amin (-NH₂): Thêm 12,5μl aptamer-NH₂ (4) (nồng độ 100pM/μl) vào dung dịch chứa hạt nano silica-COOH đã hoạt hóa (3). Ủ lắc trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng bằng máy lắc Vortex. Sau đó, ủ qua đêm ở 4°C. Thu được phức hệ hạt nano silica@aptamer (5).

Bước cuối cùng là xử lý các vị trí trống trên bề mặt hạt nano trong phức hệ hạt nano silica@aptamer (5) bằng mPEG-silane (6): Thêm 30μl mPEG-silane (6) (nồng độ 10¹⁶ phân tử/μl, trọng lượng phân tử 2kDa) vào 500μl phức hệ hạt nano silica@aptamer (5) thu được ở trên, ủ ở nhiệt độ 4°C trong 5 giờ. Phương trình phản ứng như sau:



Phức hệ được rửa từ 2 đến 3 lần bằng nước cất bằng cách ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ các aptamer và PEG dư. Cuối cùng, thu được 3x10¹² hạt phức hệ hạt nano silica@aptamer được gắn mPEG-Silane (7), phức hệ này được phân tán lại trong 500μl nước vô trùng để thu được 500μl dung dịch phức có nồng độ hạt phức hệ là 6x10¹² hạt/ml, trong đó chứa aptamer với lượng là 2μM/ml.

Mặc dù lượng các chất phản ứng nêu trên được đưa ra dưới dạng trị số định lượng cụ thể, nhưng cần hiểu rằng lượng các chất phản ứng có thể thay đổi theo tỷ lệ định lượng tương quan nêu trên.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: sử dụng phức hệ hạt nano silica@aptamer

Phức hệ hạt nano silica@aptamer được thử nghiệm đánh dấu hiện ảnh huỳnh quang các dòng tế bào sau: tế bào ung thư vú (BT-474), tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa). Để quan sát rõ hình thái tế bào, nhân tế bào đã được nhuộm bằng Hoechst 33342 (màu xanh dương). Các tế bào được ủ với phức hệ silica@aptamer trong 12 giờ (200.000 tế bào ung thư vú BT-474 hoặc ung thư cổ tử cung HeLa ủ với 10^{10} phức hệ hạt nano silica@aptamer) và được hiện ảnh bằng kính hiển vi huỳnh quang Nikon Ti-E Eclipse.

Ở dòng HeLa không có tín hiệu màu xanh lá cây của các hạt silica kể cả trên màng hay bên trong tế bào (Hình 3B). Điều này là do tế bào HeLa không có kháng nguyên HER2 trên bề mặt màng, do đó phức hệ silica@aptamer đặc hiệu HER2 không bám được lên các tế bào này.

Hình 3A cho thấy sự xâm nhập của hạt nano vào tế bào BT-474. Tín hiệu màu xanh lá cây của tâm màu FITC (FITC: Fluorescein isothiocyanate) trong hạt nano silica biểu hiện ở tế bào BT-474 do sự có mặt HER2 trên màng. Có thể thấy rõ vị trí của hạt nano silica trong tế bào khi quan sát ảnh kết hợp màu huỳnh quang xanh dương của nhân tế bào và màu xanh lá cây của tâm màu FITC trong hạt nano. Màu xanh lá cây của FITC cho thấy vị trí của hạt nano không chỉ tập trung ở màng mà cả vùng xung quanh nhân tế bào. Điều này chứng tỏ hạt nano gắn aptamer đặc hiệu HER2 đã xâm nhập sâu vào tế bào chất của dòng tế bào biểu hiện mạnh thụ thể HER2.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Các phức hệ nano silica@aptamer được gắn PEG đơn chức có thời gian bảo quản lâu từ 2 đến 3 tháng, không bị tụ đám trong các đệm sinh học, không bị tụ đám khi ủ với tế bào, tính đặc hiệu cao.

Các phức hệ hạt nano silica@aptamer có thể dùng làm đầu dò với tính đặc hiệu cao trong các ứng dụng đánh dấu sinh - hóa như: hiện ảnh tế bào, cảm biến sinh - hóa. ái lực cao của aptamer với kháng nguyên cho phép phát hiện tế bào bệnh ở mức độ phân tử. Độ chói cao của hạt nano silica làm

nâng cao độ nhạy của phương pháp phân tích và tạo khả năng phát hiện bệnh sớm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất phức hệ hạt nano silica và aptamer gắn polyetylen glycol được silan hóa đơn chức (dưới đây gọi tắt là mPEG-Silane) dùng làm đầu dò cho các phương pháp phân tích huỳnh quang, quy trình này bao gồm các bước:

