



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0045894

(51)^{2020.01} C12N 15/115; G01N 33/58; G01N
33/543; G01N 33/569; G01N 27/02;
G01N 27/26

(13) B

(21) 1-2021-03743

(22) 18/12/2019

(86) PCT/KR2019/017996 18/12/2019

(87) WO2020/130624 25/06/2020

(30) 10-2018-0165203 19/12/2018 KR

(45) 26/05/2025 446

(43) 27/09/2021 402A

(73) 1. MD HEALTHCARE INC. (KR)

(Sangam-dong, Woori Technology Bldg.) #1303, 9, World Cup buk-ro 56-gil, Mapo-Gu, Seoul 03923 Republic of Korea

2. POSTECH RESEARCH AND BUSINESS DEVELOPMENT FOUNDATION (KR)

(Jigok-dong) 77, Cheongam-ro, Nam-gu, Pohang-si, Gyeongsangbuk-do 37673 Republic of Korea

(72) KIM, Yoon-Keun (KR); BAN, Changill (KR).

(74) Công ty TNHH Trường Xuân (AGELESS CO.,LTD.)

(54) APTAME ADN LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI PROTEIN VỎ 2 CỦA VIRUT CHIKUNGUNYA, CHẾ PHẨM, BỘ KIT, CẢM BIẾN SINH HỌC CHỨA APTAME ADN NÀY ĐỂ CHẨN ĐOÁN BỆNH CHIKUNGUNYA VÀ PHƯƠNG PHÁP CUNG CẤP THÔNG TIN VỀ SỰ HIỆN DIỆN CỦA VIRUT CHIKUNGUNYA TRONG MẪU

(21) 1-2021-03743

(57) Sáng chế đề cập đến aptame ADN liên kết đặc hiệu với protein vỏ 2 của virus Chikungunya (CHIKV E2), chế phẩm để chẩn đoán bệnh chikungunya và bộ kit để chẩn đoán bệnh chikungunya, chứa aptame ADN này, cảm biến sinh học để chẩn đoán bệnh chikungunya, và phương pháp cung cấp thông tin về sự hiện diện của virus Chikungunya trong mẫu đối tượng. Nghiên cứu chuyên sâu và kỹ lưỡng được thực hiện bởi các tác giả nhằm phát triển chỉ thị sinh học mới để chẩn đoán bệnh chikungunya đã dẫn đến phát hiện rằng aptame ADN có thể liên kết đặc hiệu với protein vỏ 2 của virus Chikungunya (CHIKV E2) có ái lực liên kết mạnh và tính đặc hiệu tuyệt vời đối với CHIKV E2. Aptame ADN được kỳ vọng có độ ổn định cao hơn so với các phương pháp ELISA thông thường sử dụng kháng thể, và do đó có thể được sử dụng một cách thuận lợi trong việc phát triển chế phẩm để chẩn đoán bệnh chikungunya, cảm biến sinh học để chẩn đoán bệnh chikungunya và phương pháp cung cấp thông tin về sự hiện diện của virus Chikungunya trong mẫu đối tượng, qua đó chẩn đoán bệnh chikungunya.

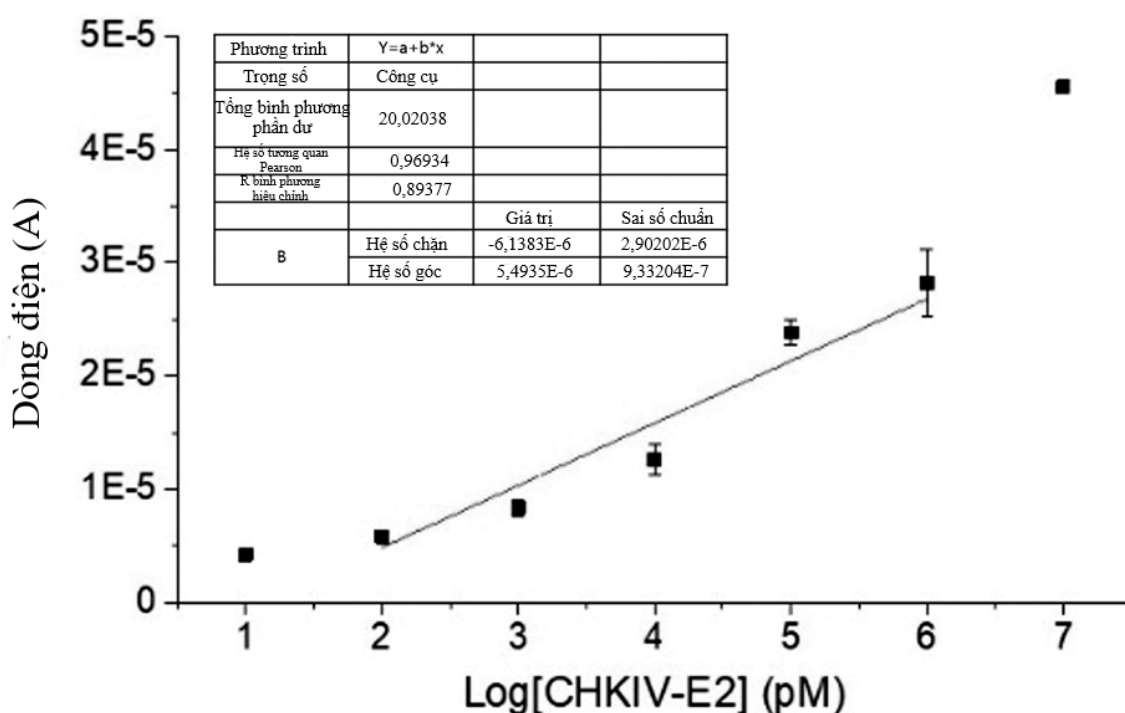


FIG. 4B

Lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến aptame ADN liên kết đặc hiệu với protein vỏ 2 của virus Chikungunya (CHIKV E2 - Chikungunya virus envelope protein 2), chế phẩm để chẩn đoán chikungunya và bộ kit để chẩn đoán bệnh chikungunya, chứa aptame ADN này, và cảm biến sinh học để chẩn đoán bệnh chikungunya, và phương pháp cung cấp thông tin về sự hiện diện của virus Chikungunya trong mẫu đối tượng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh chikungunya là bệnh truyền nhiễm kèm theo sốt, đau cơ và khớp, nhức đầu, mệt mỏi, phát ban và các triệu chứng tương tự. Một số bệnh nhân có thể không khỏi đau khớp trong một vài tháng hoặc hơn trong một số trường hợp, và ngoài ra bệnh chikungunya cũng đi kèm với các biến chứng về mắt, thần kinh và tim đã được báo cáo. Không có phương pháp điều trị chuyên biệt cho căn bệnh này, và liệu pháp điều trị triệu chứng được thực hiện để giảm đau. Ước tính rằng 3 triệu ca nhiễm hoặc nhiều hơn xảy ra mỗi năm. Bệnh chikungunya được truyền bởi muỗi rừng Ai Cập và muỗi vằn *Aedes albopictus* là trung gian truyền bệnh.

