



(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)



1-0029529

(51)⁷ C07K 7/22; A61K 38/04; A01K 61/00; (13) B
A23K 1/18

(21) 1-2017-00082

(22) 16/07/2015

(86) PCT/IL2015/050739 16/07/2015

(87) WO 2016/009439 A1 21/01/2016

(30) 62/025,618 17/07/2014 US

(45) 25/09/2021 402

(43) 25/08/2017 353A

(73) YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW
UNIVERSITY OF JERUSALEM LTD. (IL)

POB 39135, Hi Tech Park, Edmond J. Safra Campus, Givat Ram, 91390 Jerusalem,
Israel

(72) LEVAVI-SIVAN, Berta (IL); GILON, Chaim (IL).

(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) CHẤT BẮT CHUỖC PEPTIT DỪNG ĐỀ ỨC CHẾ QUÁ TRÌNH SINH SẢN CỦA
CÁ VÀ CHẾ PHẨM CHỨA CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chất đối kháng neurokinin trên cơ sở peptit đề ức chế quá trình sinh sản của cá. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa chất đối kháng neurokinin của cá và phương pháp ức chế hoặc làm chậm lại quá trình thành thực sinh dục lần đầu, quá trình thành thực sinh dục hoặc sinh sản của cá bằng cách sử dụng các chất đối kháng này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực sinh sản của cá. Cụ thể, sáng chế đề cập đến các chất bất chước peptit có hoạt tính như chất đối kháng neurokinin B (NKB) và neurokinin F (NKF) và việc sử dụng chúng để ức chế hoặc làm chậm lại quá trình thành thực hệ sinh sản của cá.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chức năng sinh sản được điều khiển chặt chẽ bởi mạng lưới phức tạp gồm các yếu tố thần kinh trung ương và ngoại biên, trong đó yếu tố quan trọng nhất là GnRH. Gần đây, peptit thần kinh kisspeptin (được mã hóa bởi Kiss1) và neurokinin B (NKB, được mã hóa bởi Tac3) đã được cho là có vai trò quan trọng ở các giai đoạn khác nhau của quá trình sinh sản (Navarro VM. *Front Endocrinol.* 2012; 3:48). Các nghiên cứu ở người đã phát hiện ra rằng các đột biến làm mất chức năng ở các gen mã hóa NKB hoặc thụ thể neurokinin 3 (NK3R) dẫn tới chứng giảm chức năng tuyến sinh dục do giảm chất thúc sinh dục và chứng vô sinh.

Neurokinin B (NKB) là thành viên họ tachykinin của các hợp chất peptit. Các đột biến gây bất hoạt ở gen tachykinin 3 (tac3) hoặc gen thụ thể tac3 (NKBR) liên quan đến chứng suy dậy thì và chứng giảm chức năng tuyến sinh dục do giảm chất thúc sinh dục bẩm sinh ở người. Điều này gợi ý rằng NKB có thể có vai trò quan trọng trong quá trình sinh sản ở người.

NKB có thể có tác động trực tiếp thông qua thụ thể trên tuyến yên và tác động gián tiếp thông qua thụ thể trên các tế bào thần kinh tiết hormon giải phóng chất thúc sinh dục (gonadotropin-releasing-hormone: GnRH). NKB gắn kết với các thụ thể cùng nguồn gốc của chúng, kích thích hoạt tính của các thụ thể này, để tạo ra tín hiệu bắt buộc cho quá trình tiết chất thúc sinh dục – nhờ đó kiểm soát các sự kiện ở phía đầu ra hỗ trợ quá trình sinh sản. NKB là chất điều hòa quan trọng của trục vùng dưới đồi – tuyến yên – tuyến sinh dục và là đích của nhóm các chất điều hòa cho các quá trình, như phản hồi thông tin từ hormon steroid, quá trình điều hòa dinh dưỡng và chuyển

hóa.

Nội cân bằng năng lượng và sinh sản là các quá trình quan trọng nhất trong cuộc sống của động vật và có quan hệ mật thiết với nhau. Sự điều hòa phù hợp cho quá trình nội cân bằng năng lượng và sinh sản có ý nghĩa quan trọng cho sự khỏe mạnh và khả năng tồn tại. Sinh sản là quá trình cần nhiều năng lượng, và sự tương tác chính xác của các chất điều hòa đối với quá trình cân bằng năng lượng và sinh sản cho phép điều hòa kết hợp cả hai quá trình này. Trong hầu hết các loài cá được nghiên cứu, các biến đổi theo mùa về kích thước tuyến sinh dục có tương quan tiêu cực với nồng độ hormon sinh trưởng (growth hormone: GH) trong huyết thanh – ví dụ, khi nồng độ hormon tạo thể vàng (luteinizing hormone: LH) cao do kích thước tuyến sinh dục tăng thì nồng độ GH thấp, kèm theo mức sinh trưởng sinh dưỡng rất thấp.

Loài cá có sự đa dạng lớn về chiến lược sinh sản, có thể được thấy ở các khoảng sinh thái khác nhau và sử dụng các chế độ định thời khác nhau trong thời kỳ thành thực sinh dục. Khi so sánh với các động vật có xương sống khác thì loài cá có một số đặc tính riêng. Trái ngược với động vật bốn chân, trong đó các tế bào tuyến yên có nhiều loại, ở cá chỉ có một cơ quan duy nhất có các yêu cầu đặc hiệu ở một số vùng nhất định. Loài cá thể hiện kiểu lưỡng tính ở khả năng điều hòa thúc sinh dục bằng GnRH, kiểu này kết hợp cả hai thành phần thần kinh - tuyến và thần kinh - mạch. Hơn nữa, các đầu cuối thần kinh khác nhau tiết ra các peptit thần kinh khác nhau và kích thích tuyến yên. Tuy nhiên, vẫn chưa biết được rằng liệu tế bào thần kinh NKB hay NKF có phóng tới tuyến yên của cá hay không.

Cho đến nay, một số lượng lớn các hợp chất tachykinin đã được xác định ở một phạm vi rộng gồm các loài từ động vật không xương sống cho đến động vật có vú. *Tac1* mã hóa cả chất P (substance P: SP) và NKA qua cơ chế ghép nối xen kẽ. *Tac2/Tac3* tạo ra peptit NKB, còn *Tac4* mã hóa hemokinin-1.

Ba nhóm thụ thể tachykinin của động vật có vú (NK1, NK2, và NK3) đã được xác định, và chúng có ái lực gắn kết ưu tiên lần lượt với SP, NKA, và NKB. *TAC1* và *TAC4* của động vật có vú tạo ra 2 peptit thần kinh hoạt động, trong khi *TAC3* là *TAC* duy nhất chỉ tạo ra 1 peptit thần kinh là NKB.

Gen tachykinin (tac) và gen thụ thể tac được xác định gần đây từ nhiều loài cá (Biran 2012, PNAS 109:10269-10274). Phân tích phát sinh giống loài cho thấy rằng

các gen Tac3 của cá và các gen neurokinin của động vật có vú xuất hiện từ cùng một dòng. Đã phát hiện được độ tương đồng cao ở vùng mã hóa NKB trong số các loài cá khác nhau; tất cả đều có trình tự tận cùng C thông thường. Mặc dù gen Tac3 của cá mã hóa hai chất được cho là peptit tachykinin, gen tiến hóa thẳng của động vật có vú mã hóa chỉ một peptit tachykinin mà thôi. Chất được cho là peptit thứ hai của cá, được gọi là neurokinin F (NKF), là chất đặc biệt và được phát hiện là được bảo toàn trong số toàn bộ các loài cá thử nghiệm.

Mức mARN của gen *tac3a* ở cá ngựa vằn tăng dần trong vài tuần đầu tiên của cuộc đời và đạt đỉnh ở thời kỳ chín sinh dục. Ở não của cá ngựa vằn, quan sát được mARN của gen *tac3a* và *tac3b* ở các vùng não đặc hiệu liên quan đến sự sinh sản (Biran et al., 2008, Biol Reprod 79:776-786). Ngoài ra, chỉ một mũi tiêm NKBa hoặc NKF qua đường trong màng bụng cũng làm tăng đáng kể mức LH ở cá ngựa vằn cái trưởng thành, và gen *tac3a* cũng như cả hai gen *tac3r* đều được điều hòa tăng bởi estrogen (Biran et al., 2012, như trên), điều này gợi ý rằng hệ NKB/NKBR có thể tham gia vào quá trình hệ thần kinh-nội tiết kiểm soát sự sinh sản của cá và rằng vai trò của hệ NKB trong quá trình hệ thần kinh-nội tiết kiểm soát sự sinh sản được bảo toàn tiến hóa ở các động vật có xương sống.

Cá rô Phi đã trở thành một trong số các loài cá nuôi nước ngọt có ý nghĩa quan trọng nhất về mặt thương mại, do chúng có khả năng sinh trưởng cao, đời một thế hệ ngắn, dễ đẻ trứng, và khả năng kháng bệnh.

Đã chứng minh được rằng (Biran et al., 2014, Endocrinology 155, 4831-42) các peptit thần kinh được xác định gần đây và gọi tên là Neurokinin B (NKB) và Neurokinin F (NKF), là các chất được tiết ra bởi não cá và liên quan đến quá trình sinh sản, có thể kích thích sự giải phóng yếu tố kích thích bao trứng (follicle stimulating factor: FSH) và LH bằng cơ chế trực tiếp (thông qua sự hoạt hóa các thụ thể đặc hiệu ở cấp độ tuyến yên) hoặc cơ chế gián tiếp (thông qua bộ não).

Với một số tác giả sáng chế thì Công bố đơn quốc tế số WO 2013/018097 bộc lộ chất chủ vận NKB và NKF để điều hòa hormon ở cá và đặc biệt là để thúc đẩy sự bắt đầu trưởng thành sinh dục lần đầu, điều tiết thời gian và lượng rụng trứng và đẻ trứng, đồng bộ hóa hoặc kích thích sự sinh sản, tăng cường sự phát triển giao tử, tăng cường quá trình tạo noãn hoàng, cảm ứng GnRH, cảm ứng Kisspeptin, làm tăng lượng

hormon thần kinh vùng dưới đồi, làm tăng lượng LH hoặc FSH và gây ra sự chín tế bào trứng.

G. Drapeau et al., (Regul. Peptides, 31, 125, 1990) bộc lộ hợp chất SR142801 (Trp⁷, β -Ala⁸-Neurokinin A, 4-10) dùng làm chất đối kháng tiềm năng của thụ thể tachykinin NK3 ở động vật có vú.

O'Harte, F. (J. Neurochem. 57 (6), 2086-2091, 1991) bộc lộ chất tương tự peptit được gọi là Ranakinin, chất chủ vận thụ thể tachykinin NK1 được phân lập bằng neurokinin B từ não của ếch đầm lầy châu Âu (*Rana ridibunda*).

Một vài chất đối kháng NKB phân tử nhỏ, không phải peptit đã được biết ở động vật có vú, ví dụ: SB-222200 (Sarau et al., 2000, J Pharmacol Exp Ther 295:373-381); Osanetant (SR-142,801) và talnetant (SB 223412) (Sarau et al., 1997, J Pharmacol Exp Ther 281:1303-1311).

Trong khi các tài liệu công bố trước đây bộc lộ chất chủ vận NKB của cá để làm gia tăng khả năng thụ thai và rút ngắn thời gian thành thực sinh dục hoặc chất đối kháng NK-3 của động vật có vú, không có tài liệu công bố đã biết nào bộc lộ chất đối kháng NKB ở cá. Nhu cầu dùng các chất đối kháng này để làm chậm lại thời kỳ thành thực sinh dục và kiểm soát các thông số sinh sản ở cá vẫn chưa được đáp ứng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế dựa trên phát hiện rằng sự ức chế hoạt tính thụ thể tac-3 ở cá bằng chất đối kháng NKB có thể làm chậm lại hoặc ức chế sự thành thực sinh dục và sinh sản. Đã bất ngờ phát hiện được rằng sự thay đổi các gốc axit amin đặc hiệu trong trình tự của peptit NKB và NKF dẫn đến sự thay đổi hoạt tính của các chất này từ chất chủ vận thành chất đối kháng đối với quá trình thành thực sinh dục của hệ sinh sản của cá. Sáng chế cũng mô tả phương pháp ức chế quá trình thành thực sinh dục ở cá và phương pháp xử lý các vấn đề hoặc quá trình phụ thuộc hormon ở cá bằng cách cho sử dụng chất đối kháng NKB và NKF cũng như việc sử dụng chất đối kháng NKB và NKF trong chế phẩm dược hoặc chế phẩm thức ăn. Chất đối kháng NKB và NKF trên cơ sở peptit có hoạt tính ngoại biên (ở đây được gọi là chất bất chức peptit) hoặc các chất đối kháng khác, có tác dụng ức chế hoặc chấm dứt sự sinh sản của cá, có thể làm gia tăng tốc độ sinh trưởng và làm thay đổi sự xác định giới tính, ngoài các tác dụng

khác.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chất bắt chước peptit có công thức I:

X_1 -NMeVal- X_4 -Leu-Met-Z (công thức I)

trong đó:

chất bắt chước peptit này bao gồm từ 5 đến 10 axit amin;

X_1 là mạch gồm từ 1 đến 6 gốc axit amin tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên và tùy ý là gốc hoặc biến thể bít đầu ở đầu tận cùng N;

NMeVal là gốc N-metyl-Valin hoặc gốc N-metyl-D-Valin;

X_4 là $-NH(CH_2)_n-CO-$ trong đó n nằm trong khoảng từ 2 đến 6; và

Z là đầu tận cùng C của peptit, đầu tận cùng này có thể được amit hóa, axyl hóa, khử hoặc este hóa. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, X_1 chứa ít nhất một gốc axit amin thơm có cấu hình L hoặc D.

Theo các phương án khác, X_1 chứa gốc D-Trp.

Theo một số phương án, X_1 chứa ít nhất một gốc axit amin (có tính axit) mang điện tích âm.

Theo một số phương án, đầu tận cùng C được amit hóa.

Theo một số phương án, X_1 bao gồm 2 hoặc 3 axit amin và đầu tận cùng N được bít. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, X_1 bao gồm 2 hoặc 3 gốc axit amin là gốc thơm, gốc (axit) mang điện tích âm và gốc bít đầu ở đầu tận cùng N. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, X_1 chứa gốc được chọn từ gốc axit amin béo và gốc phân cực, không mang điện. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, gốc béo được chọn từ nhóm bao gồm: Ala, Ile, Leu. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, gốc phân cực, không mang điện được chọn từ Ser và Thr. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, X_1 chứa gốc thơm được chọn từ nhóm bao gồm Phe, DPhe, Trp và DTrp; gốc (axit) mang điện tích âm được chọn từ Glu và Asp; và gốc bít đầu ở đầu tận cùng N succinyl (Succ). Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của

sáng chế.

