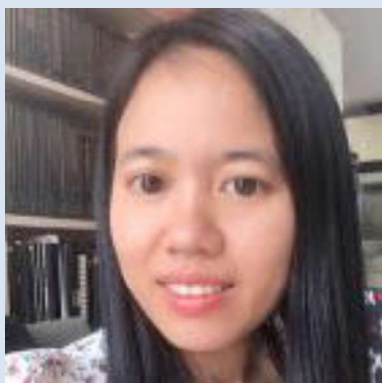




Tác giả: TS. Trần Thị Thanh Thòa

Đơn vị công tác: Institute of Fluid Mechanics
Busan, Friedrich-Alexander-University of
Erlangen-Nürnberg (LSTME), Hàn Quốc

Email: tran.thoa@lstme.org

Tác giả hiện đang là khoa học gia (Research Scientist), công tác tại viện khoa học và kỹ thuật, chi nhánh tại Busan, Hàn Quốc (LSTME, thuộc Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg của Đức). Trước đó, từ 9/2012-3/2017, tác giả đã từng là Junior Research Associate tại phòng nghiên cứu kỹ thuật y học Nano, Viện RIKEN, Nhật Bản và tiếp sau đó nữa là giáo sư nghiên cứu của Đại học Cao Ly (Korea University). Hướng nghiên cứu chính là phát triển, sàng lọc, kiểm tra hoạt tính và ứng dụng của DNA và RNA aptamer. Là tác giả chính của hai bằng sáng chế, và 5 bài báo quốc tế trong lĩnh vực này, đồng thời là đồng sáng lập của nhóm học thuật IBSG, nhóm hoạt động phi lợi nhuận nhằm hỗ trợ những người làm nghiên cứu trong lĩnh vực Y sinh học.

<https://doi.org/10.15625/vap.2021.0030>

DNA/RNA aptamer: Tổng quan về phương pháp sàng lọc, hiện trạng và hạn chế ứng dụng trong y học

Trần Thị Thanh Thòa

Research Scientist, Institute of Fluid Mechanics Busan,
Friedrich-Alexander-University of Erlangen-Nürnberg
(LSTME), Hàn Quốc

TÓM TẮT:

Aptamers là các đoạn DNA/RNA sợi đơn ngắn có chiều dài từ 20-100 nucleotide và được chọn lọc thông qua một quá trình tương tự như quá trình chọn lọc tự nhiên trong tiến hóa được gọi là Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) [1][2][3]. Do khả năng gắn với phổ rộng đối với nhân tố đích, mà aptamer được sử dụng trong nhiều mục đích khác nhau từ trong việc dùng nó để làm nhân tố nhận biết các chỉ dấu môi trường hay bệnh học, đến dùng nó trong liệu pháp hướng đích trị bệnh [4][5][6]. Trong y học, aptamer được biết đến như một kháng thể hóa học, đã được chứng minh là có giá trị chẩn đoán và điều trị cao qua việc loại thuốc aptamer đầu tiên của FDA vào năm 2004 và nhiều aptamer đã được kiểm chứng lâm sàng ở pha cuối [7][8]. Cùng với các loại DNA/RNA khác, sử dụng aptamer để phát triển vaccine, thuốc hướng đích đang một xu hướng được quan tâm và đầy hứa hẹn. Trong giới hạn của bài viết này, tôi xin giới thiệu tổng quan về aptamer, nguyên tắc cơ bản trong phương pháp chọn lọc aptamer, tình hình hiện tại trong việc sử dụng aptamer, những vấn đề tồn tại trong quá trình phát triển aptamer để phát triển thuốc trong liệu pháp hướng đích và gợi ý hướng nghiên cứu mới trong lĩnh vực này.

Từ khóa: RNA/DNA aptamer, SELEX, chọn lọc aptamer, liệu pháp hướng đích.

1. Tổng quan về aptamer

Là một trong sáu liệu pháp điều trị dùng RNA hoặc DNA làm nguyên liệu chính, aptamers là một loại phương pháp trị liệu mới nổi để điều trị các căn bệnh còn chưa có liệu pháp hữu hiệu [6][7][8]. Aptamer được lựa chọn thông qua một phương pháp chọn lọc gọi là SELEX và có khả năng nhắm vào chỉ dấu bệnh mục tiêu ở cấp độ di truyền bằng cách ngăn chặn sự biểu hiện của các protein gây bệnh [1][2][7]. Thông qua quá trình chọn lọc khắt khe bằng phương pháp SELEX, chúng ta thu nhận được một vài trình tự oligonucleotide quý hiếm từ “một bể” trình tự ngẫu nhiên ban đầu gồm từ 10^{15} - 10^{17} trình tự khác nhau. Do vậy, trình tự được tạo có thể gắn với nhân tố đích với ái lực lớn và tính đặc hiệu cao [4][5][6][7]. Các nhân tố đích của aptamer được dùng rất đa dạng từ ion, kim loại đến tế bào động vật, vi khuẩn và mô động vật. Đặc tính hướng đích của aptamers được tạo ra thông qua cấu trúc đặc trưng từ các loops, stems, hairpins, pseudoknots, bulges, triplexes, or quadruplexes để tạo thành các hình dạng 3D cụ thể và phức tạp [4][8][9]. Tương tự như kháng thể, aptamers liên kết với nhân tố đích dựa trên cấu trúc này và

thông qua liên kết hydro, tĩnh điện, xếp chồng các vòng thơm, tương thích cấu trúc, tương tác van der Waals và cả sự tổng hợp của những tương tác này [4][6][8]. Aptamers còn được gọi là kháng thể hóa học tiên tiến vì ái lực liên kết của aptamers với mục tiêu tương tự như ái lực quan sát được với các kháng thể đơn dòng [7][10].