Trong khi đó, bệnh chikungunya có 3 loại protein cấu trúc: E1 và E2 được glycosyl hóa gắn trên vỏ virus, và E3 là protein vỏ capsid không được glycosyl hóa. Trong trường hợp này, E2 và E3 đã được biết là có tham gia vào quá trình hình thành và nảy chồi của virion trưởng thành. Epitop (nhân tố quyết định kháng nguyên) mạch thẳng đơn nằm ở đầu tận cùng N của glycoprotein E2, và thể hiện phản ứng kháng nguyên-kháng thể mạnh. Với lý do này, E2 của virus Chikungunya đã được nghiên cứu như là protein đích chính trong quá trình phát triển phương pháp chẩn đoán dựa trên IgM and IgG hiện có và vacxin tiểu thể tái tổ hợp (recombinant subunit vaccine) (Sáng chế Hàn Quốc số 10-1792684).

Hiện nay, các bệnh nhiệt đới đặc hữu như bệnh chikungunya được chẩn đoán bằng phương pháp chẩn đoán dựa trên triệu chứng, phát hiện tác nhân lây nhiễm bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), chẩn đoán miễn dịch bằng phản ứng kháng nguyên-kháng thể. Tuy nhiên, các phương pháp hiện có không thể được sử dụng rộng rãi ở các nước đang phát triển với cơ sở y tế nghèo nàn do vấn đề chi phí, hoặc không đạt được mức độ phù hợp về các khía cạnh như độ nhạy và độ chọn lọc. Cần phải khắc phục những hạn chế của các phương pháp chẩn đoán hiện có và phát triển nền tảng để phát hiện các bệnh bị bỏ quên, mà có thể được sử dụng thực sự ở các nước đang phát triển.

Trong khi đó, các aptame có ái lực rất cao với các vật liệu cụ thể và ổn định, do đó đã được phát triển rộng rãi trong những năm gần đây, và ứng dụng của chúng cho các tác nhân điều trị và cảm biến chẩn đoán bằng cách sử dụng các aptame này đang được thực hiện tích cực. Vì các aptame có thể được tổng hợp bằng phương pháp tương đối đơn giản và tế bào, protein và thậm chí các vật liệu hữu cơ nhỏ có thể là vật liệu đích, nên có thể phát triển các phương pháp phát hiện mới bằng cách sử dụng các aptame này, và tính đặc hiệu và độ ổn định của chúng cao hơn nhiều so với các kháng thể đã được phát triển, do đó các aptame có thể được ứng dụng để phát triển tác nhân điều trị, hệ thống phân phối thuốc, và cảm biến sinh học chẩn đoán.

Do đó, để phát triển nền tảng phát hiện các bệnh bị bỏ quên, việc chẩn đoán bệnh chikungunya bằng cách sử dụng chỉ thị sinh học mới đã là đối tượng chính của nghiên cứu, và các nghiên cứu đã được tiến hành về vấn đề này, nhưng các nghiên cứu này vẫn chưa đủ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Do sáng chế được tạo ra để giải quyết các vấn đề trên, nên khả năng liên kết đặc hiệu của aptame ADN được tạo ra theo sáng chế với protein vỏ 2 của virus Chikungunya (CHIKV E2) đã được xác nhận, và sáng chế đã được hoàn thiện dựa trên điều này.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất aptame ADN liên kết đặc hiệu với protein vỏ 2 của virus Chikungunya (CHIKV E2), trong đó aptame ADN chứa trình tự nucleotit SEQ ID NO: 4.

Hơn nữa, mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm để chẩn đoán bệnh chikungunya hoặc bộ kit để chẩn đoán bệnh chikungunya, mà chứa aptame ADN.

Ngoài ra, mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất cảm biến sinh học để chẩn đoán bệnh chikungunya, cảm biến sinh học này bao gồm: aptame ADN đặc hiệu cho protein vỏ 2 của virus Chikungunya; và nền mà aptame ADN được cố định trên đó, trong đó aptame ADN chứa trình tự nucleotit SEQ ID NO: 4.

Hơn nữa, mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp cung cấp thông tin về sự hiện diện của virus Chikungunya trong mẫu đối tượng, phương pháp này bao gồm các bước: (a) đưa mẫu đối tượng vào cảm biến sinh học; (b) đưa đầu dò phát hiện chứa chấm lượng tử vào cảm biến sinh học mà đã đưa mẫu đối tượng vào trong bước (a); (c) đưa axit vào cảm biến sinh học mà đã đưa đầu dò phát hiện vào trong bước (b); (d) thu dung dịch trong đó chấm lượng tử và axit phản ứng với nhau trong bước (c); và (e) đo dòng điện (ampe (A)) của dung dịch trong bước (d).

Tuy nhiên, các vấn đề kỹ thuật mà sáng chế dự định giải quyết không chỉ giới hạn ở các vấn đề kỹ thuật đã được đề cập ở trên, và cả các vấn đề kỹ thuật khác chưa được đề cập đến sẽ được hiểu rõ ràng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế liên quan đến từ sự mô tả sau đây.

Giải pháp kỹ thuật

Để đạt được các mục đích của sáng chế như mô tả ở trên, sáng chế đề xuất aptame ADN liên kết đặc hiệu với protein vỏ 2 của virus Chikungunya (CHIKV E2), trong đó aptame ADN chứa trình tự nucleotit SEQ ID NO: 4.

Theo phương án mẫu của sáng chế, E2 của virus Chikungunya có thể là protein chứa protein miễn trên bề mặt kháng nguyên virus Chikungunya.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm để chẩn đoán bệnh chikungunya, chế phẩm này chứa aptame ADN.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất bộ kit để chẩn đoán bệnh chikungunya, bộ kit này bao gồm aptame ADN.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất cảm biến sinh học để chẩn đoán bệnh chikungunya, cảm biến sinh học này bao gồm: aptame ADN đặc hiệu cho protein vỏ 2 của virus Chikungunya (CHIKV E2); và nền mà aptame ADN được cố định trên đó, trong đó aptame ADN chứa trình tự nucleotit SEQ ID NO: 4.

Theo phương án mẫu của sáng chế, nền có thể bao gồm lớp điện cực kim loại và lớp hạt nano kim loại, và kim loại có thể là vàng (Au).

Theo phương án mẫu của sáng chế, aptame ADN có thể được lai với trình tự cố định để được cố định trên nền bằng mạch đôi.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp cung cấp thông tin về sự hiện diện của virus Chikungunya trong mẫu đối tượng, phương pháp này bao gồm các bước: (a) đưa mẫu đối tượng vào cảm biến sinh học; (b) đưa đầu dò phát hiện có chứa chấm lượng tử vào cảm biến sinh học đã đưa mẫu đối tượng vào trong bước (a); (c) đưa axit vào cảm biến sinh học đã đưa đầu dò phát hiện vào trong bước (b); (d) thu dung dịch trong đó chấm lượng tử và axit phản ứng với nhau trong bước (c); và (e) đo dòng điện (ampe (A)) của dung dịch trong bước (d).

Theo phương án mẫu của sáng chế, chấm lượng tử có thể là cadimi sunfua (CdS).