Theo các phương án khác nữa, X_1 chứa gốc thơm được chọn từ Phe, và DTrp; gốc Asp; gốc bít đầu ở đầu tận cùng N succinyl (Succ), và tùy ý là gốc được chọn từ Ile và Ser. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, chất bắt chước peptit có công thức II:

X_1 -NMeVal- β Ala-Leu-Met-NH₂ (công thức II)

trong đó, X_1 được chọn từ nhóm bao gồm: Succ-Asp-Phe; Succ-Asp-DPhe; Succ-Asp-Trp; Succ-Asp-DTrp; Succ-Asp-Ile-Phe; Succ-Asp-Ile-DPhe; Succ-Asp-Ile-Trp; Succ-Asp-Ile-DTrp; Succ-Asp-Ser-Phe; Succ-Asp-Ser-DPhe; Succ-Asp-Ser-Trp; Succ-Asp-Ser-DTrp; Succ-Glu-Phe; Succ-Glu-DPhe; Succ-Glu-Trp; Succ-Glu-DTrp; Succ-Glu-Ile-Phe; Succ-Glu-Ile-DPhe; Succ-Glu-Ile-Trp; Succ-Glu-Ile-DTrp; Succ-Glu-Ser-Phe; Succ-Glu-Ser-DPhe; Succ-Glu-Ser-Trp; và Succ-Glu-Ser-DTrp. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chất bắt chước peptit bao gồm từ 5 đến 10 gốc axit amin chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7:

NMeVal- β Ala-Leu-Met (SEQ ID NO: 7).

Theo một số phương án, chất bắt chước peptit chứa trình tự SEQ ID NO: 7, ít nhất một gốc axit amin thơm và ít nhất một gốc axit amin mang điện tích âm.

Theo một số phương án, chất bắt chước peptit chứa trình tự SEQ ID NO: 7, ít nhất một gốc axit amin thơm, ít nhất một gốc axit amin mang điện tích âm và ít nhất một gốc được chọn từ gốc axit amin béo và gốc phân cực, không mang điện. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, chất bắt chước peptit chứa đầu tận cùng N được bít.

Theo một số phương án, chất bắt chước peptit chứa đầu tận cùng C được amit hóa.

Theo một số phương án, chất bắt chước peptit bao gồm 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 gốc axit amin và nhóm bít đầu ở đầu tận cùng N tùy ý. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, chất bắt chước peptit bao gồm từ 5 đến 10 gốc axit amin, đầu tận cùng C được amit hóa và gốc bít đầu ở đầu tận cùng N. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, chất bắt chước peptit bao gồm từ 6 đến 7 gốc axit amin chứa trình tự SEQ ID NO: 7, và trình tự được chọn từ nhóm bao gồm: Succ-Asp-Phe; Succ-Asp-DPhe; Succ-Asp-Trp; Succ-Asp-DTrp; Succ-Asp-Ile-Phe; Succ-Asp-Ile-DPhe; Succ-Asp-Ile-Trp; Succ-Asp-Ile-DTrp; Succ-Asp-Ser-Phe; Succ-Asp-Ser-DPhe; Succ-Asp-Ser-Trp; Succ-Asp-Ser-DTrp; Succ-Glu-Phe; Succ-Glu-DPhe; Succ-Glu-Trp; Succ-Glu-DTrp; Succ-Glu-Ile-Phe; Succ-Glu-Ile-DPhe; Succ-Glu-Ile-Trp; Succ-Glu-Ile-DTrp; Succ-Glu-Ser-Phe; Succ-Glu-Ser-DPhe; Succ-Glu-Ser-Trp; và Succ-Glu-Ser-DTrp.

Theo một số phương án, ít nhất một gốc bít đầu ở đầu tận cùng N là gốc axit dicarboxylic. Theo một số phương án, ít nhất một gốc bít đầu ở đầu tận cùng N được chọn từ nhóm bao gồm: succinyl, oxalyl, malonyl, glutaryl, adipoyl, pimeloyl, suberoyl, và acetyl. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án cụ thể, chất bắt chước peptit được chọn từ nhóm bao gồm:

Succ-Asp-Ile-Phe-N(Me)Val-βAla-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 1, Ant-1);
 Succ-Asp-Phe-N(Me)Val-βAla-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 2, Ant-2);
 Succ-Asp-Ser-Phe-N(Me)Val-βAla-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 3, Ant-3);
 Succ-Asp-Ile-D-Trp-N(Me)Val-βAla-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 4, Ant-4);
 Succ-Asp-D-Trp-N(Me)Val-βAla-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 5, Ant-5); và
 Succ-Asp-Ser-D-Trp-N(Me)Val-βAla-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 6, Ant-6);
 trong đó Succ là succinyl.

Cần hiểu rõ rằng các peptit đã biết trước đây bị loại trừ khỏi phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Theo một số phương án, chất bắt chước peptit còn chứa gốc làm tăng tính thấm. Gốc bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này là tạo điều kiện thuận lợi theo cách chủ động hoặc thụ động hoặc làm tăng tính thấm của hợp chất vào tế bào thì đều có thể được sử dụng trong chất bắt chước peptit theo sáng chế. Gốc làm tăng tính thấm có thể được nối với vị trí bất kỳ trong gốc peptit theo cách trực tiếp hoặc thông qua nhóm đệm hoặc nhóm liên kết.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa chất bắt chước peptit có công thức I.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit có công thức I được chọn từ chế phẩm được và chế phẩm thức ăn.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit có công thức I, trong đó X_1 chứa ít nhất một gốc axit amin thơm có cấu hình L hoặc D.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit có công thức I, trong đó X_1 chứa gốc D-Trp.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit có công thức I, trong đó X_1 chứa ít nhất một gốc axit amin (có tính axit) mang điện tích âm.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit có công thức I, trong đó đầu tận cùng C được amit hóa.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit có công thức I, trong đó X_1 bao gồm 2 hoặc 3 axit amin và đầu tận cùng N được bịt. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit có công thức I, trong đó X_1 bao gồm 2 hoặc 3 gốc axit amin là gốc thơm, gốc (axit) mang điện tích âm, đầu tận cùng C được amit hóa và gốc bịt đầu ở đầu tận cùng N. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit có công thức I, trong đó X_1 chứa gốc được chọn từ gốc axit amin béo và gốc phân cực, không mang điện. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit có công thức I, trong đó gốc béo được chọn từ nhóm bao gồm: Ala, Ile, và Leu. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit có công thức I, trong đó gốc phân cực, không mang điện được chọn từ Ser và Thr. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit có công thức I, trong đó X_1 chứa gốc thơm được chọn từ nhóm bao gồm Phe, DPhe, Trp và DTrp; gốc (axit) mang điện tích âm được chọn từ Glu và Asp; và gốc bịt đầu ở đầu tận cùng N succinyl (Succ). Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit có công thức I,

trong đó X_1 chứa gốc thơm được chọn từ Phe, và DTrp; gốc Asp; gốc bít đầu ở đầu tận cùng N succinyl (Succ), và tùy ý là gốc được chọn từ Ile và Ser. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit có công thức II:

X_1 -NMeVal- β Ala-Leu-Met-NH₂ (Công thức II);

trong đó, X_1 được chọn từ nhóm bao gồm: Succ-Asp-Phe; Succ-Asp-DPhe; Succ-Asp-Trp; Succ-Asp-DTrp; Succ-Asp-Ile-Phe; Succ-Asp-Ile-DPhe; Succ-Asp-Ile-Trp; Succ-Asp-Ile-DTrp; Succ-Asp-Ser-Phe; Succ-Asp-Ser-DPhe; Succ-Asp-Ser-Trp; Succ-Asp-Ser-DTrp; Succ-Glu-Phe; Succ-Glu-DPhe; Succ-Glu-Trp; Succ-Glu-DTrp; Succ-Glu-Ile-Phe; Succ-Glu-Ile-DPhe; Succ-Glu-Ile-Trp; Succ-Glu-Ile-DTrp; Succ-Glu-Ser-Phe; Succ-Glu-Ser-DPhe; Succ-Glu-Ser-Trp; và Succ-Glu-Ser-DTrp. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit bao gồm từ 5 đến 10 gốc axit amin chứa trình tự NMeVal- β Ala-Leu-Met (SEQ ID NO: 7).

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit có trình tự SEQ ID NO: 7, ít nhất một gốc axit amin thơm và ít nhất một gốc axit amin mang điện tích âm.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit có trình tự SEQ ID NO: 7, ít nhất một gốc axit amin thơm, ít nhất một gốc axit amin mang điện tích âm và ít nhất một gốc được chọn từ gốc axit amin béo và gốc phân cực, không mang điện. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit có đầu tận cùng N được bít.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit có đầu tận cùng C được amit hóa.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit bao gồm 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 gốc axit amin và nhóm bít đầu ở đầu tận cùng N tùy ý. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit bao gồm từ 5 đến 10 gốc axit amin, đầu tận cùng C được amit hóa và gốc bít đầu ở đầu tận cùng N. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit bao gồm 6 đến 7 gốc axit amin chứa trình tự SEQ ID NO: 7, và trình tự được chọn từ nhóm bao gồm: Succ-Asp-Phe; Succ-Asp-DPhe; Succ-Asp-Trp; Succ-Asp-DTrp; Succ-Asp-Ile-Phe; Succ-Asp-Ile-DPhe; Succ-Asp-Ile-Trp; Succ-Asp-Ile-DTrp; Succ-Asp-Ser-Phe; Succ-Asp-Ser-DPhe; Succ-Asp-Ser-Trp; Succ-Asp-Ser-DTrp; Succ-Glu-Phe; Succ-Glu-DPhe; Succ-Glu-Trp; Succ-Glu-DTrp; Succ-Glu-Ile-Phe; Succ-Glu-Ile-DPhe; Succ-Glu-Ile-Trp; Succ-Glu-Ile-DTrp; Succ-Glu-Ser-Phe; Succ-Glu-Ser-DPhe; Succ-Glu-Ser-Trp; và Succ-Glu-Ser-DTrp.

Theo một số phương án, ít nhất một gốc bít đầu ở đầu tận cùng N được chọn từ nhóm bao gồm: succinyl, oxalyl, malonyl, glutaryl, adipoyl, pivaloyl, suberoyl, acetyl, và các gốc axit dicarboxylic khác. Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án cụ thể, chế phẩm chứa chất bắt chước peptit được chọn từ nhóm bao gồm:

Succ-Asp-Ile-Phe-N(Me)Val-βAla-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 1, Ant-1);

Succ-Asp-Phe-N(Me)Val-βAla-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 2, Ant-2);

Succ-Asp-Ser-Phe-N(Me)Val-βAla-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 3, Ant-3);

Succ-Asp-Ile-D-Trp-N(Me)Val-βAla-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 4, Ant-4);

Succ-Asp-D-Trp-N(Me)Val-βAla-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 5, Ant-5); và

Succ-Asp-Ser- D-Trp -N(Me)Val-βAla-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 6, Ant-6);

trong đó Succ là succinyl.

Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Chế phẩm được theo sáng chế chứa chất bắt chước peptit dùng làm chất đối kháng NKB hoặc NKF như được xác định trên đây và chất mang, chất pha loãng, muối hoặc tá dược được dụng tùy ý.

Chế phẩm thức ăn theo sáng chế chứa chất bắt chước peptit dùng làm chất đối kháng NKB như được xác định trên đây và chất phụ gia thức ăn tùy ý. Chất phụ gia thức ăn bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng trong chế phẩm thức ăn theo sáng chế. Chất này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất phụ gia tạo màu, chất phụ gia tạo vị v.v.. Chất dinh dưỡng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein, hydrat cacbon, chất béo, chất khoáng, vitamin v.v., cũng có thể được đưa vào

chế phẩm thức ăn theo sáng chế. Chế phẩm thức ăn theo sáng chế có thể chứa chất dinh dưỡng và chất phụ gia thức ăn, ngoài ít nhất một chất đối kháng NKB hoặc NKF hoạt tính.

Theo một số phương án, chế phẩm thức ăn chứa viên thức ăn được bao bằng ít nhất một chất đối kháng NKB hoặc NKF.

Chế phẩm được hoặc chế phẩm thức ăn như được xác định trên đây dùng làm chất đối kháng NKB cũng thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Chế phẩm chứa chất bất chước peptit theo sáng chế có thể được sử dụng cho cá theo cách hoặc đường dùng bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này bao gồm sử dụng ngoài đường tiêu hóa và sử dụng qua đường ruột. Theo một số phương án, việc sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kiểu tiêm bất kỳ. Theo một số phương án, sử dụng qua đường ruột bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sử dụng qua đường miệng, bao gồm sử dụng dưới dạng chất bổ sung cho thức ăn, sử dụng bằng cách ngâm, bao gồm sử dụng dưới dạng chất bổ sung cho nước uống, và sử dụng trong dạ dày qua ống thông.

Theo một số phương án, chế phẩm được sử dụng cho cá dưới dạng một phần thức ăn hoặc nước sử dụng thông thường.

Theo một số phương án, chế phẩm được sử dụng cho cá trong thể tích nước được hút bởi mang cá.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng đề xuất chế phẩm chứa chất đối kháng NKB dùng để ức chế ít nhất một thông số của quá trình sinh sản hoặc thành thực sinh dục của cá.

Chất đối kháng NKB theo sáng chế là hợp chất có khả năng gắn kết với thụ thể tachykinin 3 (tac3) của cá và ức chế hoạt tính của thụ thể này. Chất đối kháng NKF cũng được bao gồm trong phần định nghĩa của chất đối kháng NKB.

Theo một số phương án, chế phẩm dùng để ức chế ít nhất một thông số của quá trình sinh sản hoặc thành thực sinh dục của cá chứa chất bất chước peptit được chọn từ nhóm bao gồm: chất bất chước peptit có công thức I, như được xác định trên đây; chất bất chước peptit có công thức II, như được xác định trên đây; và chất bất chước peptit bao gồm từ 5 đến 10 gốc axit amin chứa trình tự SEQ ID NO: 7.