Kể từ khi các aptamers đầu tiên được tạo ra vào năm 1990, nhiều phương pháp dị bản của quy trình SELEX đã được phát triển nhằm tạo ra các aptamers có độ đặc hiệu cao và có ái lực mạnh với yếu tố đích mong muốn [1][2][3][10]. Hầu hết các aptamer dùng trong chữa bệnh hiện nay trên thị trường và đang áp dụng cho các thử nghiệm lâm sàng là các aptamer đã được biến đổi (modified nucleotides). Việc biến đổi cấu trúc aptamer sau khi chọn lọc nhằm cải thiện độ ổn định hoặc tạo lập các tính năng mới cho aptamer và cải thiện khả năng liên kết của nó để nâng cao hiệu quả ứng dụng. Ngoài ra, nhiều nhóm nghiên cứu định hướng sử dụng thư viện DNA/RNA ban đầu chứa các nucleotide đã được biến đổi về mặt hóa học cho chọn lọc [8][9]. Trong quá trình chọn lọc và thiết kế lại cấu trúc, so với kháng thể, aptamers có những ưu điểm riêng biệt như có thể tổng hợp hóa học mà không dùng đến động vật, tính ổn định cao, chi phí thấp, dễ sửa đổi và khả năng hoạt động linh hoạt trong nhiều môi trường đệm khác nhau [8][9][10]. Các thuộc tính đáng chú ý này của aptamer khiến nó có thể cho nhiều ứng dụng thực tế trong giám sát môi trường, quản lý an toàn thực phẩm và chẩn đoán [4][7][10]. Tuy nhiên, nếu trong lĩnh vực phát triển thiết bị giám sát độc chất môi trường, thức ăn aptamer đã đạt nhiều thành tựu đáng kể thì trong lĩnh vực y học các aptamer trị liệu đã tụt hậu xa so với các kháng thể điều trị, điều này để lại khoảng cách rất lớn giữa các aptamer đã được chọn lọc và ứng dụng điều trị của chúng. Trong phạm vi của bài này, xin được vẽ lại một bức tranh tổng quan của việc chọn lọc aptamer và tình hình ứng dụng nó trong y học.

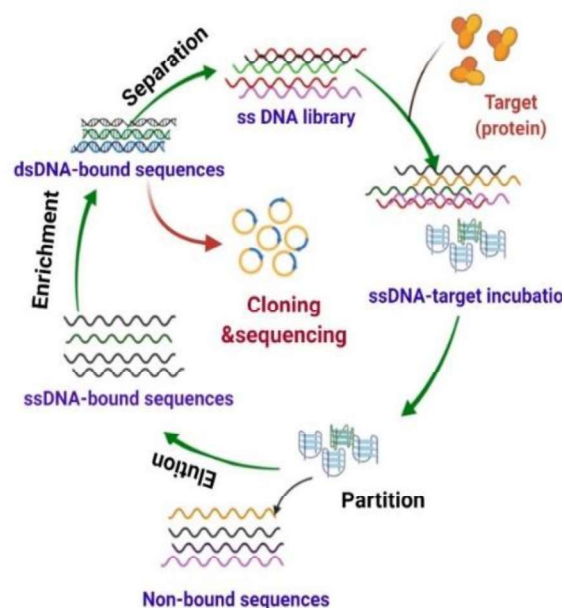
2. Nguyên tắc và các bước cơ bản trong chọn lọc aptamer

Các aptamers được phát triển để gắn cho nhiều đích đặc hiệu khác nhau, bao gồm các ion, phân tử nhỏ, đại phân tử và toàn bộ tế bào, nhưng hầu hết aptamers được thiết kế để liên kết với protein [1][2][3][11][12][13][14]. Aptamers cho hoạt tính và ái lực liên kết tương tự với các kháng thể đơn dòng nhưng có tính ổn định, tính linh hoạt và tổng hợp hóa học dễ dàng [10]. Vì lý do này, aptamers được sử dụng hướng đến cho các chỉ dấu sinh học (biomarker) cho bệnh cho trong mục đích chẩn đoán và điều trị, bao gồm protein, thụ thể (qui trình chọn lọc cơ bản như hình 1A), tế bào khối u di chuyển trong hệ tuần hoàn và toàn bộ tế bào (qui trình chọn lọc cơ bản như hình 1B) [15].