Ngoài ra, sáng chế mô tả phương pháp chẩn đoán bệnh chikungunya, phương pháp này bao gồm bước dùng aptame ADN liên kết đặc hiệu với CHIKV E2 cho cá thể.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất aptame ADN liên kết đặc hiệu với CHIKV E2 để chẩn đoán bệnh chikungunya.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Nghiên cứu chuyên sâu và kỹ lưỡng được thực hiện bởi các tác giả nhằm phát triển chỉ thị sinh học mới để chẩn đoán bệnh chikungunya đã dẫn đến kết quả là tìm ra aptame ADN có thể liên kết đặc hiệu với protein vỏ 2 của virus Chikungunya (CHIKV E2) có ái lực liên kết mạnh và tính đặc hiệu tuyệt vời với CHIKV E2. Aptame ADN được mong đợi

có tính ổn định cao hơn phương pháp ELISA thông thường sử dụng kháng thể, và như vậy có thể được sử dụng thuận lợi để phát triển chế phẩm để chẩn đoán bệnh chikungunya, cảm biến sinh học để chẩn đoán bệnh chikungunya, và phương pháp cung cấp thông tin về sự hiện diện của virus Chikungunya trong mẫu đối tượng, qua đó chẩn đoán bệnh chikungunya.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là biểu đồ thể hiện kết quả xác nhận mức độ liên kết (%) giữa ADN mạch đơn (ssDNA) và CHIKV E2 và thực hiện quá trình chọn lọc.

FIG. 2 thể hiện kết quả xác nhận giá trị K_d cho trình tự aptame CV2 bằng phương pháp đo huỳnh quang.

FIG. 3 là sơ đồ của cảm biến sinh học để phát hiện CHIKV E2 sử dụng aptame ADN.

FIG. 4A là biểu đồ xác nhận kết quả phát hiện CHIKV E2 sử dụng aptame CV2 khi nồng độ CHIKV E2 thay đổi.

FIG. 4B là biểu đồ xác nhận rằng kết quả phát hiện CHIKV E2 sử dụng aptame CV2 thu được về mặt định lượng khi giá trị nồng độ của CHIKV E2 được chuyển đổi thành Log được sử dụng làm trục x.

FIG. 5 là biểu đồ thể hiện kết quả cho thấy sự thay đổi tương đối của giá trị dòng điện do phản ứng với mỗi protein trong thí nghiệm về tính đặc hiệu liên kết đối với CHIKV E2.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo kết quả nghiên cứu chuyên sâu và kỹ lưỡng nhằm phát triển chỉ thị sinh học mới để chẩn đoán bệnh chikungunya, các tác giả đã xác nhận aptame ADN có thể liên kết đặc hiệu với protein vỏ 2 của virus Chikungunya (CHIKV E2) có ái lực liên kết mạnh và tính đặc hiệu tuyệt vời đối với CHIKV E2, qua đó hoàn thành sáng chế.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

Sáng chế đề xuất aptame ADN liên kết đặc hiệu với CHIKV E2.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "protein vỏ 2 của virus Chikungunya (CHIKV E2)" dùng để chỉ E2 được glycosyl hóa gắn trên vỏ của virus, và là một trong 3 loại protein

cấu trúc: E1 và E2 được glycosyl hóa, và E3 là protein vỏ capsid không được glycosyl hóa. Trong trường hợp này, E2 và E3 đã được biết là có tham gia vào quá trình hình thành và nảy chồi của virion trưởng thành. Epitop mạch thẳng đơn nằm ở đầu tận cùng N của glycoprotein E2, và thể hiện phản ứng kháng nguyên-kháng thể mạnh. Với lý do này, CHIKV E2 tương ứng với protein đích chính trong quá trình phát triển phương pháp chẩn đoán dựa trên IgM and IgG hiện có và vaccin tiểu thể tái tổ hợp, bệnh chikungunya có thể được phát hiện hiệu quả bằng cách phát hiện CHIKV E2, và CHIKV E2 có thể là protein miễn có trên bề mặt của kháng nguyên virus chikungunya, nhưng giới hạn ở đó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "aptame" dùng để chỉ ADN mạch đơn (ssDNA) hoặc ARN có tính đặc hiệu và ái lực cao đối với vật liệu cụ thể. Vì phương pháp sử dụng các kháng thể đã phát triển trước đó được thực hiện để điều chế kháng thể bằng cách sử dụng hệ thống miễn dịch của sinh vật, nên có vấn đề là phương pháp này cần thời gian và tiền bạc tương đối lớn và độ ổn định là vấn đề đáng lo ngại vì kháng thể là protein, trong khi đó vì aptame có thể được tổng hợp bằng phương pháp tương đối đơn giản. Ngoài ra, aptame có thể nhắm đích tế bào, protein và thậm chí là vật liệu hữu cơ nhỏ. Dựa trên thực tế là các phương pháp phát hiện mới sử dụng aptame có thể được phát triển và tính đặc hiệu và độ ổn định của chúng rất cao so với các phương pháp phát hiện sử dụng kháng thể đã được phát triển, aptame ADN được sử dụng để phát hiện đặc hiệu CHIKV E2. Bất kỳ ADN (ssDNA) hoặc ARN nào có khả năng phát hiện đặc hiệu CHIKV E2 có thể thuộc aptame của sáng chế, và tốt hơn là có thể bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID NO: 4, nhưng không giới hạn ở đó.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm để chẩn đoán bệnh chikungunya, chế phẩm này chứa aptame ADN.

Chế phẩm của sáng chế có thể còn bao gồm chất mang, tá dược, chất pha loãng, được chấp nhận về mặt dược lý và sinh lý, ngoài aptame ADN. Hơn nữa, dược phẩm có thể sử dụng bằng cách được bào chế dưới dạng bình xịt, chất bôi ngoài, thuốc đạn, và dung dịch tiêm vô trùng, và chế phẩm dạng uống như bột, hạt, viên nén, viên nang, hỗn dịch, nhũ tương, xirô, theo phương pháp điển hình.

Các ví dụ của chất mang, tá dược, và chất pha loãng, mà có thể có trong chế phẩm bao gồm lactoza, dextroza, sucroza, sobitol, mannitol, xylitol, erytritol, maltitol, tinh bột, cao su acacia, alginat, gelatin, canxi photphat, canxi silicat, xenluloza, metyl xenluloza, xenluloza vi tinh thể, polyvinylpyrrolidon, nước, metyl hydroxybenzoat, propyl hydroxybenzoat, bột talc, magiê stearat, dầu khoáng, và các chất tương tự. Khi chế phẩm được tạo công thức, chế phẩm được bào chế bằng cách sử dụng chất pha loãng hoặc tá dược thường được sử dụng như chất độn, chất kéo dài, chất kết dính, chất làm ướt, chất phân hủy và chất hoạt động bề mặt.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất bộ kit để chẩn đoán bệnh chikungunya, bộ kit này bao gồm aptame ADN.