Theo một số phương án, chế phẩm dùng để ức chế ít nhất một thông số của quá

trình sinh sản hoặc thành thực sinh dục của cá chứa chất bắt chước peptit được chọn từ nhóm bao gồm:

Succ-Asp-Ile-Phe-N(Me)Val- β Ala-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 1, Ant-1);

Succ-Asp-Phe-N(Me)Val- β Ala-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 2, Ant-2);

Succ-Asp-Ser-Phe-N(Me)Val- β Ala-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 3, Ant-3);

Succ-Asp-Ile-D-Trp-N(Me)Val- β Ala-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 4, Ant-4);

Succ-Asp-D-Trp-N(Me)Val- β Ala-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 5, Ant-5); và

Succ-Asp-Ser-D-Trp-N(Me)Val- β Ala-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 6, Ant-6);

trong đó Succ là succinyl.

Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo các phương án khác, chế phẩm dùng để ức chế ít nhất một thông số của quá trình sinh sản hoặc thành thực sinh dục của cá chứa chất đối kháng NKB không phải peptit.

Theo một số phương án cụ thể, chế phẩm dùng để ức chế ít nhất một thông số của quá trình sinh sản hoặc thành thực sinh dục của cá chứa chất đối kháng NKB không phải peptit được chọn từ nhóm bao gồm: (S)-(2)-N-(α -ethylbenzyl)-3-methyl-2-phenylquinolin-4-carboxamit (còn được gọi là SB-222200); (S)-(1)-N-{{3-[1-benzoyl-3-(3,4-dichlorophenyl)piperidin-3-yl]prop-1-yl}-4-phenylpiperidin-4-yl}-N-methylacetamit (còn được gọi là Osanetant và SR-142,801), và (S)-(2)-N-(α -ethylbenzyl)-3-hydroxy-2-phenylquinolin-4-carboxamit (còn được gọi là talnetant và SB 223412). Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế ít nhất một thông số của quá trình sinh sản hoặc thành thực sinh dục của cá, phương pháp này bao gồm bước cho cá sử dụng chế phẩm chứa chất đối kháng NKB.

Theo một số phương án, chế phẩm được chọn từ nhóm bao gồm chế phẩm được và chế phẩm thức ăn.

Hợp chất đối kháng NKB bất kỳ có khả năng gắn kết với thụ thể tac3 của cá và ức chế hoạt tính của thụ thể này đều có thể được sử dụng theo khía cạnh này.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm bước cho cá sử dụng chế phẩm chứa chất bắt chước peptit được chọn từ nhóm bao gồm: chất bắt chước peptit có công thức I như được xác định trên đây; chất bắt chước peptit có công thức II như được xác

định trên đây; và chất bất chước peptit bao gồm từ 5 đến 10 gốc axit amin chứa trình tự SEQ ID NO: 7.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa chất bất chước peptit được chọn từ nhóm bao gồm:

Succ-Asp-Ile-Phe-N(Me)Val-βAla-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 1, Ant-1);

Succ-Asp-Phe-N(Me)Val-βAla-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 2, Ant-2);

Succ-Asp-Ser-Phe-N(Me)Val-βAla-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 3, Ant-3);

Succ-Asp-Ile-D-Trp-N(Me)Val-βAla-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 4, Ant-4);

Succ-Asp-D-Trp-N(Me)Val-βAla-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 5, Ant-5); và

Succ-Asp-Ser-D-Trp-N(Me)Val-βAla-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 6, Ant-6);

trong đó Succ là succinyl.

Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo các phương án khác, chế phẩm chứa chất đối kháng NKB không phải peptit.

Theo một số phương án cụ thể, chế phẩm chứa chất đối kháng NKB không phải peptit được chọn từ nhóm bao gồm: (S)-(2)-N-(a-etylbenzyl)-3-metyl-2-phenylquinolin-4-carboxamit (còn được gọi là SB-222200); (S)-(1)-N-{{3-[1-benzoyl-3-(3,4-diclophenyl)piperidin-3-yl]prop-1-yl}-4-phenylpiperidin-4-yl}-N-metylaxetamit (còn được gọi là Osanetant và SR-142,801), và (S)-(2)-N-(a-etylbenzyl)-3-hydroxy-2-phenylquinolin-4-carboxamit (còn được gọi là talnetant và SB 223412). Mỗi khả năng là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Chế phẩm được theo sáng chế được sử dụng trong phương pháp ức chế ít nhất một thông số của quá trình sinh sản hoặc thành thực sinh dục của cá, chứa chất đối kháng NKB và chất mang, chất pha loãng, muối hoặc tá dược được dùng tùy ý.

Chế phẩm thức ăn theo sáng chế được sử dụng trong phương pháp ức chế ít nhất một thông số của quá trình sinh sản hoặc thành thực sinh dục của cá, chứa chất đối kháng NKB và chất phụ gia thức ăn tùy ý. Chế phẩm thức ăn theo sáng chế cũng có thể chứa chất dinh dưỡng và chất phụ gia thức ăn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein, hydrat cacbon, chất béo, chất khoáng, vitamin v.v., cũng có thể được đưa vào chế phẩm thức ăn theo sáng chế.

Sự ức chế ít nhất một thông số của quá trình sinh sản hoặc thành thực sinh dục

của cá bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: làm chậm lại hoặc chấm dứt sự trưởng thành sinh dục lần đầu nói chung hoặc sự sớm trưởng thành sinh dục lần đầu nói riêng; điều hòa sự xác định và biệt hóa (quá trình phát triển tuyến sinh dục sau khi giới tính đã được xác định) giới tính và sinh sản (giải phóng trứng và tinh dịch). Phạm vi của sáng chế còn bao gồm phương pháp xử lý các vấn đề hoặc quá trình phụ thuộc hormon ở cá có liên quan đến quá trình sinh sản.

Theo một số phương án, sự ức chế quá trình sinh sản hoặc thành thực sinh dục của cá làm tăng trọng lượng của cá được xử lý.

Cá theo sáng chế bao gồm loại cá bất kỳ từ lớp, phân lớp, bộ, họ hoặc chi bất kỳ bao gồm cá nuôi, cá ăn được và cá cảnh. Theo một số phương án không làm giới hạn sáng chế, cá được chọn từ nhóm bao gồm: cá rô Phi, cá chép, cá hồi, cá vược, cá trê và cá đối.

Việc sử dụng chất đối kháng NKB cho cá theo phương pháp của sáng chế có thể được thực hiện theo cách bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sử dụng ngoài đường tiêu hóa, sử dụng qua đường miệng và sử dụng bằng cách ngâm.

Theo một số phương án, chất đối kháng NKB được sử dụng cho cá ở dạng một phần thức ăn hoặc nước sử dụng.

Theo một số phương án, chế phẩm được sử dụng cho cá trong thể tích nước được hút bởi mang cá.

Các phương án khác nữa và toàn bộ phạm vi ứng dụng sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ phần mô tả chi tiết sáng chế được trình bày sau đây. Tuy nhiên, cần hiểu rằng phần mô tả chi tiết sáng chế và các ví dụ cụ thể, trong khi thể hiện các phương án ưu tiên của sáng chế, được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa, do các thay đổi và cải biến khác thuộc phạm vi của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực khi xem phần mô tả chi tiết sáng chế này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A và Fig.1B thể hiện tác dụng của sáu chất bắt chước peptit trong việc ức chế quá trình truyền tín hiệu (Fig.1A thể hiện quá trình hoạt hóa CRE, Fig.1B thể hiện quá trình hoạt hóa SRE) ở cá rô Phi. Mỗi chất đối kháng được thêm vào ở nồng độ khác

nhau đồng thời với NKB ở nồng độ $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ ($=0,1 \text{ nM}$). NKB của cá rô Phi làm tăng hoạt tính luxiferaza lên 1,8 lần và sự giảm mức độ đáp ứng của các polypeptit khác nhau được thể hiện. Fig.1C thể hiện kết quả so sánh hoạt tính chủ vận của các chất tương tự NKB và NKF khác nhau trong mô hình hoạt hóa CRE.

Fig.2A và Fig.2B thể hiện tác dụng của sáu chất bắt chước peptit trong việc ức chế quá trình truyền tín hiệu ở cá ngựa vằn (Fig.2A thể hiện quá trình hoạt hóa CRE, Fig.2B thể hiện quá trình hoạt hóa SRE). NKB của cá ngựa vằn làm tăng hoạt tính truyền tín hiệu lên hơn 3 lần. Tác dụng của chất bắt chước peptit được thử nghiệm khi mỗi chất đối kháng được thêm vào ở nồng độ khác nhau đồng thời với NKB ở nồng độ $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ ($=0,1 \text{ nM}$).

Fig.3A và Fig.3B thể hiện tác dụng của chất đối kháng NKB SB222200 đối với CRE-Luc ở tế bào COS-7 được chuyển nhiễm bằng tac3r của cá rô Phi, bằng cách sử dụng thụ thể và phối tử của người làm đối chứng dương. Fig.3A thể hiện tác dụng đối với hoạt tính luxiferaza của riêng chất đối kháng không phải peptit so với NKB của người (hNKB), NKB của cá rô Phi hoặc NKF của cá rô Phi. Fig.3B thể hiện tác dụng đối với hoạt tính luxiferaza của các nồng độ khác nhau của chất đối kháng được thêm vào đồng thời với phối tử tự nhiên (NKB hoặc NKF) ở nồng độ $0,1 \text{ nM}$.

Fig.4A và Fig.4B thể hiện tác dụng của chất đối kháng NKB Osanetant (SR-142,801) đối với CRE-Luc ở tế bào COS-7 được chuyển nhiễm bằng tac3r của cá rô Phi khi thụ thể và phối tử của người được sử dụng làm đối chứng dương. Fig.4A thể hiện tác dụng của riêng chất đối kháng không phải peptit đối với hoạt tính luxiferaza so với hNKB, NKB của cá rô Phi hoặc NKF của cá rô Phi ở nồng độ $0,1 \text{ nM}$ (10^{-8} M). Fig.4B thể hiện tác dụng của các nồng độ khác nhau của chất đối kháng được thêm vào đồng thời với phối tử tự nhiên (NKB hoặc NKF) ở nồng độ $0,1 \text{ nM}$.

Fig.5A và Fig.5B thể hiện kết quả thử nghiệm hoạt tính đối kháng NKB của SB222200 *in vivo* (với lượng 10, 100 hoặc $500 \mu\text{g/kg}$ thể trọng) đối với sự giải phóng FSH (Fig.5A) và LH (Fig.5B) ở cá rô Phi.

Fig.6 thể hiện kết quả quan sát mô học của các tuyến sinh dục từ tinh hoàn của cá được xử lý so với cá đối chứng. Tinh hoàn cá có cấu tạo dạng nang.

Fig.7 thể hiện thể tích tinh dịch cá được tiêm chất đối kháng NKB SB222200, chất đối kháng NKB Ant-4, hoặc đối chứng.

Fig.8 thể hiện các mức 11-ketotestosteron (11KT) ở cá được tiêm SB222200 hoặc chất đối kháng NKB Ant-4 trong 14 ngày.

Fig.9 thể hiện tốc độ sinh trưởng của cá rô Phi được trưởng thành đáp ứng với việc tiêm SB222200, hoặc chất đối kháng NKB Ant-6 (500 µg/kg thể trọng mỗi 48 giờ trong 2 tuần, n = 25 con cá mỗi nhóm).

Fig.10 thể hiện chỉ số thành thực sinh dục (Gonado-somatic-index: GSI) của cá được tiêm SB222200 hoặc chất đối kháng NKB Ant-6.

Fig.11 thể hiện mức độ biểu hiện kháng nguyên trong nhân tế bào tăng sinh (proliferating cell nuclear antigen: PCNA) ở tinh hoàn của cá được tiêm vào ngày 27.

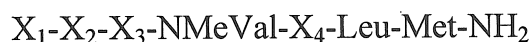
Fig.12A và Fig.12B thể hiện mức độ sinh trưởng đáp ứng với việc nuôi cá con bằng chất đối kháng. Fig.12A thể hiện tốc độ sinh trưởng của cá (g) khi sử dụng và không sử dụng chất đối kháng. Fig.12B là các hình ảnh đại diện của cá được đề cập trên Fig.12A. Ba con cá bên trái là cá đối chứng, và ba con cá bên phải là cá được nuôi bằng chất đối kháng Ant-6.

Fig.13 thể hiện tác dụng của chất đối kháng NKB số 4 và số 6, đối với CRE-Luc trong tế bào COS-7 được chuyển nhiễm bằng gen tac3r của cá hồi.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất chất ức chế sự sinh sản của cá và phương pháp kiểm soát quá trình thành thực sinh dục và sinh trưởng của chúng. Sáng chế dựa trên sự ức chế hoạt tính của thụ thể tachykinin 3 (thụ thể tac-3) bằng chất đối kháng dựa trên cơ sở peptit hoặc chất đối kháng phân tử nhỏ của phối tử tac-3 NKB và NKf.

Theo một số phương án của sáng chế, chất đối kháng NKB là hợp chất trên cơ sở peptit (chất bắt chước peptit) có công thức sau đây:



trong đó

X_1 là axit amin hoặc chất bắt chước axit amin không có trong tự nhiên bất kỳ hoặc bằng không (không có axit amin);

X_2 là axit amin hoặc chất bắt chước axit amin không có trong tự nhiên bất kỳ hoặc bằng không (không có axit amin);

X_3 là axit amin bất kỳ, tốt hơn nếu là axit amin thơm có cấu hình D, tốt nhất nếu

là D-Trp hoặc bằng không (không có axit amin);

X_4 là nhóm đệm có công thức $-\text{NH}(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$ trong đó n nằm trong khoảng từ 2 đến 6, hoặc nhóm đệm có công thức $-(\text{Pro})_n-$ trong đó n nằm trong khoảng từ 1 đến 6.

Sáng chế đề xuất chất bắt chước peptit bao gồm từ 5 đến 10 axit amin và gốc bít đầu ở đầu tận cùng N tùy ý, trong đó chất bắt chước peptit này được chọn từ nhóm bao gồm:

- i. hợp chất có công thức I: $X_1\text{-NMeVal-}X_4\text{-Leu-Met-Z}$, trong đó X_1 là mạch gồm từ 1 đến 6 gốc axit amin tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên; NMeVal là gốc N-metyl-Valin hoặc gốc N-metyl-D-Valin; X_4 là $-\text{NH}(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$ trong đó n nằm trong khoảng từ 2 đến 6; và Z là đầu tận cùng C của peptit có thể được amit hóa, axyl hóa, khử hoặc este hóa;
- ii. hợp chất có công thức II: $X_1\text{-NMeVal-}X_4\text{-Leu-Met-NH}_2$, trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm: Succ-Asp-Phe; Succ-Asp-DPhe; Succ-Asp-Trp; Succ-Asp-DTrp; Succ-Asp-Ile-Phe; Succ-Asp-Ile-DPhe; Succ-Asp-Ile-Trp; Succ-Asp-Ile-DTrp; Succ-Asp-Ser-Phe; Succ-Asp-Ser-DPhe; Succ-Asp-Ser-Trp; Succ-Asp-Ser-DTrp; Succ-Glu-Phe; Succ-Glu-DPhe; Succ-Glu-Trp; Succ-Glu-DTrp; Succ-Glu-Ile-Phe; Succ-Glu-Ile-DPhe; Succ-Glu-Ile-Trp; Succ-Glu-Ile-DTrp; Succ-Glu-Ser-Phe; Succ-Glu-Ser-DPhe; Succ-Glu-Ser-Trp; và Succ-Glu-Ser-DTrp; và X_4 là βAla ; và
- iii. hợp chất chứa trình tự NMeVal- βAla -Leu-Met (SEQ ID NO: 7).