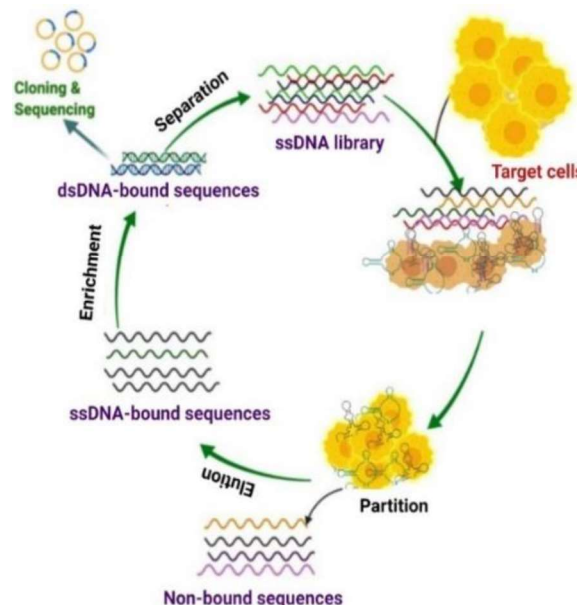
Quy trình thiết kế và điều kiện chọn lọc aptamer thông

qua SELEX dựa trên cấu trúc của yếu tố đích, mục đích sử dụng của aptamer và các kỹ thuật hiện có của phòng thí nghiệm. Nói cách khác, cho đến nay không có phương pháp chuẩn nào của SELEX cho các nhân tố đích khác nhau. Về nguyên tắc, những yêu cầu cần thiết cho quy trình SELEX bao gồm sự chọn lọc dựa trên mức cạnh tranh ái lực, sự nhân bản bằng kỹ thuật RT-PCR, PCR nhờ enzyme, quy trình này gần như là sự bắt chước kiểu lại quá trình chọn lọc tự nhiên theo học thuyết Darwin [6][15][16]. Một quy trình SELEX điển hình thường bắt đầu với một thư viện các

(A)



(B)



Hình 1. Các bước cơ bản trong chọn lọc aptamer cho protein (A) và tế bào động vật (B)

oligonucleotide DNA có trình tự ngẫu nhiên được tổng hợp hóa học chứa khoảng 10^{12} đến 10^{17} trình tự khác nhau. Sau khi thư viện DNA/RNA này được tổng hợp, quá trình sàng lọc trình tự gắn với đích tuân theo ba bước tuần tự: ủ nhân tố đích với các trình tự, loại bỏ những trình tự không tương tác với đích và thu nhận những trình tự gắn kết với nhân tố đích [4][6][10] (Hình 1).

Thư viện với trình tự ban đầu này được dùng nhiệt tạo cấu trúc bậc hai sẽ ủ với nhân tố đích được gắn cố định hoặc tự do trong các điều kiện nghiêm ngặt. Sự gắn kết giữa trình tự DNA/RNA ngẫu nhiên với nhân tố đích sau đó được tách ra khỏi những trình tự oligonucleotide không liên kết hoặc liên kết yếu thông qua bước rửa. Các oligonucleotide liên kết với mục tiêu được phục hồi và được làm giàu bằng PCR (trong DNA SELEX) [16][17] hoặc RT-PCR (trong RNA SELEX) [18][19][20][21]. Từ DNA sợi đôi (dsDNA) sau khi khuếch đại, cần được phân lập thành một thư viện DNA sợi đơn (ssDNA) mới tương quan bằng nhiều phương pháp khác nhau, điển hình là dùng hạt từ, dùng đoạn nối chứa huỳnh quang và phân tách bằng điện di để tạo sợi đơn DNA [16][17], còn chọn lọc RNA thì từ sản phẩm PCR, chúng ta dùng RT-PCR để tổng hợp thành [18][19][20][21]. Thư viện mới được tạo lập lại trở thành thư viện khởi đầu cho chu trình chọn lọc mới. Sử dụng nhiều chu kỳ chọn lọc và khuếch đại, số lượng trình tự ban đầu sẽ bị giảm và chỉ bao gồm các trình tự có ái lực liên kết cao với nhân tố mục tiêu. SELEX bổ sung, chẳng hạn như counter-SELEX hay negative-SELEX, có thể được đưa vào trong quá trình SELEX để thu được các trình tự liên kết đặc hiệu với đích [4][6][10].

Các quá trình sàng lọc này thường được tiến hành qua 6-20 chu kỳ, sau đó các trình tự gắn với với yếu tố hướng đích sẽ được tách riêng qua quá trình nhân bản bằng cloning và giải trình tự [1][2][3][10]. Gần đây, người ta sử dụng phương pháp giải trình tự thế hệ mới để nâng cao hiệu suất chọn lọc [11]. Các ứng viên được chọn này sẽ được đánh giá, kiểm tra về độ nhạy, tính đặc hiệu để chọn ra trình tự tốt nhất [5][6][7]. Các phương pháp sàng lọc độ nhạy và đặc hiệu này thường dùng nhất là các phương pháp đơn giản như dùng chỉ thị màu hay phương pháp đo đặc biến đổi huỳnh quang trước và sau khi ủ với yếu tố đích của mỗi trình tự. Trình tự tốt nhất được chọn ra lại được dùng để kiểm tra lần nữa về độ nhạy, đặc hiệu, cơ chế gắn với yếu tố đích, nồng độ, hoạt tính của nó với yếu tố đích trước khi đem vào ứng dụng [6][7].