Bộ kit bao gồm aptame của sáng chế, liên kết đặc hiệu với CHIKV E2, và chỉ thị phát hiện được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực này, ví dụ dư lượng biotin có thể được gắn vào aptame. Sau khi vật liệu chỉ thị được đưa vào aptame mà biotin đã được gắn vào, phân tích của nó có thể được sử dụng để phát hiện, định lượng và chẩn đoán CHIKV E2. Các vật liệu chỉ thị phân tích đã biết khác nhau có thể được sử dụng làm vật liệu chỉ thị được sử dụng cho biotin, và phân tích huỳnh quang có thể được thực hiện bằng cách sử dụng, ví dụ streptavidin, avidin, Cy3, Cy5, Alexa, BODIPY, Rhodamine, Q-dot, hoặc các chất tương tự. Hơn nữa, aptame để phát hiện CHIKV E2 có thể được đánh dấu bằng vật liệu chỉ thị điển hình như các vật liệu huỳnh quang khác, thân từ tính, vật liệu nhuộm màu, enzym, và đồng vị phóng xạ, ngoài dư lượng biotin, và có thể được phát hiện bằng các phương tiện phát hiện điển hình, ví dụ kính hiển vi huỳnh quang, máy phát hiện sóng vô tuyến (RAID), và các thiết bị tương tự.

Hơn nữa, bộ kit bao gồm nhiều công cụ hoặc thuốc thử có thể được sử dụng để đo định tính hoặc định lượng sự liên kết hoặc không liên kết của aptame và CHIKV E2 trong mẫu, và có thể còn bao gồm giá đỡ (nền), dung dịch đệm, chất kết thúc phản ứng, chất hòa tan, chất tẩy rửa, chất ổn định hoặc các chất tương tự.

Nền mà aptame được cố định vào theo sáng chế, ví dụ, nền được chọn từ nhóm bao gồm polyme, thủy tinh, vàng, giấy và màng sinh học là nền rắn có thể được sử dụng. Cụ thể hơn là, có thể sử dụng polystyren, polyetylen, polypropylen, polyeste, polyacrylonitril,

flororesin, agaroza, xenluloza, nitroxenluloza, dextran, Sephadex, Sepharoza, liposom, cacboxymetyl xenluloza, polyacrylamit, polystyren, gabbro, giấy lọc, nhựa trao đổi ion, màng nhựa, ống nhựa, copolyme của polyamin-metyl vinyl-ete-axit maleic, copolyme của axit amin, copolyme của etylen-axit maleic, nilông, kim loại, thủy tinh, hạt thủy tinh, hạt từ tính, hoặc vật liệu tương tự. Các nền rắn khác có thể được sử dụng là đĩa nuôi cấy tế bào, đĩa ELISA, ống, màng polyme, và các dụng cụ tương tự. Nền có thể có bất kỳ dạng nào có thể có, ví dụ, hình cầu (hạt), hình trụ (ống nghiệm hoặc bề mặt trong của giếng), và dạng phẳng (tấm, dải thí nghiệm), và tốt hơn nữa là đĩa đa giếng (ví dụ 24 giếng, 96 giếng, 192 giếng, 384 giếng, 576 giếng và tương tự) có thể được sử dụng.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất cảm biến sinh học để chẩn đoán bệnh chikungunya, cảm biến sinh học này bao gồm: aptame ADN đặc hiệu cho protein vỏ 2 của virus Chikungunya (CHIKV E2); và nền mà aptame ADN được cố định vào.

Nền mà aptame ADN được cố định vào bao gồm lớp điện cực kim loại và lớp hạt nano kim loại của chip điện cực được in trên bề mặt (điện cực vàng in trên màn), và làm vật liệu cho điện cực và các hạt nano, bất kỳ vật liệu nào có thể bị hút bởi điện trường hoặc từ trường và có thể thay đổi các đặc tính của điện trường có thể được sử dụng, và tốt hơn là có thể bao gồm vàng (Au), nhưng không giới hạn ở đó.

Aptame ADN được cố định trên nền có thể được lai với trình tự đã được cố định để cố định trên nền bằng mạch kép, và bất kỳ aptame ADN nào liên kết đặc hiệu với CHIKV E2 không giới hạn ở bất kỳ aptame ADN nào, và tốt nhất là aptame ADN có thể là aptame CV2, nhưng không giới hạn ở đó.

Hơn nữa, trình tự đã được cố định có thể được lai với aptame CV2 để được cố định trên nền bằng phản ứng thiol-vàng, và tốt hơn là có thể là trình tự 5'-CAC ATT TCG GAT CCG CTG ACA T-(CH₂)₆-SH-3', nhưng không giới hạn ở đó.

Theo kết quả tìm kiếm aptame cho CHIKV E2 sử dụng SELEX theo phương án mẫu của sáng chế, trình tự và cấu trúc của aptame CV2 được phân tích và xác nhận (xem ví dụ 1), ái lực liên kết giữa CHIKV E2 và aptame được đo sử dụng phương pháp đo huỳnh quang (xem ví dụ 2), và hơn nữa dựa trên kết quả thí nghiệm, aptame ADN và cảm biến sinh học có độ ổn định và khả năng liên kết tuyệt vời đã được tạo ra (xem ví dụ 3), và đã xác nhận

rằng cảm biến sinh học có tính đặc hiệu tuyệt vời đối với CHIKV E2, do đó xác nhận rằng cảm biến sinh học có thể được sử dụng làm phương pháp cung cấp thông tin để chẩn đoán bệnh chikungunya (xem ví dụ 4).

Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp cung cấp thông tin về sự hiện diện của virus Chikungunya trong mẫu đối tượng, phương pháp này bao gồm: (a) đưa mẫu đối tượng vào cảm biến sinh học; (b) đưa đầu dò phát hiện chứa chấm lượng tử vào cảm biến sinh học mà đã đưa mẫu đối tượng vào trong bước (a); (c) đưa axit vào cảm biến sinh học mà đã đưa đầu dò phát hiện chứa chấm lượng tử vào trong bước (b); (d) thu dung dịch trong đó chấm lượng tử và axit trong bước (c) phản ứng với nhau; và (e) đo dòng điện (ampe (A)) của dung dịch trong bước (d).

Mẫu đối tượng để chẩn đoán bệnh chikungunya có thể là mô, tế bào, máu toàn phần, máu, nước bọt, đờm, dịch não tủy, nước tiểu hoặc các mẫu tương tự, nhưng không giới hạn ở đó.

Hơn nữa, đầu dò phát hiện lấp đầy vị trí với nhiều đầu dò phát hiện hơn vì CHIKV E2 liên kết với aptame cảm biến sinh học để di chuyển ra khỏi cảm biến sinh học, và tốt hơn là trình tự của đầu dò phát hiện là 5'-GCG GAT CCG AAA TGT GTT GTG GTT GGA GCT GC-(CH₂)₆-NH₂-3', nhưng không giới hạn ở đó.

Ngoài ra, chấm lượng tử có thể được chứa trong đầu dò phát hiện, và không giới hạn ở bất kỳ loại chấm lượng tử nào miễn là chấm lượng tử có thể phản ứng với axit, và có thể là, ví dụ cadimi sunfua (CdS), chì sunfua (PbS), và các hợp chất tương tự, tốt hơn là cadimi sunfua, nhưng không giới hạn ở đó.