Chế phẩm chứa chất bắt chước peptit theo sáng chế và phương pháp sử dụng chúng cũng được đề xuất.

Theo một số phương án cụ thể, chế phẩm theo sáng chế chứa hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm hợp chất từ Ant-1 đến Ant-6 làm thành phần hoạt tính:

Succ-Asp-Ile-Phe-N(Me)Val- βAla -Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 1, Ant-1);

Succ-Asp-Phe-N(Me)Val- βAla -Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 2, Ant-2);

Succ-Asp-Ser-Phe-N(Me)Val- βAla -Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 3, Ant-3);

Succ-Asp-Ile-D-Trp-N(Me)Val- βAla -Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 4, Ant-4);

Succ-Asp-D-Trp-N(Me)Val- βAla -Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 5, Ant-5); và

Succ-Asp-Ser-D-Trp-N(Me)Val- βAla -Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 6, Ant-6).

Tốt hơn, nếu peptit theo sáng chế được tổng hợp bằng cách sử dụng các kỹ thuật tổng hợp thông thường đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng kỹ thuật tổng hợp hóa học bao gồm phương pháp sử dụng chất bất chước peptit. Các phương pháp này bao gồm phương pháp tổng hợp pha rắn chọn lọc, phương pháp tổng hợp pha rắn riêng phần, phương pháp ngưng tụ phân đoạn, phương pháp tổng hợp dung dịch cổ điển. Phương pháp tổng hợp peptit pha rắn đã được biết rõ trong lĩnh vực. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tổng hợp peptit bất kỳ theo sáng chế bằng cách sử dụng thiết bị tổng hợp peptit tự động sử dụng kỹ thuật hóa học tiêu chuẩn, ví dụ như kỹ thuật hóa học t-Boc hoặc Fmoc. Peptit tổng hợp có thể được tinh chế bằng cách sắc ký lỏng điều chế có tính năng cao, và chế phẩm của chúng có thể được khẳng định bằng cách giải trình tự axit amin. Việc liên hợp các gốc peptit và gốc có tính thấm có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, như phương pháp hóa học pha rắn hoặc pha dung dịch. Một số hợp chất được ưu tiên theo sáng chế có thể được điều chế theo cách thuận tiện bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp pha dung dịch. Các phương pháp đã biết khác trong lĩnh vực này để điều chế các hợp chất giống như hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng và được bao gồm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Việc bịt đầu hoặc cải biến ở đầu tận cùng N theo sáng chế để chỉ việc biến đổi trình tự peptit bằng cách liên kết cộng hóa trị gốc hóa học vào amin ở đầu tận cùng dẫn đến sự thay đổi điện tích, hoạt tính và/hoặc độ bền đối với quá trình phân cắt bằng amino peptidaza.

Các ví dụ không làm giới hạn về gốc làm tăng tính thấm bao gồm: gốc kỵ nước như axit béo, steroid và hợp chất thơm hoặc hợp chất béo có kích thước lớn; gốc có thể có thụ thể màng tế bào hoặc chất mang, như steroid, vitamin và đường, axit amin tự nhiên và không có trong tự nhiên và peptit vận chuyển. Theo một số phương án, gốc kỵ nước là gốc lipit hoặc gốc axit amin.

Gốc làm tăng tính thấm có thể được nối với vị trí bất kỳ trong gốc peptit theo cách trực tiếp hoặc thông qua nhóm đệm. Theo các phương án cụ thể, gốc có tính thấm tế bào được nối với đầu tận cùng có nhóm amin của gốc peptit. Nhóm đệm liên kết tùy ý có thể có chiều dài thay đổi và cấu hình bao gồm dạng hóa học thích hợp bất kỳ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, liên kết amin, amit, carbamat, thioete, oxyete,

sulfonamit và dạng tương tự. Các ví dụ không làm giới hạn cho các nhóm đệm này bao gồm axit amin, dẫn xuất sulfon amit, dẫn xuất amino thiol và dẫn xuất amino rượu.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “peptit” hoặc “trên cơ sở peptit” để chỉ các gốc axit amin tự nhiên (được mã hóa di truyền), không có trong tự nhiên và/hoặc được biến đổi hóa học, mỗi gốc được đặc trưng bởi việc có đầu tận cùng có nhóm amin và nhóm carboxy, được nối với nhau bằng liên kết peptit hoặc không phải peptit. Các gốc axit amin được thể hiện trong toàn bộ bản mô tả và phần yêu cầu bảo hộ bằng mã có một hoặc ba chữ cái, như đã biết rõ trong lĩnh vực này. Tốt hơn nếu peptit và chất bắt chước peptit theo sáng chế được sử dụng ở dạng mạch thẳng, mặc dù sẽ được hiểu rằng trong trường hợp mà trong đó sự tạo vòng không ảnh hưởng bất lợi đến các đặc tính peptit, dạng vòng của peptit cũng có thể được sử dụng.

Các axit amin được sử dụng trong sáng chế là axit amin có bán trên thị trường hoặc có thể thu được bằng các phương pháp tổng hợp thông thường. Một số gốc nhất định có thể cần các phương pháp đặc biệt để kết hợp vào peptit, và các phương pháp tổng hợp liên tục, phân kỳ hoặc hội tụ để tổng hợp trình tự peptit đều có thể được sử dụng trong sáng chế này. Các axit amin tự nhiên được mã hóa và các dẫn xuất của chúng được thể hiện bởi mã có ba chữ cái theo quy tắc IUPAC. Khi không có chỉ dẫn nào, chất đồng phân L hoặc D có thể được sử dụng. Khi có chữ cái “D”- đứng trước tên axit amin, thì chất đồng phân D được sử dụng.

Phương pháp thay thế axit amin bảo toàn là đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế. Phương pháp thay thế axit amin bảo toàn bao gồm việc thay thế một axit amin bằng axit amin khác có nhóm chức hoặc mạch bên cùng loại, ví dụ, nhóm béo, nhóm thơm, nhóm có điện tích dương, nhóm có điện tích âm. Các phương pháp thay thế này có thể làm tăng độ sinh khả dụng qua đường miệng, mức độ ái lực với protein đích, độ ổn định chuyển hóa, tính thấm vào hệ thần kinh trung ương, tính hướng đích vào quần thể tế bào đặc hiệu và đặc tính tương tự. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng sự thay thế đoạn, làm khuyết đoạn hoặc bổ sung đoạn riêng biệt cho trình tự peptit, polypeptit, hoặc protein làm thay đổi, bổ sung hoặc làm khuyết một axit amin hoặc một tỷ lệ phần trăm nhỏ của axit amin trong trình tự được mã hóa là “biến thể được cải biến bảo toàn” trong đó sự thay đổi dẫn đến sự thay thế axit amin bằng axit amin tương tự về mặt hóa

học. Bảng thay thế bảo toàn cung cấp các axit amin tương tự về chức năng đã được biết rõ trong lĩnh vực.

Dưới đây là ví dụ về sự phân loại các axit amin thành sáu nhóm, mỗi nhóm chứa axit amin có sự thay thế bảo toàn cho nhau:

- 1) Alanin (A), Serin (S), Threonin (T);
- 2) Axit aspartic (D), axit glutamic (E);
- 3) Asparagin (N), Glutamin (Q);
- 4) Arginin (R), Lysin (K);
- 5) Isoleuxin (I), Leuxin (L), Methionin (M), Valin (V); và
- 6) Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W).

Các phương pháp phân loại khác thành các nhóm khác (ví dụ, nhóm béo, nhóm phân cực, nhóm không phân cực, nhóm ưa nước, nhóm kỵ nước v.v.) cũng đã được biết trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng để thay thế axit amin bảo toàn theo sáng chế.

Phạm vi bảo hộ của sáng chế còn bao gồm các muối của peptit, chất tương tự, và dẫn xuất hóa học của peptit theo sáng chế.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “muối” để chỉ cả muối của nhóm carboxyl và muối cộng axit của nhóm amino hoặc nhóm guanido của phân tử peptit. Các muối của nhóm carboxyl có thể được tạo ra bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm các muối vô cơ, ví dụ, muối natri, canxi, amoni, sắt (III) hoặc kẽm, và muối tương tự, và muối với bazơ hữu cơ như muối được tạo ra với amin, ví dụ như trietanolamin, piperidin, procain, và muối tương tự. Muối cộng axit bao gồm, ví dụ, muối với axit vô cơ, ví dụ như axit axetic hoặc axit oxalic. Muối mô tả ở đây cũng là các thành phần ion được thêm vào dung dịch peptit để làm gia tăng sự tạo hydrogel và/hoặc khoáng hóa chất khoáng canxi.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “dẫn xuất hóa học” để chỉ peptit chứa một hoặc nhiều gốc hóa học không tự nhiên là một phần của phân tử peptit như este và amit của các nhóm carboxy tự do, dẫn xuất axyl và alkyl của nhóm amino tự do, phospho este và ete của nhóm hydroxy tự do. Các cải biến này có thể được đưa vào phân tử bằng cách cho các gốc axit amin hướng đích của peptit phản ứng với chất dẫn xuất hóa hữu cơ có khả năng phản ứng với các mạch bên hoặc gốc ở đầu tận cùng được chọn. Các dẫn xuất hóa học ưu tiên bao gồm peptit được phosphoryl hóa, đầu tận cùng C được amit hóa hoặc

đầu tận cùng N được axetyl hóa.

Thuật ngữ “dẫn xuất chức năng” của peptit theo sáng chế như được sử dụng ở đây để chỉ các dẫn xuất có thể được điều chế từ các nhóm chức xuất hiện ở dạng mạch bên trên gốc hoặc nhóm ở đầu tận cùng N hoặc C, theo cách đã biết trong lĩnh vực này, và được bao gồm trong sáng chế miễn là chúng vẫn có tính được dụng, nghĩa là chúng không phá hủy hoạt tính của peptit, không tạo ra tính chất gây độc cho chế phẩm chứa peptit này và không có tác dụng bất lợi đến các tính chất kháng nguyên của peptit. Các dẫn xuất này có thể bao gồm, ví dụ, este béo của nhóm carboxyl, amit của nhóm carboxyl được tạo ra bằng cách phản ứng với amoniac hoặc với amin bậc nhất hoặc bậc hai, dẫn xuất N-axyl của nhóm amin tự do của các gốc axit amin được tạo bằng cách phản ứng với các gốc axyl (ví dụ, nhóm alkanoyl hoặc aroyl vòng cacbon) hoặc dẫn xuất O-axyl của nhóm hydroxyl tự do (ví dụ, của gốc seryl hoặc threonyl) được tạo bằng cách phản ứng với gốc axyl.

Thuật ngữ “chất tương tự peptit” để chỉ phân tử có trình tự axit amin theo sáng chế, ngoại trừ một hoặc nhiều thay đổi về axit amin hoặc một hoặc nhiều cải biến/thay thế của liên kết amit. Chất tương tự peptit bao gồm sản phẩm thay thế và/hoặc sản phẩm cộng axit amin với các gốc axit amin tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên, và sản phẩm cải biến hóa học không có trong tự nhiên. Chất tương tự peptit bao gồm chất bắt chước peptit. Thuật ngữ “chất bắt chước peptit” để chỉ peptit theo sáng chế được cải biến theo cách sao cho peptit này chứa ít nhất một gốc không mã hóa hoặc ít nhất một liên kết không phải peptit. Các sản phẩm cải biến này bao gồm, ví dụ, sản phẩm alkyl hóa và cụ thể hơn là sản phẩm metyl hóa của một hoặc nhiều gốc, sản phẩm xen đoạn hoặc sản phẩm thay thế axit amin tự nhiên bằng axit amin không có trong tự nhiên, sản phẩm thay thế liên kết amit bằng liên kết cộng hóa trị khác. Chất bắt chước peptit theo sáng chế có thể tùy ý chứa ít nhất một liên kết là liên kết thay thế amit như liên kết ure, liên kết carbamat, liên kết sulfonamit, liên kết hydrazin, hoặc liên kết cộng hóa trị khác bất kỳ. Việc thiết kế "chất tương tự" phù hợp có thể được hỗ trợ bằng máy tính. Chất tương tự peptit khác theo sáng chế chứa trình tự peptit hoặc trình tự của chất tương tự peptit cụ thể theo thứ tự đảo ngược, cụ thể là các axit amin được kết hợp trong trình tự peptit theo thứ tự đảo ngược so với thứ tự axit amin xuất hiện trong protein tự nhiên hoặc trong peptit hoặc chất tương tự cụ thể đã xác định làm hoạt chất.

Bất kể là chất hoàn toàn không phải peptit hoặc chất một phần không phải peptit, chất bất chước peptit theo sáng chế tạo ra sự sắp xếp không gian của các gốc hóa học rất giống với sự sắp xếp ba chiều của các nhóm trong peptit mà chất bất chước peptit này dựa vào. Do có cấu trúc tương tự ở vị trí hoạt tính này, chất bất chước peptit có các tác dụng đối với hệ sinh học tương tự với hoạt tính sinh học của peptit.

Gốc axit amin được cải biến là gốc axit amin trong đó nhóm hoặc liên kết bất kỳ được cải biến bằng cách làm khuyết đoạn, thêm đoạn, hoặc thay thế bằng một nhóm hoặc liên kết khác, miễn là nhóm chức của gốc axit amin được bảo toàn hoặc nếu nhóm chức thay đổi (ví dụ, thay thế tyrosin bằng phenylalanin được thế) thì sự cải biến này không làm ảnh hưởng đến hoạt tính của peptit chứa gốc được cải biến.

Thuật ngữ “thể liên hợp peptit” theo sáng chế để chỉ phân tử chứa trình tự peptit thúc đẩy sự phát triển mạch máu mà gốc khác là peptit hoặc không phải peptit được liên kết cộng hóa trị với trình tự peptit này theo cách trực tiếp hoặc thông qua nhóm liên kết.