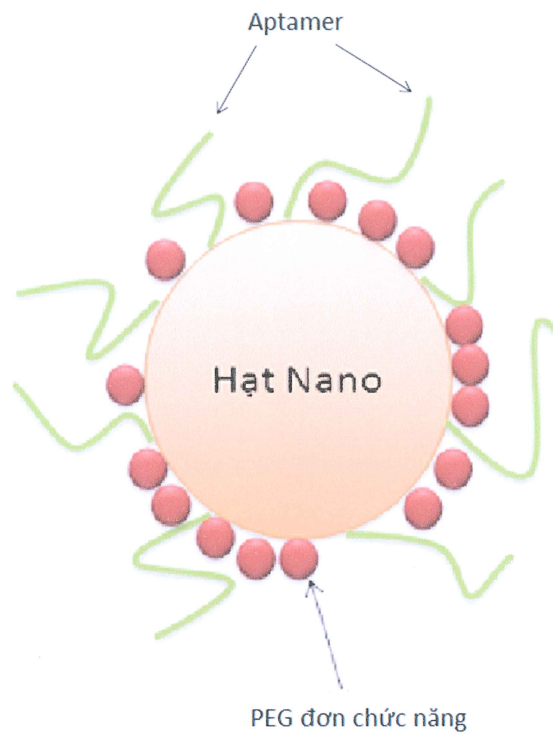
(i) hoạt hóa các nhóm chức carboxyl trên hạt nano silica chứa tâm màu hữu cơ có nhóm carboxyl (dưới đây gọi tắt là hạt silica-COOH) bằng cách trộn hạt silica-COOH với 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (dưới đây gọi tắt là EDC), ủ hỗn hợp trong vòng 30 phút ở nhiệt độ phòng để phản ứng xảy ra hoàn toàn; sau đó rửa hỗn hợp 2 lần bằng nước cất bằng cách ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút để thu được hạt nano silica đã hoạt hóa;

(ii) bổ sung aptamer vào dung dịch nước của hạt silica đã hoạt hóa thu được ở trên, ủ lắng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, sau đó ủ qua đêm ở 4°C để tạo ra phức hệ hạt nano silica-aptamer;

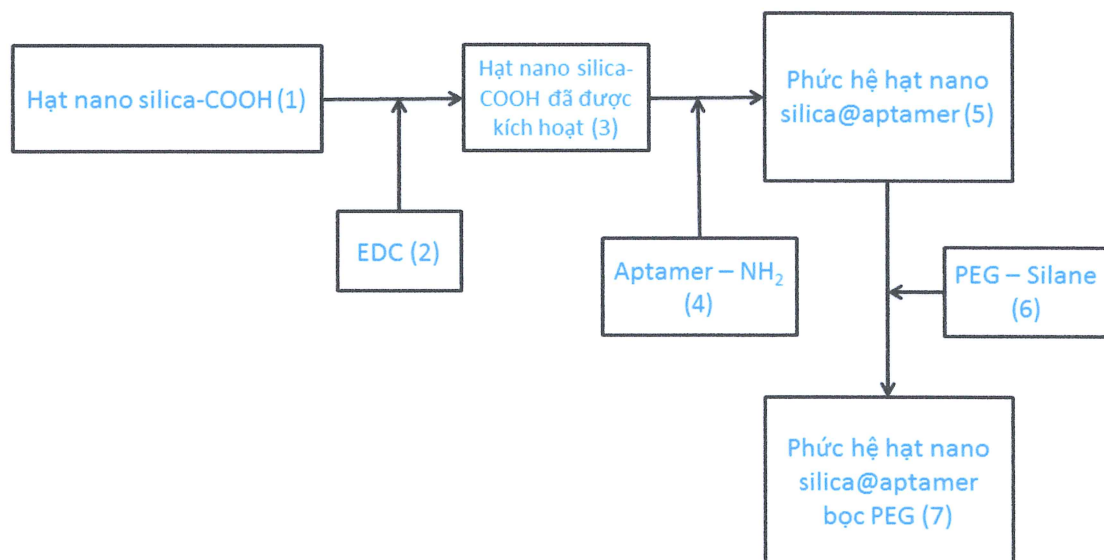
(iii) bổ sung polyetylen glycol được silan hóa đơn chức vào phức hệ hạt nano silica-aptamer thu được ở bước (ii), ủ ở 4°C trong 5 giờ, sau đó rửa phức hệ 2 đến 3 lần bằng nước cất bằng cách ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút, để loại bỏ các thành phần dư như aptamer, mPEG-Silane, thu được phức hệ hạt nano silica và aptamer được gắn mPEG-Silane; trong đó polyetylen glycol của polyetylen glycol được silan hóa đơn chức có trọng lượng phân tử là 2 kDa; và

(iv) phân tán phức hệ này trong nước vô trùng.

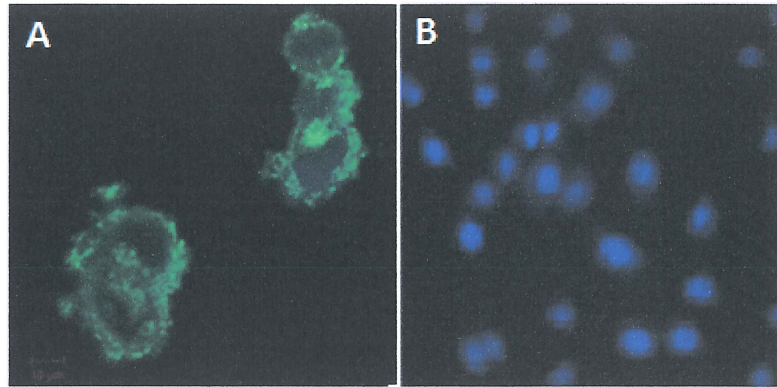
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó aptamer là oligonucleotit.



Hình 1



Hình 2



Hình 3