Ngoài ra, như đã đề cập trên đây, để tăng tính ổn định, bền vững và hoạt tính các aptamer sau khi được chọn lọc được cải biến cấu trúc để kháng lại nuclease phân giải có trong cơ thể hay môi trường [4][6][10]. Một số

nhóm nhà khoa học đã và đang dùng các cấu trúc nucleotides nhân tạo để tổng hợp thư viện DNA ban đầu [8][9]. Có một số nhóm khá nổi tiếng trong mảng này là nhóm của GS. Hirao (viện RIKEN, Nhật Bản)⁸ và của GS Philipp Holliger (Đại học Cambridge, Anh Quốc) [9]. Nhóm Hirao tập trung vào chèn các nucleotide đã biến đổi có tính kỵ nước vào trình tự, phương pháp EX-SELEX [8], còn nhóm Holliger dùng phương pháp X-SELEX, trình tự chứa toàn bộ nucleotide đã biến đổi [9]. Cá nhân người viết bài này thấy việc lựa chọn thư viện không tự nhiên vẫn còn nhiều thách thức, bao gồm thời gian và chi phí, quy trình phức tạp và khó kiểm soát tính đa dạng của thư viện. Đặc biệt, với việc dùng thư viện đã biến đổi thì việc tổng hợp và giải trình tự vô cùng khó khăn, đòi hỏi kỹ thuật cao và tốn kém. Tuy nhiên, nó tang tính đa dạng cho nguồn cấu trúc ban đầu nếu được kiểm soát tốt.

3. Tình hình của việc ứng dụng aptamer trong điều trị bệnh hiện nay

3.1. Trong ứng dụng tiền lâm sàng

Như với bất kỳ sự phát triển thuốc mới nào, thuốc dựa trên aptamer yêu cầu các thử nghiệm tiền lâm sàng được chấp thuận để chuyển sang thử nghiệm lâm sàng trên người. Thử nghiệm tiền lâm sàng này cần tiến hành trên tế bào/ mô động vật, người hoặc sử dụng mô hình máy tính để thu được thông tin về dược động học, dược lực học và độ an toàn của aptamers. Chiến lược chính của hầu hết các phương pháp điều trị dựa trên aptamer là hoạt động như một chất đối kháng để ức chế các tương tác hoặc giữa các tế bào, protein-protein hoặc thụ thể-phối tử [17][18][19][20][21]. Sau đó, các aptamers sau sẽ được nghiên cứu tiền lâm sàng để tìm hiểu về độ an toàn, nồng độ cần dùng, khả năng chuyển hóa, phân phối và hoạt động trên cơ thể động vật (Bảng 1)

3.2. Hiện trạng của aptamer trong ứng dụng lâm sàng

Thông thường, aptamers tương tác với toàn bộ tế bào và các thụ thể của tế bào để nhắm mục tiêu các tác nhân phân phối mục tiêu, các phối tử để điều trị. Năm 2004, loại thuốc aptamer đầu tiên được FDA chấp thuận đã chứng tỏ hữu ích trong chẩn đoán và điều trị. Tuy nhiên, bất chấp các đặc tính tiên tiến của loại kháng thể hóa học này, vẫn còn một khoảng cách lớn giữa các aptamer được chọn lọc và các aptamer dùng trong điều trị. Theo Dunn M. R et al trong một bài tổng quan gần đây trên tạp chí Nature Review thì trong số 1003 thí nghiệm in vitro, 584 là aptamer cho các protein chỉ dấu bệnh và 141 là aptamer cho tế bào bệnh. Tuy nhiên, trong số đó, chỉ có 13 aptamers đối với protein đạt được thử nghiệm lâm sàng được liệt kê trong (Bảng 2).

Bảng 1. Danh sách các aptamer chính đã thực hiện kiểm tra tiền lâm sàng

Tên của aptamer	Công thức	Yếu tố đích	Động vật thử nghiệm	Reference
RA-36	DNA	Thrombin	Chuột, chuột, thỏ, chuột lang và khí	[22]
ARC126 ARC127	RNA and modified RNA	PDGF-B	Thỏ và chuột chuyển gen rho / PDGF-B	[23] [24]
AX102	RNA oligonucleotide in L-configuration	CXCL12	Chuột, chuột cống	[25][26]
TEPP-DOX	DNA	Transferrin receptor and (EpCAM) on metastatic cancer cells	Chuột	[27][28]
Pegaptanib	DNA	VEGF	Chuột, chuột, thỏ, chuột lang và khí	[29]
Trimeric apt	DNA	HER2	Chuột cái BALB/c	[25][30]
PNDA-3	DNA	Periostin	Chuột 4T1	[22]
TTA1 GBI-10	Unmodified DNA 2'-O-Me DNA LNA- modified	Tenascin- C	Chuột cái	[31][33]
OPN-R3	Unmodified and 2'-O-Me DNA	Osteopontin	Chuột cái	[26][34]
AS1411	DNA	Nucleolin	Chuột và chuột không lông	[31][65] [66]
ESTA	Thiolation DNA	E-selectin	Chuột	[67][68]
Olaptesed pegol (NOX-A12)	40 kDa PEG DNA aptamer	SDF-1	Chuột và chuột cống	[39][40]
ARC81 ARC117 ARC119	Unmodified 20 kDa PEG DNA aptamer 40 kDa PEG DNA aptamer	TGFβ2	Thỏ	[41]
NOX 1255 NOX1257	DNA	GnRH	Chuột cống	[42][43]