Thuật ngữ “nhóm liên kết” để chỉ gốc hóa học, liên kết hóa học trực tiếp thuộc loại bất kỳ, hoặc nhóm đệm có mục đích là để liên kết cộng hóa trị, gốc có tính thấm tế bào và peptit hoặc chất bất chước peptit. Nhóm đệm có thể được sử dụng để tạo ra khoảng cách giữa gốc làm tăng tính thấm và peptit.

Thuật ngữ “tính thấm” để chỉ khả năng của tác nhân hoặc chất thấm vào, thâm nhập vào, hoặc khuếch tán qua lớp chắn, màng, hoặc lớp da. Thuật ngữ gốc có “tính thấm tế bào” hoặc “sự thấm tế bào” để chỉ phân tử bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này có thể tạo điều kiện thuận lợi hoặc làm tăng độ thấm của phân tử qua màng. Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế bao gồm: gốc kỵ nước như lipit, axit béo, steroid và hợp chất thơm hoặc béo có kích thước lớn; gốc có thể có thụ thể màng tế bào hoặc chất mang, như steroid, vitamin và đường, axit amin tự nhiên và không có trong tự nhiên, peptit vận chuyển, hạt có kích thước nano và liposom.

Thuật ngữ “chất mang chấp nhận được về mặt sinh lý” hoặc “chất pha loãng” hoặc “tá dược” để chỉ chất lỏng chứa nước hoặc không chứa nước được làm thích ứng để sử dụng trong chế phẩm dược. Ngoài ra, thuật ngữ “chất mang hoặc tá dược được dụng” để chỉ ít nhất một chất mang hoặc tá dược và bao gồm hỗn hợp các chất mang và/hoặc các tá dược. Thuật ngữ “chất điều trị” để chỉ dược chất, thuốc hoặc chất phòng bệnh bất

kỳ có thể được sử dụng trong điều trị (bao gồm phòng ngừa, chẩn đoán, làm giảm nhẹ, hoặc chữa bệnh) rối loạn, sự đau ốm, bệnh hoặc tổn thương ở bệnh nhân.

Dược lý học

Ngoài các mối quan tâm khác, việc các hoạt chất mới theo sáng chế là peptit, chất tương tự peptit hoặc chất bắt chước peptit đặt ra yêu cầu là dạng bào chế cần phải trở nên thích hợp cho việc phân phối các loại hợp chất này. Mặc dù nói chung peptit ít thích hợp để sử dụng qua đường miệng do dễ bị tiêu hóa bởi axit dạ dày hoặc enzym trong ruột, nhưng các phương pháp mới vẫn đang được sử dụng để thiết kế và tạo ra chất tương tự chất bắt chước peptit ổn định về mặt chuyển hóa và có độ sinh khả dụng qua đường miệng.

Chế phẩm dược theo sáng chế có thể được sử dụng theo cách thích hợp bất kỳ, như qua đường miệng, khu trú, trong mũi, dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong khớp, trong thương tổn, bằng cách xông hít hoặc ngoài đường tiêu hóa, và được bào chế riêng cho đường sử dụng. Chế phẩm được bào chế theo đường sử dụng.

Chế phẩm dược theo sáng chế có thể được sản xuất theo các quy trình đã được biết rõ trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng quy trình trộn, hòa tan, tạo hạt, nghiền, nghiền thành bột, tạo viên bao đường, nghiền mịn, nhũ hóa, bao nang, tạo bầy hoặc làm đông khô thông thường.

Do đó, chế phẩm dược để sử dụng theo sáng chế có thể được bào chế theo cách thông thường bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất mang chấp nhận được về mặt sinh lý bao gồm tá dược và chất phụ trợ để tạo điều kiện thuận lợi cho việc xử lý hợp chất có hoạt tính thành chế phẩm có thể được sử dụng về mặt dược. Dạng bào chế thích hợp phụ thuộc vào đường sử dụng thuốc được chọn.

Chế phẩm dược có thể được sử dụng qua đường miệng bao gồm viên nang lấp khít (push-fit) được làm bằng gelatin cũng như viên nang mềm, kín được làm bằng gelatin và chất dẻo hóa, như glyxerol hoặc sorbitol. Viên nang lấp khít có thể chứa hoạt chất ở dạng hỗn hợp với chất độn như lactoza, chất kết dính như tinh bột, chất làm trơn như bột talc hoặc magie stearat và tùy ý, chất ổn định. Trong viên nang mềm, hợp chất có hoạt tính có thể được hòa tan hoặc tạo hỗn dịch trong chất lỏng thích hợp như dầu béo, parafin lỏng, hoặc polyetylen glycol lỏng. Ngoài ra, chất ổn định có thể được

thêm vào.

Để tiêm, hợp chất theo sáng chế có thể được bào chế trong dung dịch nước, tốt hơn là trong dung dịch đệm tương hợp về mặt sinh lý như dung dịch Hank, dung dịch Ringer, hoặc dung dịch đệm nước muối sinh lý. Để sử dụng qua niêm mạc, chất thích hợp với lớp ngăn cản thấm qua được sử dụng khi bào chế. Chất thấm như polyetylen glycol chẳng hạn đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Nhân của viên bao đường được tạo ra với lớp bao thích hợp. Nhằm mục đích này, dung dịch đường đậm đặc có thể được sử dụng, dung dịch này có thể tùy ý chứa gồm arabic, bột talc, polyvinyl pyrolidon, gel carbopol, polyetylen glycol, titan dioxit, dung dịch sơn và dung môi hoặc hỗn hợp dung môi hữu cơ thích hợp. Thuốc nhuộm hoặc chất tạo màu có thể được thêm vào viên nén hoặc lớp phủ viên bao đường để xác định hoặc để phân biệt các hỗn hợp liều hoạt chất khác nhau.

Để sử dụng qua đường trong má, chế phẩm có thể ở dạng viên nén hoặc viên thuốc hình thoi được bào chế theo cách thông thường.

Để sử dụng bằng cách xông hít, các phương án để sử dụng theo sáng chế được phân phối một cách thuận tiện ở dạng trình bày phun khí dung từ hộp được gia áp hoặc dụng cụ phun có sử dụng chất đẩy thích hợp, ví dụ, diclodiflometan, tricloflometan, diclotetrafloetan hoặc cacbon dioxit. Trong trường hợp thuốc khí dung được gia áp, đơn vị liều có thể được xác định bằng cách tạo ra van để phân phối lượng được định liều. Viên nang và vỏ gelatin chẳng hạn để sử dụng trong dụng cụ hít hoặc dụng cụ bơm có thể được bào chế chứa hỗn hợp bột của peptit và nền dạng bột thích hợp như lactoza hoặc tinh bột.

Chế phẩm được để sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch nước chứa hoạt chất ở dạng tan trong nước. Ngoài ra, hỗn dịch chứa hoạt chất có thể được bào chế ở dạng hỗn dịch tiêm trong dầu thích hợp. Các chất mang tự nhiên hoặc tổng hợp thích hợp là đã được biết rõ trong lĩnh vực này (Pillai et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 447, 2001). Theo cách tùy ý, hỗn dịch cũng có thể chứa chất ổn định hoặc chất làm tăng độ tan của hợp chất thích hợp để cho phép tạo ra dung dịch có nồng độ cao. Theo cách khác, hoạt chất có thể ở dạng bột để hoàn nguyên bằng chất dẫn thuốc thích hợp, ví dụ, nước vô trùng không gây sốt, trước khi sử dụng.

Chế phẩm được thích hợp để sử dụng theo sáng chế bao gồm chế phẩm trong đó

hoạt chất được chứa với lượng hữu hiệu để đạt được mục đích dự định. Cụ thể hơn, lượng có hiệu quả điều trị có nghĩa là lượng hợp chất hữu ích để ngăn ngừa, làm giảm nhẹ hoặc cải thiện triệu chứng của bệnh ở đối tượng cần điều trị. Việc xác định lượng có hiệu quả điều trị được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ.

Độc tính và hiệu quả điều trị của peptit được mô tả ở đây có thể được xác định bằng các phương pháp được tiêu chuẩn trong môi trường nuôi cấy tế bào hoặc động vật thử nghiệm, ví dụ, bằng cách xác định IC₅₀ (nồng độ tạo ra mức độ ức chế 50%) và LD₅₀ (liều chết gây chết 50% động vật được thử nghiệm) đối với hợp chất quan tâm. Dữ liệu thu được từ các thử nghiệm nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu trên động vật này có thể được sử dụng để bào chế khoảng liều dùng cho người. Liều dùng có thể thay đổi phụ thuộc vào dạng liều được sử dụng và đường dùng thuốc được sử dụng. Dạng bào chế, đường sử dụng và liều dùng chính xác có thể được lựa chọn bởi từng bác sĩ khi xem xét tình trạng bệnh nhân (ví dụ, Fingl, et al., 1975, trong tài liệu "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1).

Theo một số phương án của sáng chế, liều sử dụng các chế phẩm được này nằm trong khoảng từ 0,1 mg/kg đến 50 mg/kg thể trọng.

Tùy thuộc vào mức độ nặng và sự đáp ứng của tình trạng bệnh cần điều trị, sự định liều cũng có thể là việc sử dụng chế phẩm giải phóng chậm một lần, với quá trình điều trị kéo dài từ vài ngày đến vài tuần hoặc cho đến khi bệnh được chữa khỏi hoặc đạt được sự thuyên giảm tình trạng bệnh. Tất nhiên là lượng chế phẩm cần sử dụng sẽ phụ thuộc vào đối tượng cần điều trị, mức độ nặng của bệnh, cách dùng thuốc, sự đánh giá của bác sĩ kê đơn, và tất cả các yếu tố liên quan khác.

Theo một số phương án nhất định, khả năng phân phối peptit có thể được tăng cường bằng cách sử dụng tá dược bảo vệ. Điều này thường được thực hiện bằng cách tạo phức peptit với chế phẩm để khiến cho peptit này có khả năng chịu được quá trình thủy phân bằng axit hoặc enzym hoặc bằng cách bao polypeptit trong chất mang có tính kháng thích hợp như liposom. Các phương tiện bảo vệ polypeptit để phân phối qua đường miệng là đã được biết rõ trong lĩnh vực này (ví dụ, xem Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 5.391.377 mô tả chế phẩm lipid để phân phối chất điều trị qua đường miệng).

Thời gian bán hủy trong huyết thanh gia tăng có thể được duy trì bằng cách sử

dụng hệ “bao” protein giải phóng duy trì. Các hệ giải phóng duy trì đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Theo một phương án được ưu tiên, hệ phân phối hạt vi cầu có thể thoái biến sinh học ProLease dùng cho protein và peptit được sử dụng (Tracy, 1998, Biotechnol. Prog. 14, 108; Johnson et al., 1996, Nature Med. 2, 795; Herbert et al., 1998, Pharmaceut. Res. 15, 357), trong đó bột khô gồm các hạt vi cầu polyme có thể thoái biến sinh học chứa protein trong nền polyme có thể được trộn lẫn dưới dạng chế phẩm khô với sự có mặt hoặc không có mặt của các chất khác.

Theo một số phương án nhất định, dạng liều dùng của chế phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hệ thuốc tiêm dạng giải phóng chậm có thể thoái biến sinh học như hệ thuốc tiêm dạng giải phóng chậm trên cơ sở PLGA; hệ thuốc tiêm dạng giải phóng chậm không trên cơ sở PLGA, và gel hoặc thể phân tán có thể thoái biến sinh học dùng để tiêm. Mỗi khả năng là một phương án riêng của sáng chế. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “có thể thoái biến sinh học” để chỉ thành phần xói mòn hoặc thoái biến ở bề mặt của nó theo thời gian ít nhất một phần do tiếp xúc với các chất được tìm thấy trong dịch mô bao quanh, hoặc do tác dụng của tế bào. Cụ thể, thành phần có thể thoái biến sinh học là polyme bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các polyme trên cơ sở axit lactic như polylactit, ví dụ, poly (D,L-lactit), nghĩa là PLA; polyme trên cơ sở axit glycolic như polyglycolit (PGA), ví dụ, Lactel® có bán từ công ty Durect; poly (D,L-lactit-co-glycolit), nghĩa là PLGA, (Resomer® RG-504, Resomer® RG-502, Resomer® RG-504H, Resomer® RG- 502H, Resomer® RG-504S, Resomer® RG-502S, có bán từ công ty Boehringer, Lactel® có bán từ công ty Durect); polycaprolacton như poly(ϵ -caprolacton), nghĩa là PCL (Lactel® có bán từ công ty Durect); polyanhydrit; poly(axit sebaxic), SA; poly(axit rixenolic), RA; poly(axit fumaric), FA; poly(dime axit béo), FAD; poly(axit tereptalic), TA; poly(axit isoptalic), IPA; poly(p-{carboxyphenoxy}metan), CPM; poly(p-{carboxyphenoxy}propan), CPP; poly(p-{carboxyphenoxy}hexan), CPH; polyamin, polyuretan, polyesteramit, polyorthoeste {CHDM: cis/trans- xyclohexyl dimetanol, HD: 1,6-hexandiol. DETOU: (3,9-dietyliden-2,4,8,10-tetraoxaspiro undecan)}; polydioxanon; polyhydroxybutyrat; polyalkylen oxalat; polyamit; polyesteramit; polyuretan; polyaxetal; polyketal; polycacbonat; polyorthocacbonat; polysiloxan; polyphosphazen;

sucxinat; axit hyaluronic; poly(axit malic); poly(axit amin); polyhydroxyvalerat; polyalkylen sucxinat; polyvinylpyrrolidon; polystyren; este xenluloza tổng hợp; axit polyacrylic; axit polybutyric; copolyme ba khối PLGA-PEG-PLGA, copolyme ba khối PEG-PLGA-PEG, poly (N-isopropylacrylamit) (PNIPAAm), copolyme ba khối poly (etylen oxit)- poly (propylen oxit)- poly (etylen oxit) (PEO-PPO-PEO), poly axit valeric; polyetylen glycol; polyhydroxyalkylxenluloza; chitin; chitosan; polyorthoeste và copolyme, trime; các lipid như cholesterol, lexitin; poly(axit glutamic-co-etyl glutamat) và hợp chất tương tự, hoặc hỗn hợp của chúng.

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế chứa polyme có thể thoái biến sinh học được chọn từ, nhưng không chỉ giới hạn ở, PLGA, PLA, PGA, polycaprolacton, polyhydroxybutyrat, polyorthoeste, polyalkananhidrit, gelatin, collagen, xenluloza oxy hóa, polyphosphazen và hợp chất tương tự. Mỗi khả năng là một phương án riêng.