Hơn nữa, axit không bị giới hạn ở bất kỳ loại axit nào miễn là axit có thể phản ứng với chấm lượng tử, và có thể là, ví dụ axit nitric, axit sunfuric, axit clohydric, và các axit tương tự, và có thể tốt hơn là axit nitric, nhưng không giới hạn ở đó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, các ví dụ được ưu tiên để giúp hiểu rõ về sáng chế sẽ được đề xuất. Tuy nhiên, các ví dụ sau được cung cấp để dễ hiểu hơn về sáng chế, và nội dung của sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ sau.

Ví dụ 1. Tìm kiếm aptame cho protein CHIKV E2 sử dụng SELEX

1-1. Tạo ra thư viện ADN mạch đơn (ssDNA)

Thư viện được tổng hợp (5'-CACCTAATACGACTCACTATAGCGGATCCGA-N40-CTGGCTCGAACAAGCTTGC-3'; SEQ ID NO: 1) có trình tự 90 nucleotit bao gồm trình tự liên kết với mồi để khuếch đại PCR và tách dòng ở cả hai đầu và trình tự 40 ADN nucleotit ngẫu nhiên ở trung tâm được thiết kế. Hơn nữa, để khuếch đại PCR và tạo ra ssDNA, mồi xuôi (5'-CACCTAATACGACACT ACTAGGA-3'; SEQ ID NO: 2), mồi ngược (5'- GCAAGCTTGTTCGAGCCAG-3'; SEQ ID NO: 3), và mồi ngược được liên kết với biotin (5'-Biotin-GCAAGCTTGTTCGAGCCAG-3') được sử dụng. Tất cả các oligonucleotit được sử dụng ở đây được tổng hợp và được tinh sạch PAGE bởi BIONICS Co., Ltd. (Hàn Quốc).

1-2. Cố định CHIKV E2 trên hạt từ tính Ni-NTA

CHIKV E2 đã tinh sạch được cố định với các hạt bằng cách sử dụng Dynabeads (Invitrogen, Na Uy) là hạt từ tính mà bề mặt của nó được phủ bằng coban để liên kết với His-tag của protein.

Cụ thể là, hòa tan 1000 pmol protein trong 100 μ L đệm liên kết protein (Tris 20 mM, NaCl 50mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 25 mM, pH 8,0) và rửa 15 μ L hạt bằng đệm liên kết sử dụng nam châm bên ngoài, và sau đó cho phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ để cố định hạt.

1-3. Chọn lọc aptame đặc hiệu cho CHIKV E2

Để chọn lọc aptame đặc hiệu cho CHIKV E2, phương pháp phân tách từ tính đặc hiệu được thực hiện. Cụ thể là, đầu tiên để tạo ra cấu trúc ổn định nhất của ssDNA, hòa tan thư viện ssDNA (500 pmol) trong 100 μ L đệm liên kết được nuôi ở 90°C trong 3 phút và nuôi ở 4°C trong 30 phút. Sau đó, cho thư viện phản ứng với CHIKV E2 được cố định trên hạt từ tính trong 1 giờ trong khi lắc nhẹ. Sau đó, rửa hạt 2 lần bằng đệm liên kết để loại bỏ ssDNA không liên kết với hạt đã liên kết với CHIKV E2. Sau đó, rửa giải ssDNA đã liên kết với protein sử dụng đệm rửa giải (Tris 20 mM, NaCl 50 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 25 mM, Tween 20 0,01%, imidazol 300 mM, và pH 8,0) để phân tách ssDNA đã liên kết với

protein trong hạt từ tính. Kết tủa ssDNA đã rửa giải sử dụng etanol, sau đó hòa tan trong 60 μ L nước cất, và sau đó khuếch đại bằng PCR sử dụng i-pfu polymeraza (iNtRON Biotechnology, Inc., Hàn Quốc) sử dụng mỗi xuôi và mỗi ngược được liên kết với biotin. Để tạo ra ssDNA cho quá trình chọn lọc tiếp theo, nuôi sản phẩm PCR được liên kết với biotin cùng với hạt từ tính được phủ bằng streptavidin liên kết với biotin trong đệm ghép đôi (Tris-HCl 5 mM, EDTA 0,5 mM, NaCl 1 M, Tween 20 0,005%, và pH 7,5) trong 1 giờ. Sau khi nuôi, nuôi sản phẩm PCR bằng 100 μ L NaOH 100 mM trong 10 phút để phân tách chỉ ssDNA, và chỉ ssDNA đã chọn mới có thể thu được bằng cách sử dụng nam châm bên ngoài. Ngoài ra, lặp lại quá trình chọn lọc bằng cách sử dụng ssDNA được chọn đầu tiên cho quá trình chọn lọc tiếp theo. Trong trường hợp này, quá trình chọn lọc được thực hiện trong khi làm giảm thêm lượng ssDNA và nồng độ CHIKV E2 để chọn lọc nghiêm ngặt, và quá trình chọn lọc được thực hiện trong khi đo nồng độ ssDNA được rửa giải trong quá trình chọn lọc lặp lại bằng quang phổ kế UV (phổ kế Biochrom Libra S22) để xác nhận mức độ liên kết của ssDNA còn lại với CHIKV E2. Mức độ liên kết (%) được thể hiện trong FIG. 1.

1-4. Phân tích cấu trúc và phân tích trình tự aptame

Khuếch đại ssDNA được chọn lọc lặp lại lần thứ 13 thông qua quá trình PCR sử dụng mỗi xuôi và mỗi ngược không cải biến và tách dòng vào vectơ pENTR/TOPO (TOPO TA Cloning kit, Invitrogen, Hoa Kỳ), và sau đó biến nạp vào tế bào TOP10 của E. coli (Invitrogen, Hoa Kỳ). Tinh sạch dòng mà ssDNA đã được chèn vào sử dụng bộ kit miniprep kit (GeneAll, Hàn Quốc), và sau đó phân tích trình tự nucleotit (COSMO Genetech, Hàn Quốc). Kết quả là, có thể phân tích các trình tự trong bảng 1 sau đây.

Bảng 1

Trình tự của ứng viên aptame (5'→ 3')		
CV2 (90 mer)	CACCTAATACGACTCACTATAGCGGATCCGAAATGTG TTGTGGTTGGAGCTGCATA AACCCTTTCTTCCCGCTGGCTCGAACAAGCTTGC	SEQ ID NO: 5

Ví dụ 2. Đo ái lực liên kết giữa protein và aptame bằng cách sử dụng phương pháp đo huỳnh quang

Sau khi trộn CHIKV E2 400 pmol với 10 uL hạt từ tính, nuôi hỗn hợp thu được trong 100 uL đệm liên kết (Tris 20 mM, NaCl 50 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 5mM, và pH 8,0) trong 1 giờ. Rửa hỗn hợp 2 lần bằng đệm liên kết để phân tách CHIKV E2 không được liên kết. Sau đó, nuôi hỗn hợp với aptame được đánh dấu bằng 6-FAM ở các nồng độ khác nhau trong 1 giờ, và loại bỏ aptame không được liên kết bằng cách rửa. Đo lượng aptame ssDNA đánh dấu bằng 6-FAM đã được liên kết với hạt từ tính mà CHIKV E2 được cố định vào bằng phương pháp đo huỳnh quang (1420 Victor multilabel counter, PerkinElmer, Hoa Kỳ) bằng cách chỉ phân tách ssDNA đánh dấu bằng 6-FAM được liên kết với CHIKV E2 sử dụng nam châm. Kết quả là, như được thể hiện trong FIG. 2 và bảng 2 sau đây, giá trị K_d của aptame ADN có trình tự nucleotit CV2 có thể được đo.