Bảng 2. Các aptamer đang trong thử nghiệm lâm sàng, cập nhật đến 8/2020 từ trang <https://clinicaltrials.gov>

Tên aptamer/yếu tố đích	Trình tự	Công thức và biến đổi	Mã số và hiện trạng thử nghiệm lâm sàng	Bệnh điều trị	Tài liệu tham khảo
Macugen (pegaptanib sodium) / VEGF	5'-CGGAAUCAGUAGAUGCUUAUAGAUCG-3'	• 27-nt RNA • 2'-fluoropyrimidines • 2'-O-methyl purines • 3'-inverted dT • 40kDaPEG	• NCT00021736 (phase II/III, completed) • NCT00040313 (phase II, completed) • NCT00056199 (phase I, completed) • NCT00312351 (phase IV, terminated) • NCT00321997 (phase II/III, completed) • NCT01487070 (phase I, completed). Approved on Dec 2004 in the United States and the European Union for AMD treatment	Thoái hóa điểm vàng do lão hóa(AMD) Bệnh tiểu đường phù hoàng điểm Bệnh tiểu đường tăng sinh bệnh võng mạc	[27][44]

Ga-Sgc8/ PTK7	5'- ATCTAACTGCT GCGCCGCCGGG AAAATACTGTA CGGTTAGA-3'	41 nt DNA aptamer, Sgc8 was linked to a bi-functional group NOTA for 68Ga chelation.	• NCT03385148 phase I, completed	Chẩn đoán ung thư đại trực tràng	[45]
ARC1905 Ophthotech / C5	5'- CGCCGCGGUCU CAGGCGCUGA GUCUGAGUUU CCUGCG -3'	• 38-nt RNA • 2'- fluoropyrimidi nes • 2'-O-methyl purines • 3'-inverted dT • 40kDaPEG	• NCT00709527 (phase I, completed) • NCT00950638 (phase I, completed) • NCT02397954 (phase II, completed) • NCT02686658 (phase II/III, unknown)	AMD Idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy Geographic atrophy	[20][46]
EYE001/ VEGF	5'- CGGAAUCAGU AGAUGCUGAU AGAUCCG-3'	• 27-nt RNA • 2'- fluoropyrimidi nes • 2'-O-methyl purines • 3'-inverted dT • 40kDaPEG	• NCT00056199 (phase I, completed) • NCT00150202 (phase II, completed) • NCT00239928 (phase III, completed) • NCT00021736 (phase II/III, completed) • NCT00321997 (phase II/III, completed) • NCT00040313 (phase II, completed)	Hippel-Lindau Disease Macular Degeneration Diabetic Macular Edema	[44]
E-10030 Ophthotech/ PDGF	Not available	• 29&36-nt RNA • 2'-O-methyl purines • 3'-inverted dT • 40kDaPEG	• NCT00569140 (phase I, completed) • NCT01089517 (phase II, completed) • NCT02387957 (phase II, terminated) • NCT02591914 (phase I, completed) • NCT01940887 (phase III, terminated) • NCT01940900 (phase III, terminated) • NCT01944839 (phase III, NCT01944839)	AMD	
REG1 anticoagulation system (RB006 plus RB007) / Coagulation factor IXa	PEG-L- GUGGACUAUA CCGCGUAAUG CUGCCUCCAC- idT	RB006 (drug): • 37-nt RNA aptamer • 2'-ribo purine or • 2'- fluoropyrimidi ne RB007 (antidote): • 17-nt • 2'-O-methyl • 40kDaPEG	• NCT00113997 (phase I, completed) • NCT00715455 (phase II, completed) • NCT00932100 (phase II, completed) • NCT01872572 (phase I, completed) • NCT01848106 (phase III, terminated because of severe anaphylactic reactions)	Hội chứng mạch vành cấp tính Đặt ống thông tim (dạng tiêm tĩnh mạch) Bệnh động mạch vành Can thiệp mạch vành qua da	[47]
ARC1779/ A1 domain of von Willebrand factor	5' PEG- GCGUGCAGUG CCUUCGGCCGT GCGGTGCCUCC GUCACGC-3'	• 39-nt DNA • 3'-inverted dT • 2'-O-methyl • 20kDaPEG	• NCT00432770 (phase I, completed) • NCT00507338 (phase II, terminated)	von Willebrand disease Thrombotic thrombocytopenic purpura von Willebrand disease type 2b	[48]