Chế phẩm thức ăn cho cá

Chế phẩm thức ăn theo sáng chế có thể là một phần của, hoặc được trộn với thức ăn thông thường của loài cá cụ thể. Thông thường, thức ăn cho cá bao gồm thức ăn được sử dụng cho loại cá cần được nuôi và bao gồm protein, dầu, vitamin và các chất phụ gia khác.

Theo một số ví dụ không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế, chất đối kháng theo sáng chế được đưa vào chế phẩm dạng rắn được tạo viên chứa protein hoặc sản phẩm thủy phân protein với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 15 đến 50%, chất béo với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 2 đến 5%, và chất xơ thô với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 3 đến 10% cùng với lượng không đáng kể của các chất phụ trợ như chất khoáng, vitamin, và/hoặc nguyên tố vi lượng.

Chế phẩm thức ăn cho cá chứa chất đối kháng theo sáng chế được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, các viên thức ăn thường có đường kính nằm trong khoảng từ 0,5 đến 20mm được tạo ra từ chế phẩm theo sáng chế và làm khô trước khi bảo quản và sử dụng. Sự kết dính các viên thức ăn có thể được cải thiện bằng cách hòa tan một lượng nhỏ gelatin vào nước. Nếu bột nước sữa tan trong nước tạo ra phần lớn hàm lượng protein, tốt hơn nếu bề mặt viên thức ăn được bao bằng một ít dầu hoặc chất béo để ngăn ngừa sự phân rã sớm của viên thức ăn này khi tiếp xúc

với nước. Chế phẩm chứa gelatin có thể được tạo bột theo cách thông thường để tạo ra viên thức ăn xộp có tỷ trọng chung tương tự với tỷ trọng của nước. Các viên thức ăn này nổi trong nước và vẫn ở trạng thái tiếp cận được với cá trong thời gian tương đối dài. Nhiều loại cá không thấy được các viên thức ăn chìm xuống đáy. Chất đối kháng theo sáng chế cũng có thể được trộn với thức ăn của cá có thành phần thông thường được bán trên thị trường bằng cách phân bố đồng đều chất bổ sung trong chế phẩm cơ sở và sau đó, tạo viên từ hỗn hợp thu được. Theo một số phương án, viên thức ăn được bao bằng hợp chất theo sáng chế và được sử dụng để cho cá ăn.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả với các phương án cụ thể khác nhau của sáng chế để minh họa sáng chế, các phương án được mô tả cụ thể này không được hiểu là làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế. Nhiều phương án cụ thể khác có thể được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này tìm thấy dựa vào phần mô tả ở đây của người nộp đơn, và người nộp đơn dự định sự liên quan đến sáng chế chỉ bởi tinh thần và phạm vi bảo hộ của sáng chế như được xác định trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây chứng minh hoạt tính *in-vitro* và *in-vivo* của hợp chất theo sáng chế có vai trò là chất đối kháng NKB của cá.

Ví dụ 1: Thiết kế và tổng hợp chất bất chức peptit

Một số chất bất chức peptit theo sáng chế được thiết kế dựa trên các vấn đề quan tâm sau đây:

Đầu tận cùng N của peptit được cải biến bằng cách thêm gốc bít đầu như succinyl (succ) liên kết với gốc Asp, sao cho peptit không có nhóm amin ở đầu tận cùng dễ bị phân hủy bởi amin peptidaza. Điều này bất ngờ tạo ra khả năng rút ngắn peptit hoạt tính từ 11 axit amin còn 7 axit amin;

Việc thay thế gốc Phe bằng gốc D-Trp ngăn ngừa chất chủ vận lắp khít vào thụ thể NK. Việc này làm thay đổi hoạt tính của peptit từ chất chủ vận thành chất đối kháng và cũng làm cho peptit trở nên ổn định với quá trình phân hủy bởi endopeptidaza.

Gốc Val được N-metyl hóa để thiết lập sự ràng buộc cấu dạng giúp làm ổn định cấu dạng có hoạt tính sinh học, nhờ đó thiết lập tính chọn lọc thụ thể và sự ổn định trao đổi chất, ngăn ngừa quá trình phân hủy bởi endopeptidaza.

Gốc Gly được thay thế bằng β Ala (beta alanin), điều này dẫn đến việc làm tăng khả năng linh hoạt về cấu dạng của cấu dạng có hoạt tính sinh học và tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình chuyển hóa chất chủ vận thành chất đối kháng.

Nhóm carboxamit ở đầu tận cùng có nhóm carboxy cần thiết để gắn kết và hoạt hóa thụ thể và ngăn ngừa quá trình phân hủy bởi carboxypeptidaza.

Chất bắt chước peptit được tổng hợp theo phương pháp pha rắn tự động bằng cách sử dụng quá trình hóa học este hoạt tính Fmoc. Quá trình khó kết hợp axit amin kỵ nước, như Fmoc-D-Trp-OH với NMe-Val-peptidyl-nhựa được thực hiện hai lần bằng cách sử dụng HATU trong thời gian 5 giờ trong DMF. Hợp chất được tinh chế bằng phương pháp HPLC đến độ tinh khiết $\geq 95\%$.

Ví dụ 2: Thử nghiệm *in vitro*

Có hai con đường truyền tín hiệu, một con đường là kênh cAMP/PKA (protein kinaza A) chuyển tiếp, và con đường thứ hai là kênh Ca^{2+} /PKC. Con đường PKA được hoạt hóa bởi yếu tố đáp ứng cAMP (cAMP response element: CRE) và con đường PKC được hoạt hóa thông qua yếu tố đáp ứng steroid (steroid response element: SRE).

Để phân biệt giữa con đường truyền tín hiệu PKC và PKA, thử nghiệm gen thông báo nhảy với luxiferaza (LUC) được thực hiện bằng cách sử dụng LUC được điều hòa phiên mã bằng yếu tố đáp ứng huyết thanh (SRE; Invitrogen) hoặc yếu tố đáp ứng AMP vòng (cAMP) (CRE; Invitrogen). Gen *tac3ra* và *tac3rb* của cá rô Phi (mã số truy cập tại GenBank lần lượt là KF471674 và KF471675) hoặc gen *tac3ra* và *tac3rb* của cá ngựa vằn (mã số truy cập tại GenBank lần lượt là JF317292 và JF317293) được tách dòng trong vectơ biểu hiện pcDNA3.1 (Zeo-; Invitrogen) dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu CMV.

Nói chung, quá trình chuyển nhiễm chuyển tiếp, các phương pháp tế bào và trình tự kích thích được thực hiện theo tài liệu (Levavi-Sivan et al., 2005, Mol Cell Endocrinol 236:17-30; Brian et al., 2008, như trên; Brian et al., 2012, như trên; Brian et al., 2014, như trên. Tóm lại, tế bào COS-7 được sinh trưởng trong môi trường DMEM được bổ sung FBS 10%, glutamin 1%, penixilin 100 U/ml, và streptomycin 100 mg/ml (Biological Industries) trong CO_2 5% cho đến khi nhập dòng. Thực hiện đồng chuyển nhiễm pc-*tac3ra*, pc-*tac3rb* (với lượng 3 $\mu\text{g}/\text{đĩa}$), plasmit thông báo (với

lượng 2 $\mu\text{g}/\text{đĩa}$), và pCM.

Thực hiện chuyển nhiễm với chất phản ứng FuGENE 6.0 (Roche). Tế bào được ngừng cung cấp huyết thanh trong 36 giờ, kích thích bằng chất dẫn thuốc hoặc các nồng độ khác nhau của NKB của người, NKB của cá rô Phi, NKF của cá rô Phi, NKBa, NKBb của cá ngựa vằn, hoặc NKF của cá ngựa vằn trong 6 giờ, và sau đó được thu hoạch và phân tích.

Dịch tan được chuẩn bị từ tế bào thu được được thử nghiệm về cả hoạt tính luxiferaza và hoạt tính β -galactosidaza, chất này được sử dụng làm chất chuẩn nội để chuẩn hóa hoạt tính luxiferaza được định hướng bởi plasmid thử nghiệm, như đã mô tả ở phần trước. Các thử nghiệm chuyển nhiễm được thực hiện ba lần với ba tập hợp được phân lập độc lập.

Nồng độ phôi tử được sử dụng nằm trong khoảng từ 1nM đến 1 μM . Các bước xử lý được thực hiện bốn lần trong ba thử nghiệm độc lập.

Mỗi chất đối kháng được thêm vào ở các nồng độ khác nhau, với nồng độ không đổi của NKB hoặc NKF kiểu đại, ở liều lượng phôi tử (10^{-8}M) để tạo ra đáp ứng gần bằng ED50. Kết quả được phân tích bằng phần mềm Prism, theo đường cong hồi quy không tuyến tính về sự cạnh tranh ở một vị trí.

Tác dụng của chất đối kháng NKB được thử nghiệm ở cá rô Phi khi mỗi chất đối kháng được thêm vào ở nồng độ khác nhau cùng với NKB ở nồng độ 10^{-8}M ($=0,1\text{nM}$). NKB của cá rô Phi làm tăng hoạt tính luxiferaza lên 1,8 lần. Các chất đối kháng khác nhau làm giảm đáp ứng này khoảng 60% (Fig.1A). Thu được kết quả tương tự bằng cách sử dụng đáp ứng SRE (Fig.1B). Ngược lại, chất tương tự NKB và NKF của cá rô Phi (bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO 2013/018097) được chứng minh là có hoạt tính chủ vận trong cả hai thử nghiệm như được thể hiện trên Fig.1C đối với thử nghiệm CRE.

NKB của cá ngựa vằn có hiệu quả hơn peptit của cá rô Phi trong việc gây ra hoạt tính truyền tín hiệu, và làm tăng hoạt tính của CRE-LUC lên hơn 3 lần. Tác dụng của chất đối kháng NKB được thử nghiệm khi mỗi chất đối kháng được thêm vào ở các nồng độ khác nhau cùng với NKB ở nồng độ 10^{-8}M ($=0,1\text{nM}$). Các chất đối kháng khác nhau làm giảm đáp ứng này khoảng 60% (Fig.2A). Thu được kết quả tương tự bằng cách sử dụng đáp ứng SRE (Fig.2B), trong khi chất chủ vận NKB không có tác dụng ức chế mà

có tác dụng kích thích và tạo ra kết quả tương tự như được thể hiện trên Fig.1C.

Kết luận, chất bắt chước peptit có tác dụng đối kháng NKB theo sáng chế có thể ức chế quá trình truyền tín hiệu NKB.

Ví dụ 3. Chất đối kháng NKB không phải peptit

Tác dụng của chất đối kháng NKB phân tử nhỏ đã biết được thử nghiệm *in vitro* và *in vivo*. Các hợp chất thử nghiệm là: SB-222200 (Sarau et al., 2000 như trên); Osanetant (SR-142,801) và talnetant (SB 223412), (Sarau et al., 1997 như trên).

Tác dụng của chất đối kháng NKB SB222200 đối với CRE-Luc ở tế bào COS-7 được chuyển nhiễm bằng tac3r của cá rô Phi được thử nghiệm khi thụ thể và phối tử của người dùng làm đối chứng dương.

Như được thể hiện trên Fig.3A, một mình chất đối kháng không phải peptit không có tác dụng đối với hoạt tính luxiferaza, trong khi hNKB, NKB của cá rô Phi hoặc NKF của cá rô Phi, ở nồng độ 0,1nM ($=10^{-8}$ M), làm tăng hoạt tính của luxiferaza lên lần lượt là 1,7 và 2,3 lần.

Khi chất đối kháng với nồng độ khác nhau được thêm vào cùng với phối tử tự nhiên (NKB hoặc NKF) ở nồng độ 0,1nM, thu được đường cong ức chế điển hình, thể hiện hiệu lực đối kháng của SB222200 đối với thụ thể NKB của cá rô Phi (Fig.3B).

Tác dụng của chất đối kháng NKB Osanetant (SR-142,801) đối với CRE-Luc được thử nghiệm trong tế bào COS-7 được chuyển nhiễm bằng tac3r của cá rô Phi khi thụ thể và phối tử của người dùng làm đối chứng dương. Một mình chất đối kháng không phải peptit không có tác dụng đối với hoạt tính luxiferaza, trong khi NKB của người, NKB của cá rô Phi hoặc NKF của cá rô Phi, ở nồng độ 0,1nM ($=10^{-8}$ M), làm tăng hoạt tính luxiferaza lên lần lượt là 2,5 và 1,6 lần (Fig.4A). Tuy nhiên, khi chất đối kháng với nồng độ khác nhau được thêm vào cùng với phối tử tự nhiên (NKB hoặc NKF) ở nồng độ 0,1nM, thu được đường cong ức chế điển hình, thể hiện hiệu lực đối kháng của Osanetant (SR-142,801) đối với thụ thể NKB của cá rô Phi (Fig.4B).

SB222200 được thử nghiệm tiếp *in vivo* về hoạt tính đối kháng NKB đối với sự giải phóng chất thúc sinh dục ở cá rô Phi. Cá rô Phi cái thành thực sinh dục ($0,62 \pm 0,22\%$; $n = 10$ con/nhóm xử lý) được tiêm chất đối kháng NKB không phải peptit SB222200 với các liều khác nhau (10, 100 hoặc 500 $\mu\text{g/kg}$ thể trọng) ở thời điểm 0, 1, 2, 4 và 8 giờ, sau khi tiêm, cá được lấy máu từ hệ mạch máu ở đuôi của

chúng. Lượng chất thúc sinh dục FSH và LH được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA đặc hiệu theo phương pháp của Aizen và các đồng tác giả, 2007 (Aizen et al., 2007, Gen Comp Endocrinol, vol. 153, pp 323-332). Các kết quả cho thấy rằng trong khi không có sự thay đổi đáng kể nào được ghi nhận ở nhóm đối chứng, sự giảm dần đáng kể lại được ghi nhận ở cả lượng FSH (Fig.5A) và LH (Fig.5B) bắt đầu ở thời điểm 1 giờ sau khi tiêm.

Ví dụ 4. Thử nghiệm *in vivo*

Các chất đối kháng đã chọn và được chứng minh là hữu hiệu trong thử nghiệm chuyển hoạt hóa *in vitro* được thử nghiệm *in vivo*.