Bảng 2

Aptame	K_d (nM)
CV2	$19,3 \pm 7,3$ nM

Ví dụ 3. Tối ưu điều kiện phát hiện và sản xuất cảm biến sinh học

Để phát hiện CHIKV E2 bằng aptame ADN tìm thấy trong ví dụ 1, cảm biến sinh học có độ nhạy phát hiện tuyệt vời được thiết kế bằng cách sử dụng kỹ thuật von-ampe hòa tan (stripping voltammetry). FIG. 3 là sơ đồ của cảm biến sinh học để phát hiện CHIKV E2 bằng cách sử dụng aptame ADN của sáng chế.

5'-GCG GAT CCG AAA TGT GTT GTG GTT GGA GCT GC-3'

Thứ nhất, hấp phụ hạt nano vàng vào điện cực vàng của chip điện cực vàng in trên màn (SPGE - screen printed gold electrode), và sau đó cố định mạch kép trong đó trình tự được cố định (5'-CAC ATT TCG GAT CCG CTG ACA T-(CH₂)₆-SH-3') được lai với aptame CV2 (5'- GCG GAT CCG AAA TGT GTT GTG GTT GGA GCT GC-3'; SEQ ID NO: 4) vào bề mặt vàng. Sau đó, khi bổ sung CHIKV E2 để được phát hiện, cho hỗn hợp

thu được phản ứng trong 40 phút, và sau đó rửa bằng nước cất, aptame CV2 phản ứng đặc hiệu với CHIKV E2 liên kết với protein và phá vỡ, và trình tự được cố định tương ứng được duy trì ở dạng sợi đơn. Cuối cùng, thực hiện phân tích von-ampe hòa tan sóng vuông (stripping square wave voltammetry) bằng cách cho trình tự đầu dò phát hiện (5'- GCG GAT CCG AAA TGT GTT GTG GTT GGA GCT GC-(CH₂)₆-NH₂-3') được liên kết với chấm lượng tử cadimi sunfua (CdS) phản ứng trong 40 phút, rửa sản phẩm thu được bằng nước cất, và sau đó chuyển dung dịch mà đã được phản ứng thêm với 70 μ L axit nitric acid 1 M trong 1 giờ vào đệm axetat/bimut (đệm axetat 0,1 M, bitmut 400 μ g/L, và pH 4,5).

CHIKV E2 càng liên kết với đầu dò bề mặt cảm biến sinh học và phá vỡ, thì càng có nhiều trình tự đầu dò phát hiện chiếm vị trí, và cadimi sunfua (chấm lượng tử) phản ứng với axit nitric sẽ giải phóng một lượng lớn ion cadimi vào dung dịch. Điều này có thể được quan sát thấy như là đỉnh trên đồ thị kỹ thuật von-ampe hòa tan phát hiện các ion kim loại có tính đặc hiệu và độ nhạy cực cao, cho phép phân tích định lượng kiểu tín hiệu bật.

Dựa trên điện hóa, CHIKV E2 tái tổ hợp được phát hiện bằng cách sử dụng aptame CV2 được chọn. Kết quả là, như được thể hiện trong FIG. 4A và FIG. 4B, có thể xác nhận rằng khi nồng độ CHIKV E2 tăng (1 pM đến 100 μ M), thì giá trị dòng điện tăng (xem FIG. 4A). Biểu đồ với giá trị dòng điện trên trục y và giá trị nồng độ CHIKV E2 được chuyển đổi thành Log trên trục x được tạo ra, và theo đó, đã xác nhận rằng CHIKV E2 được phát hiện định lượng bằng cảm biến sinh học được sản xuất ở trên, và giới hạn phát hiện là 0,10 pM (xem FIG. 4B).

Ví dụ 4. Xác nhận tính đặc hiệu liên kết của aptame phát hiện CHIKV E2

Vì tính đặc hiệu liên kết là không phản ứng với các protein khác nhau trong máu ngoài CHIKV E2 đích là quan trọng để aptame ADN được sử dụng làm cảm biến sinh học, nên tính đặc hiệu liên kết đã được xác nhận đối với các mẫu protein khác nhau để xác nhận liệu aptame ADN có liên kết một cách chọn lọc hay không. Trong trường hợp này, việc trộn được thực hiện với PBS sao cho nồng độ của mỗi protein được phát hiện là 10 nM.

Kết quả là, như được thể hiện trong FIG. 5, đã xác nhận rằng tính đặc hiệu với CHIKV E2 là tuyệt vời. Cụ thể là, trong số các protein đối chứng, YFV là protein bề mặt của virus nhiệt đới truyền nhiễm giống với CHIKV, và mặc dù YFV thường được biết là có

tính phản ứng chéo cao trong số các bệnh nhiệt đới truyền nhiễm, nhưng đã xác nhận rằng YFV không liên kết với aptame ADN được phát triển theo sáng chế. Có nghĩa rằng aptame ADN của sáng chế phản ứng với CHIKV E2 có tính đặc hiệu liên kết cao. Hơn nữa, aptame ADN của sáng chế có tính đặc hiệu cao ngay cả khi so sánh với HSA là protein huyết thanh.

Từ những điều trên, có nghĩa là aptame ADN CV2 được phát triển theo sáng chế không chỉ có tính đặc hiệu liên kết cực cao với CHIKV E2, mà còn có thể được sử dụng làm cảm biến sinh học ngay cả trong mẫu sinh học phức tạp.

Để tham chiếu, các trình tự của sáng chế được liệt kê trong bảng 3 sau đây.