			• NCT00632242 (phase II, completed) • NCT00694785 (phase II, withdrawn) • NCT00742612 (phase II, terminated)	Acute myocardial infarction Percutaneous coronary intervention Thrombosis	
NU172 ARCA/ Thrombin	5'- CGCCTAGGTTG GGTAGGGTGGT GGCG-3'	• 26-nt DNA • Unmodified	• NCT00808964 (phase II, unknown, not verified recently)	Heart disease (for example, used during cardiopulmonary bypass to maintain a steady-state of anticoagulation)	[49]
ARC19499 (BAX499)/ TFPI	5'- PEG- hexylamine- mGmGmAmAmU mAmUmAdCmU mUmGmGdCmUd CmGmUmUmAm GmGmUmGdCm GmUmAmUmAm UmAidT-3	• 32-nt RNA • 2'-O-methyl purine • 3'-inverted dT • 40kDaPEG	• NCT01191372 (phase I, terminated)	Haemophilia	[50]
AS1411 (AGRO001) / Nucleolin	5'- GGTGGTGGTGG TTGTGGTGGTG GTGG -3'	• 26-nt DNA • G-rich DNA • Pegylated	• NCT00512083 (phase II, completed) • NCT00740441 (phase II, unknown) • NCT00881244 (phase I, completed) • NCT01034410 (Phase II, terminated)	Acute myeloid leukemia Metastatic renal cell carcinoma Advanced solid tumor	[36]
NOX-A12 / CXCL12	5'- GCGUGGUGUG AUCUAGAUGU AUUGGCUGAU CCUAGUCAGG UACGC-3'	• 45-nt RNA (Spiegelmer) • L-ribonucleic acid • Pegylated	• NCT00976378 (phase I, completed) • NCT01194934 (phase I, completed) • NCT01521533 (phase II, completed) • NCT01486797 (phase II, ongoing,	Multiple myeloma and non-Hodgkin lymphoma Chronic lymphocytic leukemia Autologous stem cell transplantation Hematopoietic stem cell transplantation	[26]
NOX-E36/ CCL2	5'- GCACGUCCUC ACCGGUGCAA GUGAAGCCGU GGCUCUGCG -3'	• 40-nt RNA (Spiegelmer) • L-ribonucleic acid • Pegylated	• NCT01372124 (phase I, completed) • NCT00976729 (phase I, completed) • NCT01085292 (phase I/II, completed) • NCT01372124 (phase I, completed) • NCT01547897 (phase II, completed)	Chronic inflammatory diseases Type 2 diabetes mellitus Systemic lupus erythematosus Albuminuria Renal impairment	[51]
NOX-H94/ Hepcidin peptide hormone	5'GCGCCGUAU GGGAUUAAGU AAAUGAGGAG UUGGAGGAAG GGCGC 3'	• 44-nt RNA (Spiegelmer) • L-ribonucleic acid • Pegylated	• NCT01372137 (phase I, completed) • NCT01522794 (phase I, completed) • NCT01691040 (phase II, completed) • NCT02079896 (phase I/II, completed)	Anemia End-stage renal disease Anemia of chronic diseases Inflammation	[52]

4. Kết luận

Aptamer có chức năng hoạt động như một kháng thể đơn dòng, có khả năng gắn đặc hiệu và ái lực cao với chỉ dấu bệnh học, do vậy có tiềm năng lớn trong điều trị bệnh. Thêm vào đó, aptamer, cũng như các chuỗi DNA/RNA khác mang nhiều tiềm năng trong điều trị mà chưa khai thác hết. Do vậy, cho đến nay, chỉ có một aptamer đang được dùng để trị bệnh và 13 aptamer đang ở các giai đoạn muộn trong thử nghiệm lâm sàng. Theo phần lớn các báo cáo thì lí do chính là do thiếu đi sự xác định cơ chế, hoạt tính hoạt động và các thông tin dược lý của aptamer. Tuy nhiên, theo đánh giá của cá nhân người viết thì phương pháp chọn lọc aptamer ngoài những hạn chế và bias trọng chọn lọc trình tự đầu vào, thì hiện nay đang tiến hành trên tế bào nuôi cấy trong môi trường phòng thí nghiệm hoặc các đích protein tái tổ hợp đã tách chiết là một vấn đề lớn. Do vậy, sự thiếu tương thích cấu trúc giữ yếu tố đích trong chọn lọc với chỉ dấu sinh học trong cơ thể người là một trong những nguyên nhân khiến hiệu quả việc điều trị bị chậm trễ. Một hướng khắc phục của vấn đề này có thể là chọn việc sàng lọc trên các organ-on-a-chip kết hợp với sử dụng mô hình máy tính để dự đoán và thiết kế thư viện đầu vào hiệu quả hơn. Đồng thời một aptamer tạo ra cần được kết hợp đa ngành để phân tích hoạt tính, phản ứng với cơ thể và có nghiên cứu dài hơi, kết hợp với các công ty dược phẩm để chuyển hóa thành sản phẩm thương mại.