Cá rô Phi được trưởng thành (nặng 90g) được tiêm nước muối và DMSO 25%, SB2222000, hoặc chất đối kháng NKB Ant-4 (500 µg/kg thể trọng mỗi 48 giờ trong 2 tuần, n = 20 con cá mỗi nhóm) qua đường trong màng bụng. Cá được lấy máu từ mạch máu ở đuôi vào các bơm tiêm được heparin hóa ở thời điểm mỗi 2 ngày sau khi tiêm. Vào ngày thứ 7 và ngày thứ 14, năm con cá từ mỗi nhóm được lấy máu, thể tích tinh dịch và tuyến sinh dục được lấy để nghiên cứu mô. Huyết tương được phân tích về các thông số LH, FSH và 11KT. Các mẫu máu được lấy từ hệ mạch máu ở đuôi và ly tâm (3000 vòng/phút trong thời gian 20 phút ở nhiệt độ 4°C) để thu được mẫu huyết tương, mẫu này được bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho đến khi thử nghiệm. Các thử nghiệm ELISA được thực hiện theo phương pháp của Aizen và các đồng tác giả, 2007, (Gen Comp Endocrinol, vol. 153, pp 323-332) để xác định lượng FSH và LH và theo phương pháp của Hurvitz *et al.*, 2005 (Gen Comp Endocrinol 140:61-73) để xác định lượng 11KT (11-ketotestosteron, androgen chính ở cá liên quan đến sự sinh tinh trùng).

Fig.6 thể hiện kết quả quan sát mô học của các tuyến sinh dục thu được từ tinh hoàn của cá được xử lý so với cá đối chứng. Tinh hoàn cá có cấu tạo dạng nang. Như được thể hiện trên hình vẽ, cá được cho tiếp xúc với chất đối kháng NKB Ant-4 có nhiều nang rộng một phần chứa tinh trùng trưởng thành (sẹ trưởng thành) hơn. Thể tích tinh dịch của cá được tiêm chất đối kháng NKB được thể hiện trên Fig.7. Theo thứ tự từ phải sang trái: tinh dịch lấy từ cá được tiêm SB222200; tinh dịch lấy từ cá đối chứng; tinh dịch lấy từ cá được tiêm chất đối kháng NKB #4. Lượng 11KT ở cá được tiêm SB222200 hoặc chất đối kháng NKB Ant-4 được thể hiện trên Fig.8. 11KT là

androgen chính ở cá và liên quan đến quá trình sinh tinh trùng. Trong quá trình xử lý, lượng 11KT trong huyết tương tăng dần từ ngày 0 đến ngày 12 đối với cá đối chứng, trong khi với cá được tiêm SB222200 hoặc chất đối kháng NKB Ant-4 (#4), sự tăng này được ức chế đáng kể.

Ví dụ 5. Sự sinh trưởng *in vivo* của cá rô Phi

Cá rô Phi được trưởng thành (nặng 60g) được tiêm nước muối và DMSO 25%, SB2222000, hoặc chất đối kháng NKB Ant-6 (500 µg/kg thể trọng ở thời điểm mỗi 48 giờ trong 2 tuần, n = 25 con cá ở mỗi nhóm) qua đường trong màng bụng. Cá được cân trọng lượng ở thời điểm mỗi 7 ngày. Như được thể hiện trên Fig.9, quan sát thấy sự sinh trưởng đáng kể ở ngày 21, nghĩa là bảy ngày sau khi quá trình xử lý kết thúc.

Chỉ số thành thực sinh dục (GSI) là chỉ số tính toán khối lượng tuyến sinh dục dưới dạng tỷ số với tổng khối lượng cơ thể. Chỉ số GSI của cá được tiêm cũng được tính toán (Fig.10). Ở ngày 27, cá bị giết và chiết ARN tổng số từ tinh hoàn của chúng. Kháng nguyên trong nhân tế bào tăng sinh (PCNA) là kẹp ADN đóng vai trò là yếu tố ADN polymeraza δ ở tế bào có nhân điển hình và cần cho quá trình sao chép. Sự biểu hiện gen của PCNA được xác định trong tinh hoàn của cá được tiêm sau 27 ngày (Fig.11).

Ví dụ 6. Nuôi cá rô Phi con

Cá rô Phi cái 105 ngày tuổi được sử dụng trong nghiên cứu này. Việc nuôi cá bằng viên thức ăn cho cá được bao bằng chất đối kháng bất chước peptit, được bắt đầu ở thời điểm 3 tháng 12 ngày tuổi. Khẩu phần chất đối kháng NKB (Ant-2, Ant-3, Ant-6) được áp dụng với lượng 7,5 mg/kg thức ăn (từ 2% đến 3% trọng lượng cá). Cá được cho ăn hai lần một ngày trong các giờ ban ngày. Tốc độ sinh trưởng của cá được xác định. Như được thể hiện trên Fig.12A và Fig.12B, cá được nuôi bằng khẩu phần chứa chất đối kháng NKB có sự sinh trưởng nhanh hơn đáng kể (tăng khoảng 25% thể trọng) so với cá đối chứng. Không quan sát thấy sự thay đổi về nội quan của cá (như được xác định bằng ảnh các cơ quan).

Ví dụ 7. Thử nghiệm *in vitro* ở cá hồi

Tương tự với thử nghiệm *in vitro* thực hiện ở Ví dụ 2 đối với cá rô Phi và cá

ngựa vằn, sự ức chế hoạt tính NKB được thực hiện ở cá hồi. Thụ thể tac3 của cá hồi được tách dòng trong vectơ biểu hiện pcDNA3.1 (Zeo-; Invitrogen) dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu CMV. Quá trình chuyển nhiễm được thực hiện với chất phản ứng FuGENE 6.0 (Roche). Tế bào được ngừng cung cấp huyết thanh trong 36 giờ, kích thích bằng chất dẫn thuốc hoặc NKB của cá rô Phi với nồng độ khác nhau trong 6 giờ, và sau đó được thu hoạch và phân tích. Dịch tan được chuẩn bị từ tế bào thu hoạch được thử nghiệm về cả hoạt tính luxiferaza và hoạt tính β -galactosidaza, dịch này được sử dụng làm chất chuẩn nội để chuẩn hóa hoạt tính luxiferaza được định hướng bởi plasmit thử nghiệm. Các thử nghiệm chuyển nhiễm được thực hiện ba lần với ba tập hợp được phân lập độc lập. Nồng độ phối tử được sử dụng nằm trong khoảng từ 1nM đến 1 μ M. Các bước xử lý được thực hiện bốn lần trong ba thử nghiệm độc lập. Mỗi chất đối kháng (NKB-ant 4 và NKB-ant 6) được thêm vào với nồng độ khác nhau, cùng với NKB kiểu đại ở nồng độ không đổi (10^{-8} M) để tạo ra đáp ứng gần bằng ED50. Kết quả được phân tích bằng phần mềm Prism, theo đường cong hồi quy không tuyến tính về sự cạnh tranh ở một vị trí.

Khi tac3 của cá hồi được chuyển nhiễm, NKB làm cho hoạt tính luxiferaza tăng lên 1,8 lần. Như được thể hiện trên Fig.13, cả hai chất đối kháng #4 và #6 đều làm giảm thành công mức độ đáp ứng này khoảng 60%.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chất bắt chước peptit có công thức I: $X_1\text{-NMeVal-X}_4\text{-Leu-Met-Z}$ (công thức I), trong đó:
 - chất bắt chước peptit này bao gồm từ 5 đến 10 axit amin;
 - X_1 là mạch gồm từ 1 đến 6 gốc axit amin tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên và tùy ý là gốc hoặc biến thể bít đầu ở đầu tận cùng N;
 - NMeVal là gốc N-metyl-Valin hoặc gốc N-metyl-D-Valin;
 - X_4 là $\text{-NH(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}$ trong đó n nằm trong khoảng từ 2 đến 6; và
 - Z là đầu tận cùng C của peptit, đầu tận cùng này có thể được amit hóa, axyl hóa, khử hoặc este hóa.
2. Chất bắt chước peptit theo điểm 1, trong đó X_1 chứa ít nhất một gốc axit amin thơm có cấu hình L hoặc D.
3. Chất bắt chước peptit theo điểm 1, trong đó X_1 chứa ít nhất một gốc axit amin có tính axit mang điện tích âm.
4. Chất bắt chước peptit theo điểm 1, trong đó X_1 bao gồm 2 hoặc 3 gốc axit amin là gốc thơm, gốc axit mang điện tích âm và gốc bít đầu ở đầu tận cùng N.
5. Chất bắt chước peptit theo điểm 4, trong đó X_1 là gốc được chọn từ gốc axit amin béo và gốc phân cực, không mang điện.
6. Chất bắt chước peptit theo điểm 1, trong đó X_1 chứa gốc thơm được chọn từ nhóm bao gồm Phe, DPhe, Trp và DTrp; gốc axit mang điện tích âm được chọn từ Glu và Asp; và gốc bít đầu ở đầu tận cùng N succinyl (Succ).
7. Chất bắt chước peptit theo điểm 1, trong đó X_1 chứa gốc thơm được chọn từ Phe, và DTrp; gốc Asp; gốc bít đầu ở đầu tận cùng N succinyl (Succ), và tùy ý là gốc được chọn từ Ile và Ser.
8. Chất bắt chước peptit theo điểm 1, trong đó chất bắt chước peptit này có công thức II: $X_1\text{-NMeVal-}\beta\text{Ala-Leu-Met-NH}_2$ (công thức II), và X_1 được chọn từ nhóm bao gồm: Succ-Asp-Phe; Succ-Asp-DPhe; Succ-Asp-Trp; Succ-Asp-DTrp; Succ-Asp-Ile-Phe; Succ-Asp-Ile-DPhe; Succ-Asp-Ile-Trp; Succ-Asp-Ile-DTrp; Succ-Asp-Ser-

Phe; Succ-Asp-Ser-DPhe; Succ-Asp-Ser-Trp; Succ-Asp-Ser-DTrp, Succ-Glu-Phe; Succ-Glu-DPhe; Succ-Glu-Trp; Succ-Glu-DTrp; Succ-Glu-Ile-Phe; Succ-Glu-Ile-DPhe; Succ-Glu-Ile-Trp; Succ-Glu-Ile-DTrp; Succ-Glu-Ser-Phe; Succ-Glu-Ser-DPhe; Succ-Glu-Ser-Trp; và Succ-Glu-Ser-DTrp.

9. Chất bắt chước peptit theo điểm 1, trong đó chất bắt chước peptit này bao gồm từ 5 đến 10 gốc axit amin chứa trình tự: NMeVal- β Ala-Leu-Met (SEQ ID NO: 7).
10. Chất bắt chước peptit theo điểm 9, trong đó chất bắt chước peptit này chứa trình tự SEQ ID NO: 7, ít nhất một gốc axit amin thơm, ít nhất một gốc axit amin mang điện tích âm, ít nhất một gốc được chọn từ gốc axit amin béo và gốc phân cực, không mang điện, và đầu tận cùng N được bịt.
11. Chất bắt chước peptit theo điểm 1, trong đó chất bắt chước peptit này được chọn từ nhóm bao gồm:
 Succ-Asp-Ile-Phe-N(Me)Val- β Ala-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 1, Ant-1);
 Succ-Asp-Phe-N(Me)Val- β Ala-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 2, Ant-2);
 Succ-Asp-Ser-Phe-N(Me)Val- β Ala-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 3, Ant-3);
 Succ-Asp-Ile-D-Trp-N(Me)Val- β Ala-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 4, Ant-4);
 Succ-Asp-D-Trp-N(Me)Val- β Ala-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 5, Ant-5); và
 Succ-Asp-Ser-D-Trp-N(Me)Val- β Ala-Leu-Met-NH₂ (SEQ ID NO: 6, Ant-6);
 trong đó Succ là succinyl.
12. Chế phẩm chứa chất bắt chước peptit theo điểm 1.
13. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó chế phẩm này ở dạng chế phẩm được chứa ít nhất một chất mang, chất pha loãng, muối hoặc tá dược được dụng hoặc chế phẩm thức ăn chứa ít nhất một chất dinh dưỡng và tùy ý, ít nhất một chất phụ gia thức ăn.
14. Chế phẩm theo điểm 13, trong đó chế phẩm này được bào chế để sử dụng cho cá theo đường được chọn từ nhóm bao gồm: sử dụng trong thành, sử dụng qua đường miệng và sử dụng bằng cách ngâm hoặc dưới dạng một phần của thức ăn hoặc nước sử dụng thông thường.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Yissum Research Development Company of The Hebrew University of Jerusalem Ltd.
- <120> CHẤT BẤT CHUỐC PEPTIT DÙNG ĐỂ ỨC CHẾ QUÁ TRÌNH SINH SẢN CỦA CÁ VÀ CHẾ PHẨM CHỨA CHẤT NÀY
- <130> YISSUM/0122 PCT
- <160> 7
- <170> PatentIn phiên bản 3.5
- <210> 1
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <223> Peptit tổng hợp
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (1)..(1)
- <223> AXETYL HÓA bằng succinyl
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (4)..(4)
- <223> MeVal
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (5)..(5)
- <223> bAla
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (7)..(7)
- <223> AMIT HÓA
- <400> 1
- Asp Ile Phe Xaa Xaa Leu Met
1 5
- <210> 2
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <223> Peptit tổng hợp
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (1)..(1)
- <223> AXETYL HÓA bằng succinyl
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (3)..(3)
- <223> MeVal
- <220>

<221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> bAla

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIT HÓA

<400> 2

Asp Phe Xaa Xaa Leu Met
 1 5

<210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> AXETYL HÓA bằng succinyl

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> MeVal

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> bAla

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> AMIT HÓA

<400> 3

Asp Ser Phe Xaa Xaa Leu Met
 1 5

<210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> AXETYL HÓA bằng succinyl

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> D-Trp

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> MeVal

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> bAla

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> AMIT HÓA

<400> 4

Asp Ile Trp Xaa Xaa Leu Met
 1 5

<210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> AXETYL HÓA bằng succinyl

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> D-Trp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> MeVal

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> bAla

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIT HÓA

<400> 5

Asp Trp Xaa Xaa Leu Met
 1 5

<210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> AXETYL HÓA bằng succinyl

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> D-Trp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> MeVal