Bảng 3

Danh mục trình tự	Tên	Trình tự
SEQ ID NO: 1	Thư viện ssDNA	CACCTAATACGACTCACTATAGCGGATCCG A-N40-CTGGCTCGAACAAGCTT GC
SEQ ID NO: 2	Mỗi xuôi	cacctaatac gactcactat agcgga
SEQ ID NO: 3	Mỗi ngược	gcaagcttgt tcgagccag
SEQ ID NO: 4	Aptame CV2	GCG GAT CCG AAA TGT GTT GTG GTT GGA GCT GC
SEQ ID NO: 5	CV2	CACCTAATACGACTCACTATAGCGGATCCG AAATGTGTTGTGGTTGGAGCTGCATA AACCCTTTCTTCCCGCTGGCTCGAACAAG CTTGC
SEQ ID NO: 6	Trình tự được cố định	CAC ATT TCG GAT CCG CTG ACA T

Mô tả ở trên của sáng chế được đưa ra nhằm mục đích minh họa, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế liên quan sẽ hiểu rằng sáng chế có thể dễ dàng được sửa đổi thành các dạng cụ thể khác mà không làm thay đổi bản chất kỹ thuật hoặc các

dấu hiệu thiết yếu của sáng chế. Do đó, cần hiểu rằng các ví dụ được mô tả ở trên chỉ mang tính minh họa về mọi mặt và không giới hạn sáng chế.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Do aptame ADN liên kết đặc hiệu với protein vỏ 2 của virus Chikungunya (CHIKV E2) của sáng chế có ái lực liên kết mạnh và tính đặc hiệu tuyệt vời đối với CHIKV E2, virus chikungunya có thể được chẩn đoán với độ chính xác tăng lên đáng kể so với phương pháp chẩn đoán sử dụng kháng thể hiện có, do đó aptame ADN được mong đợi để được sử dụng hiệu quả trong các sản phẩm khác nhau để chẩn đoán như bộ kit chẩn đoán và chế phẩm chẩn đoán.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Aptame ADN liên kết đặc hiệu với protein vỏ 2 của virus Chikungunya (CHIKV E2), trong đó aptame ADN chứa trình tự nucleotit SEQ ID NO: 4.
2. Aptame ADN theo điểm 1, trong đó E2 của virus Chikungunya là protein chứa protein miền trên bề mặt của kháng nguyên virus Chikungunya.
3. Chế phẩm để chẩn đoán bệnh chikungunya, chế phẩm này chứa aptame ADN theo điểm 1.
4. Bộ kit để chẩn đoán bệnh chikungunya, bộ kit này bao gồm aptame ADN theo điểm 1.
5. Cảm biến sinh học để chẩn đoán bệnh chikungunya, cảm biến sinh học này bao gồm: aptame ADN đặc hiệu cho protein vỏ 2 của virus Chikungunya (CHIKV E2); và nền mà aptame AND được cố định trên đó, trong đó aptame ADN chứa trình tự nucleotit SEQ ID NO: 4.
6. Cảm biến sinh học theo điểm 5, trong đó nền bao gồm lớp điện cực kim loại và lớp hạt nano kim loại và kim loại là vàng (Au).
7. Cảm biến sinh học theo điểm 5, trong đó aptame ADN được lai với trình tự đã được cố định để cố định trên nền bằng mạch kép.
8. Phương pháp cung cấp thông tin về sự hiện diện của virus Chikungunya trong mẫu đối tượng, phương pháp này bao gồm các bước: (a) đưa mẫu đối tượng vào cảm biến sinh học; (b) đưa đầu dò phát hiện chứa chấm lượng tử vào cảm biến sinh học mà đã đưa mẫu đối tượng vào trong bước (a); (c) đưa axit vào cảm biến sinh học mà đã đưa đầu dò phát hiện vào trong bước (b); (d) thu dung dịch trong đó chấm lượng tử và axit phản ứng với nhau trong bước (c); và (e) đo dòng điện (ampe (A)) của dung dịch trong bước (d).
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó chấm lượng tử là cadimi sunfua (CdS).

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> POSTECH Academy-industry Foundation
MD Healthcare Inc.
- <120> Aptame ADN liên kết đặc hiệu với protein vỏ 2 của virus Chikungunya, chế phẩm, bộ kit, cảm biến sinh học chứa aptame ADN này để chẩn đoán bệnh chikungunya, và phương pháp cung cấp thông tin về sự hiện diện của virus Chikungunya trong mẫu
- <130> MPCT19-122
- <150> KR 10-2018-0165203
<151> 2018-12-19
- <160> 6
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
<211> 89
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
- <220>
<223> Thư viện ssDNA
- <400> 1
cacctaatac gactcactat agcggatccg annnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
60
nnnnnnnnnn ctggctcgaa caagcttgc
89
- <210> 2
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
- <220>
<223> Mồi xuôi
- <400> 2
cacctaatac gactcactat agcgga
26
- <210> 3
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi ngược