Lời cảm ơn

Để có được kiến thức, đạo đức nghiên cứu, niềm đam mê, lối tư duy và những kĩ thuật cơ bản trong nghiên cứu hiện nay, tôi chân thành cảm ơn những người thầy, người hướng dẫn của tôi, Giáo sư Yoshihiro Ito và Ts. Takanori Uzawa, phòng thí nghiệm kĩ thuật Nano y học, viện RIKEN, Wakoshi, Saitama, Nhật Bản. Thời gian làm việc tại đây là khoảng thời gian đẹp đẽ và quý giá vô cùng với tôi, giúp tôi định hình con đường nghiên cứu của mình. Tôi cũng xin cảm ơn con gái nhỏ của mình, Phan Minh Hạnh, đã đồng hành cùng mẹ trong suốt chặng đường tôi tiếp cận với hướng nghiên cứu này, ăn ngủ nhiều lần trên phòng thí nghiệm để tôi vẫn có thể vừa làm mẹ vừa làm một người nghiên cứu khoa học.

Tài liệu tham khảo

- [1] Ellington, A.D. & Szostak, J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818-22 (1990).
- [2] Robertson, D.L. & Joyce, G.F. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature* **344**, 467-8 (1990).
- [3] Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505-10 (1990).
- [4] Kim, S.H., Thoa, T.T.T. & Gu, M.B. Aptasensors for environmental monitoring of contaminants in water and soil. *Current Opinion in*

Environmental Science & Health **10**, 9-21 (2019).

- [5] Zhou, J. & Rossi, J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov* **16**, 181-202 (2017).
- [6] Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B. SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng* **24**, 381-403 (2007).
- [7] Dunn, M.R., Jimenez, R.M. & Chaput, J.C. Analysis of aptamer discovery and technology. *Nature Reviews Chemistry* **1**, 0076 (2017).
- [8] Taylor, A.I. & Holliger, P. Directed evolution of artificial enzymes (XNAzymes) from diverse repertoires of synthetic genetic polymers. *Nat Protoc* **10**, 1625-42 (2015).
- [9] Kimoto, M., Yamashige, R., Matsunaga, K., Yokoyama, S. & Hirao, I. Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet. *Nat Biotechnol* **31**, 453-7 (2013).
- [10] Zhang, Y., Lai, B.S. & Juhas, M. Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. *Molecules* **24**(2019).
- [11] Pleiko, K. *et al.* Differential binding cell-SELEX method to identify cell-specific aptamers using high-throughput sequencing. *Sci Rep* **9**, 8142 (2019).
- [12] Park, J.W., Tataavarty, R., Kim, D.W., Jung, H.T. & Gu, M.B. Immobilization-free screening of aptamers assisted by graphene oxide. *Chem Commun (Camb)* **48**, 2071-3 (2012).
- [13] Shin, S.R. *et al.* Aptamer-Based Microfluidic Electrochemical Biosensor for Monitoring Cell-Secreted Trace Cardiac Biomarkers. *Anal Chem* **88**, 10019-10027 (2016).
- [14] Wang, D.L. *et al.* Selection of DNA aptamers against epidermal growth factor receptor with high affinity and specificity. *Biochem Biophys Res Commun* **453**, 681-5 (2014).
- [15] Hung, L.Y., Wang, C.H., Hsu, K.F., Chou, C.Y. & Lee, G.B. An on-chip Cell-SELEX process for automatic selection of high-affinity aptamers specific to different histologically classified ovarian cancer cells. *Lab Chip* **14**, 4017-28 (2014).
- [16] Lee, Y.J. *et al.* Periostin-binding DNA aptamer inhibits breast cancer growth and metastasis. *Mol Ther* **21**, 1004-13 (2013).
- [17] Mendonsa, S.D. & Bowser, M.T. In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Anal Chem* **76**, 5387-92 (2004).
- [18] Bompiani, K.M., Monroe, D.M., Church, F.C. & Sullenger, B.A. A high affinity, antidote-controllable prothrombin and thrombin-binding RNA aptamer inhibits thrombin generation and thrombin activity. *J Thromb Haemost* **10**, 870-80 (2012).