<400> 3

gcaagcttgt tcgagccag
19

<210>

4

<211>

32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Aptame CV2

<400> 4

gcggatccga aatgtgttgt gggtggagct gc
32

<210>

5

<211>

90

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CV2

<400> 5

cacctaatac gactcactat agcggatccg aaatgtgttg tggttggagc tgcataaacc
60

ctttcttccc gctggctcga acaagcttgc
90

<210>

6

<211>

22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

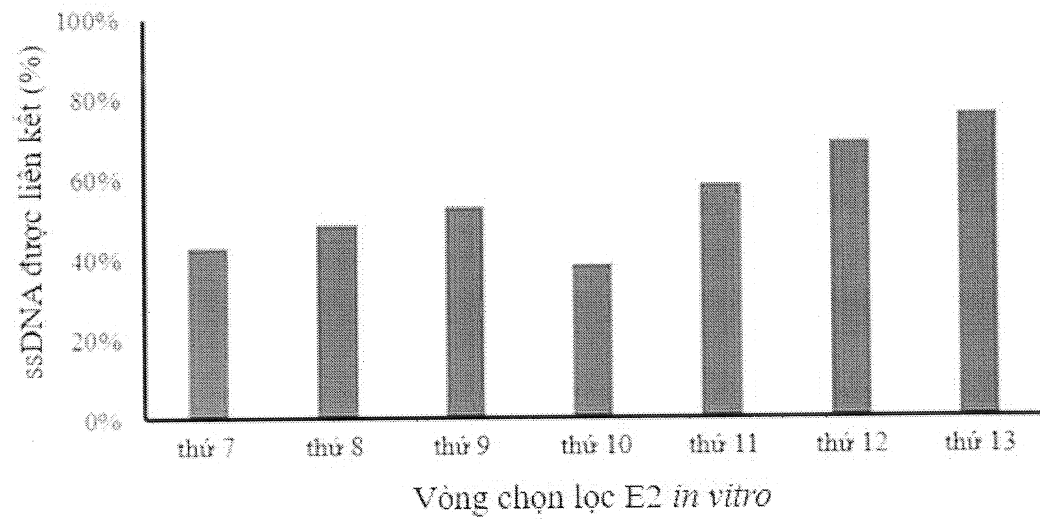
<223> CAC ATT TCG GAT CCG CTG ACA T

<400> 6

cacatttcgg atccgctgac at
22

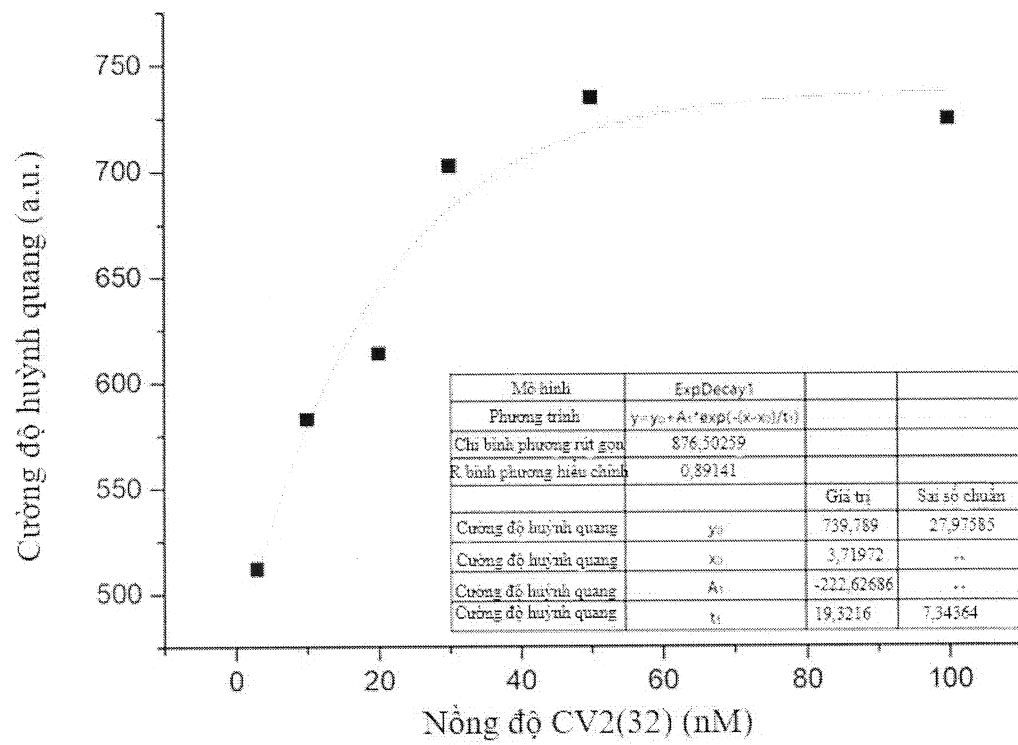
1/6

FIG. 1



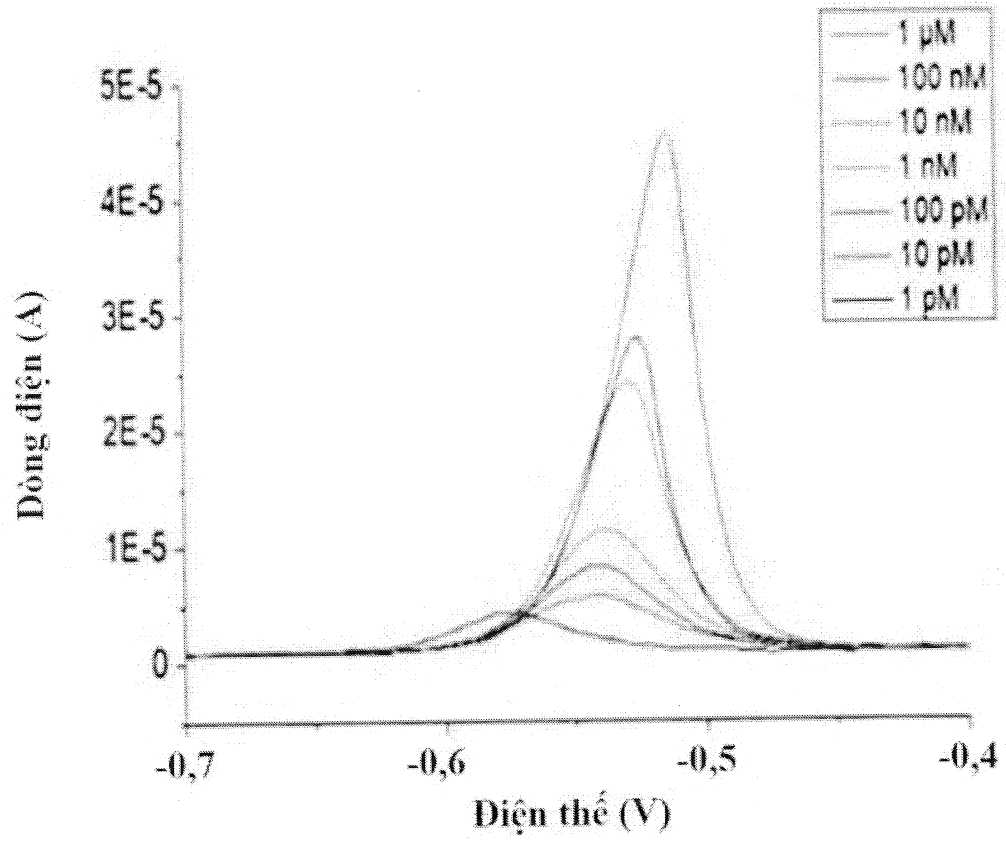
2/6

FIG. 2



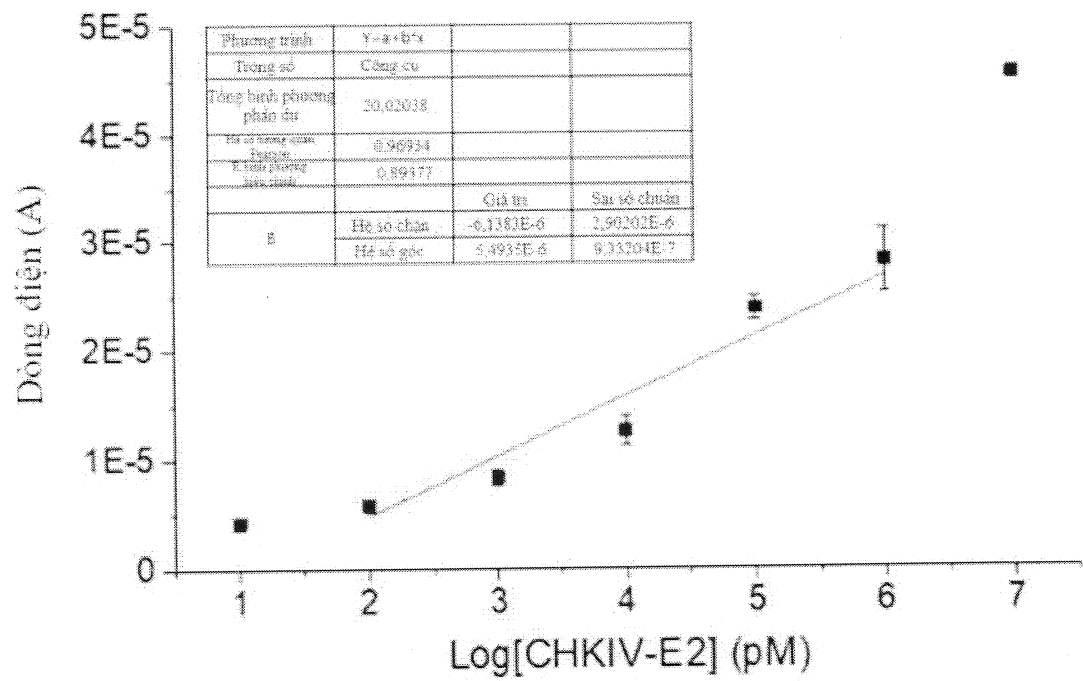
4/6

FIG. 4A



5/6

FIG. 4B



6/6

FIG. 5