- [19] Kim, M.Y. & Jeong, S. In vitro selection of RNA aptamer and specific targeting of ErbB2 in breast cancer cells. *Nucleic Acid Ther* **21**, 173-8 (2011).
- [20] Mi, Z. *et al.* RNA aptamer blockade of osteopontin inhibits growth and metastasis of MDA-MB231 breast cancer cells. *Mol Ther* **17**, 153-61 (2009).
- [21] Jellinek, D., Lynott, C.K., Rifkin, D.B. & Janjić, N. High-affinity RNA ligands to basic fibroblast growth factor inhibit receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11227-31 (1993).
- [22] Zavyalova, E. *et al.* The Evaluation of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Anti-thrombin DNA Aptamer RA-36. *Front Pharmacol* **8**, 922 (2017).
- [23] Sennino, B. *et al.* Sequential loss of tumor vessel pericytes and endothelial cells after inhibition of platelet-derived growth factor B by selective aptamer AX102. *Cancer Res* **67**, 7358-67 (2007).
- [24] Akiyama, H. *et al.* Intraocular injection of an aptamer that binds PDGF-B: a potential treatment for proliferative retinopathies. *J Cell Physiol* **207**, 407-12 (2006).
- [25] Zboralski, D., Hoehlig, K., Eulberg, D., Frömming, A. & Vater, A. Increasing Tumor-Infiltrating T Cells through Inhibition of CXCL12 with NOX-A12 Synergizes with PD-1 Blockade. *Cancer Immunol Res* **5**, 950-956 (2017).
- [26] Hoellenriegel, J. *et al.* The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization. *Blood* **123**, 1032-9 (2014).
- [27] Macdonald, J. *et al.* Bifunctional Aptamer-Doxorubicin Conjugate Crosses the Blood-Brain Barrier and Selectively Delivers Its Payload to EpCAM-Positive Tumor Cells. *Nucleic Acid Ther* **30**, 117-128 (2020).
- [28] Glassman, P.M. *et al.* Targeting drug delivery in the vascular system: Focus on endothelium. *Adv Drug Deliv Rev* (2020).
- [29] Vinorel, S.A. Pegaptanib in the treatment of wet, age-related macular degeneration. *Int J Nanomedicine* **1**, 263-8 (2006).
- [30] Mahlknecht, G. *et al.* Aptamer to ErbB-2/HER2 enhances degradation of the target and inhibits tumorigenic growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 8170-5 (2013).
- [31] Hicke, B.J. *et al.* Tumor targeting by an aptamer. *J Nucl Med* **47**, 668-78 (2006).
- [32] Daniels, D.A., Chen, H., Hicke, B.J., Swiderek, K.M. & Gold, L. A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15416-21 (2003).
- [33] Hicke, B.J. *et al.* Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein. *J Biol Chem* **276**, 48644-54 (2001).
- [34] Talbot, L.J. *et al.* Pharmacokinetic characterization of an RNA aptamer against osteopontin and demonstration of in vivo efficacy in reversing growth of human breast cancer cells. *Surgery* **150**, 224-30 (2011).
- [35] Mongelard, F. & Bouvet, P. AS-1411, a guanosine-rich oligonucleotide aptamer targeting nucleolin for the potential treatment of cancer, including acute myeloid leukemia. *Curr Opin Mol Ther* **12**, 107-14 (2010).
- [36] Bates, P.J., Laber, D.A., Miller, D.M., Thomas, S.D. & Trent, J.O. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp Mol Pathol* **86**, 151-64 (2009).
- [37] Kang, S.A. *et al.* Blocking the adhesion cascade at the premetastatic niche for prevention of breast cancer metastasis. *Mol Ther* **23**, 1044-1054 (2015).
- [38] Mann, A.P. *et al.* Identification of thioaptamer ligand against E-selectin: potential application for inflamed vasculature targeting. *PLoS One* **5**(2010).
- [39] Roccaro, A.M. *et al.* SDF-1 inhibition targets the bone marrow niche for cancer therapy. *Cell Rep* **9**, 118-128 (2014).
- [40] Liu, S.C. *et al.* Blockade of SDF-1 after irradiation inhibits tumor recurrences of autochthonous brain tumors in rats. *Neuro Oncol* **16**, 21-8 (2014).
- [41] McCauley, T.G. *et al.* Pharmacologic and pharmacokinetic assessment of anti-TGFbeta2 aptamers in rabbit plasma and aqueous humor. *Pharm Res* **23**, 303-11 (2006).
- [42] Wlotzka, B. *et al.* In vivo properties of an anti-GnRH Spiegelmer: an example of an oligonucleotide-based therapeutic substance class. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8898-902 (2002).
- [43] Leva, S. *et al.* GnRH binding RNA and DNA Spiegelmers: a novel approach toward GnRH antagonism. *Chem Biol* **9**, 351-9 (2002).
- [44] Jellinek, D., Green, L.S., Bell, C. & Janjić, N. Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands
- [45] Shangguan, D., Tang, Z., Mallikaratchy, P., Xiao, Z. & Tan, W. Optimization and modifications of aptamers selected from live cancer cell lines. *ChemBiochem* **8**, 603-6 (2007).
- [46] Biesecker, G., Dihel, L., Enney, K. & Bendele, R.A. Derivation of RNA aptamer inhibitors of human complement C5. *Immunopharmacology* **42**, 219-30 (1999).
- [47] Rusconi, C.P. *et al.* RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa. *Nature* **419**, 90-4 (2002).
- [48] Diener, J.L. *et al.* Inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet activation and thrombosis by the anti-von Willebrand factor A1-

- domain aptamer ARC1779. *J Thromb Haemost* **7**, 1155-62 (2009).
- [49] Buff, M.C. *et al.* Dependence of aptamer activity on opposed terminal extensions: improvement of inhibiting tissue factor pathway inhibitor. *Blood* **117**, 5514-22 (2011).
- [51] Maasch, C., Buchner, K., Eulberg, D., Vonhoff, S. & Klussmann, S. Physicochemical stability of NOX-E36, a 40mer L-RNA (Spiegelmer) for light-regulation efficiency. *Nucleic Acids Res* **38**, 2111-8 (2010).
- [50] Waters, E.K. *et al.* Aptamer ARC19499 mediates a procoagulant hemostatic effect by therapeutic applications. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 61-2 (2008).
- [52] Schwoebel, F. *et al.* The effects of the anti-hepcidin Spiegelmer NOX-H94 on inflammation-induced anemia in cynomolgus monkeys. *Blood* **121**, 2311-5 (2013).