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> bAla

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> AMIT HÓA

<400> 6

Asp Ser Trp Xaa Xaa Leu Met
 1 5

<210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> MeVal

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> bAla

<400> 7

Xaa Xaa Leu Met
 1

Fig.1A

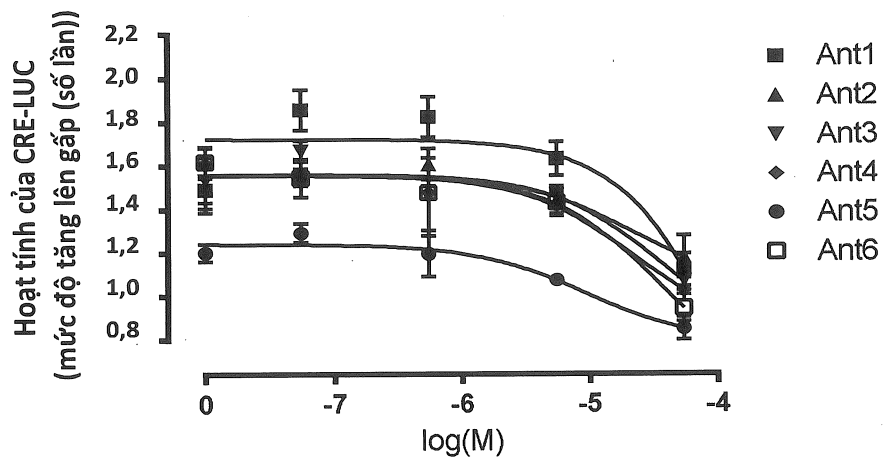


Fig.1B

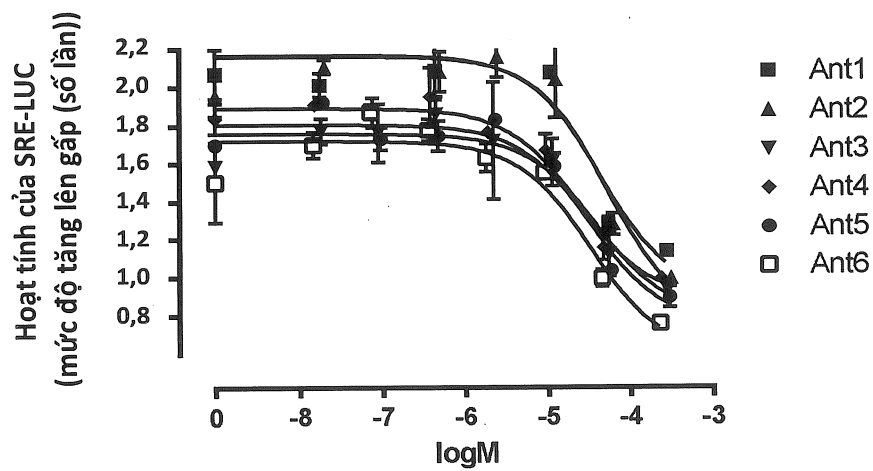


Fig.1C

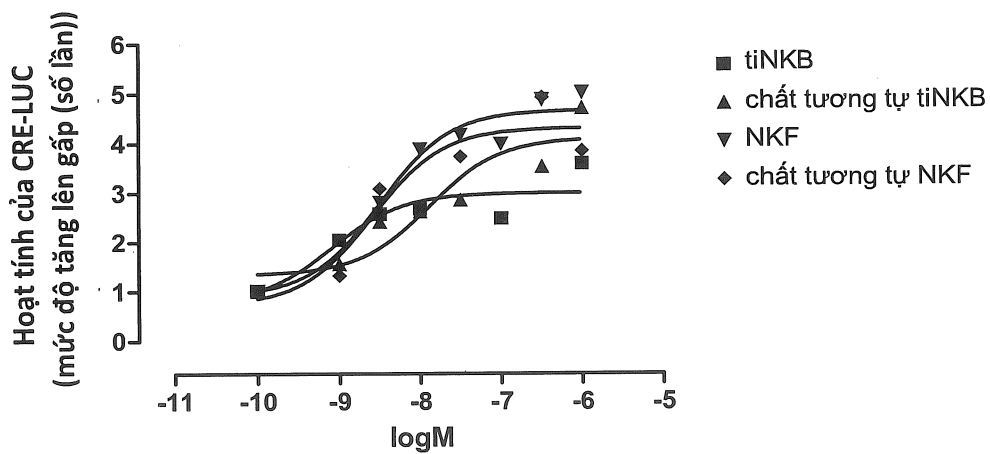


Fig.2A

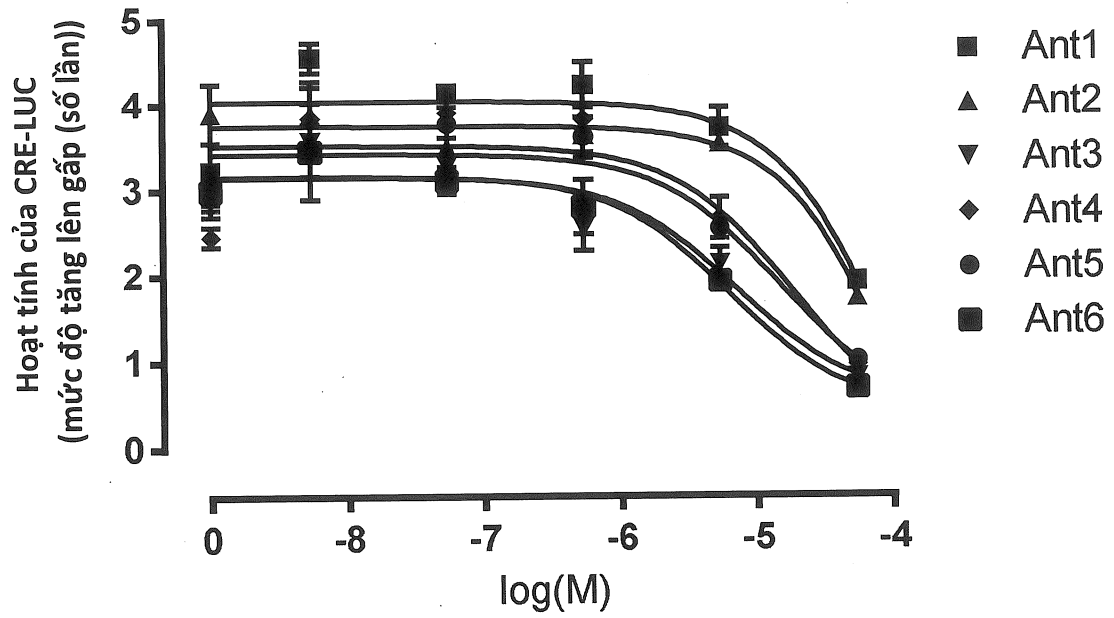


Fig.2B

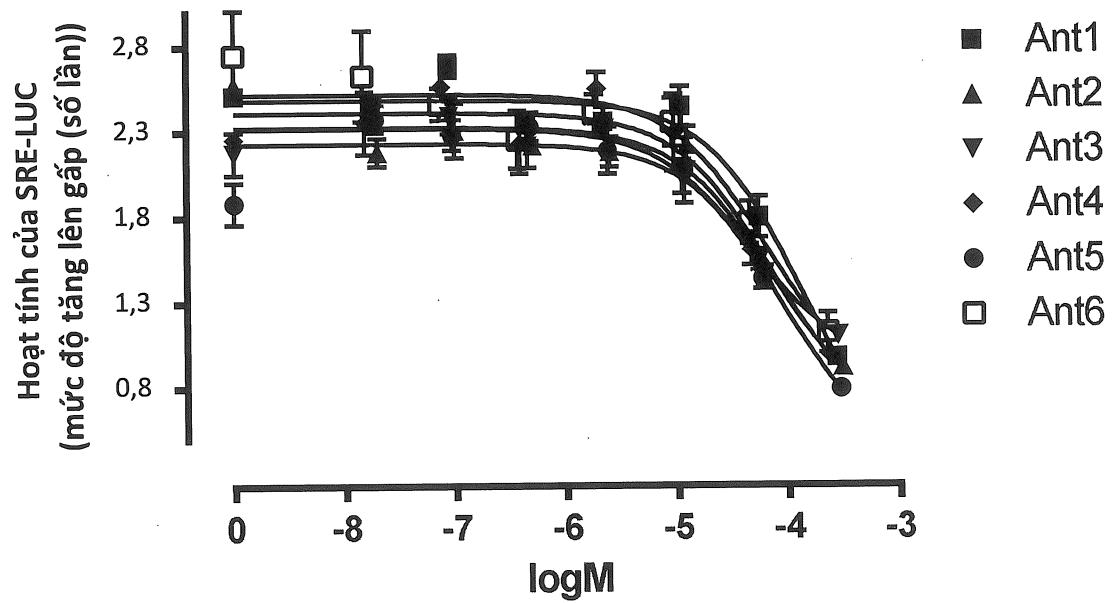


Fig.3A

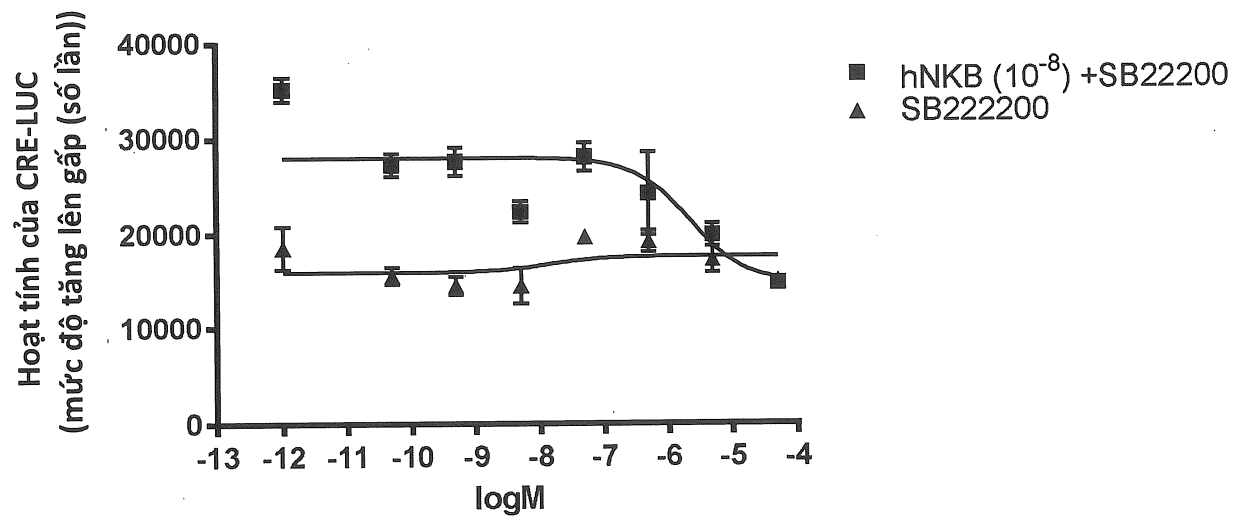


Fig.3B

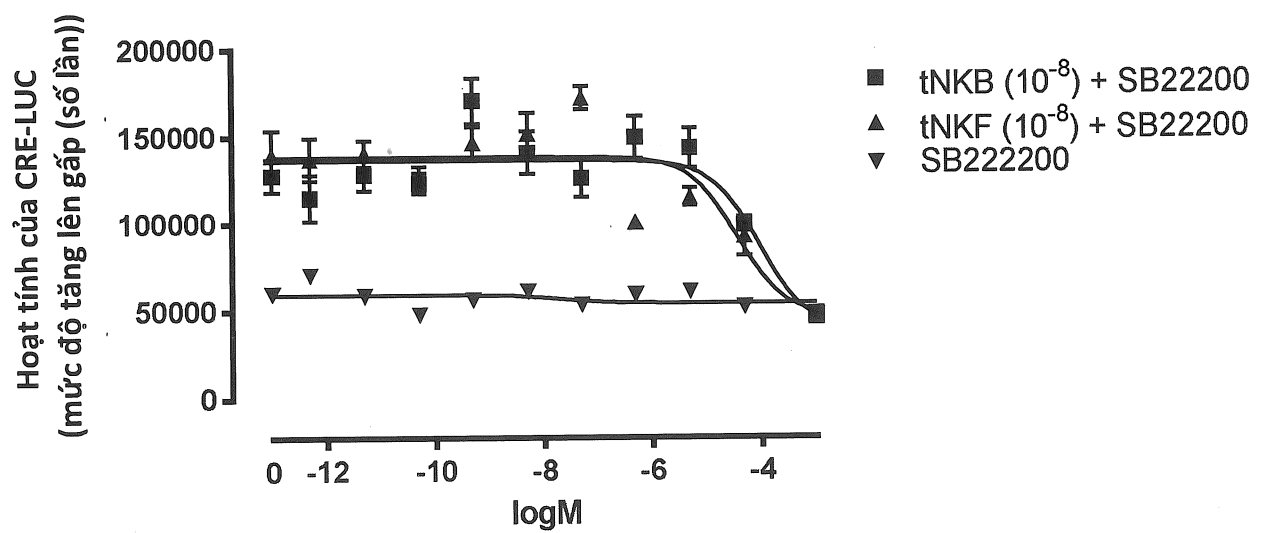


Fig.4A

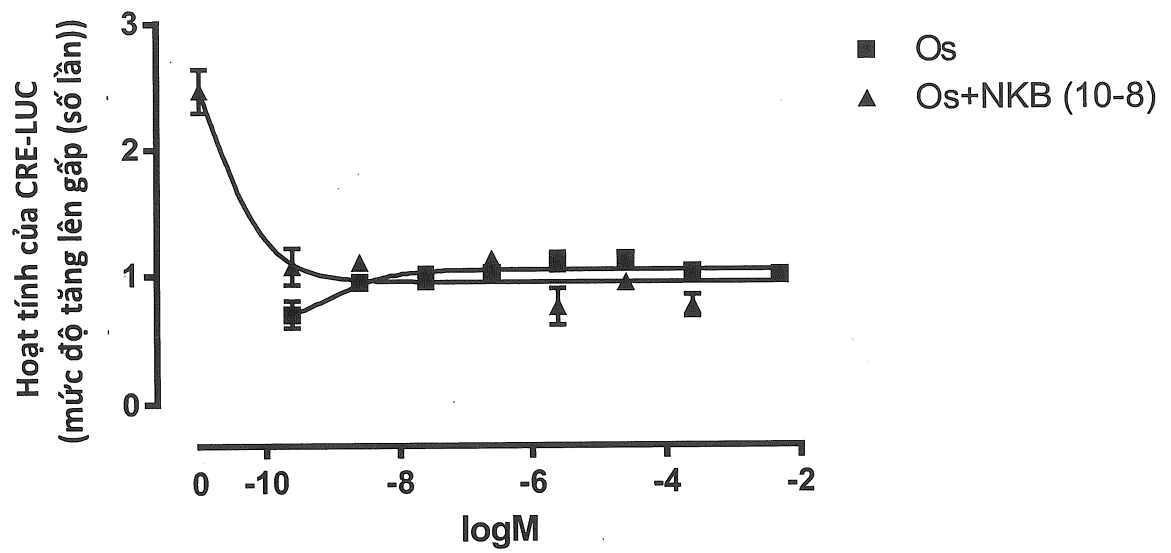


Fig.4B

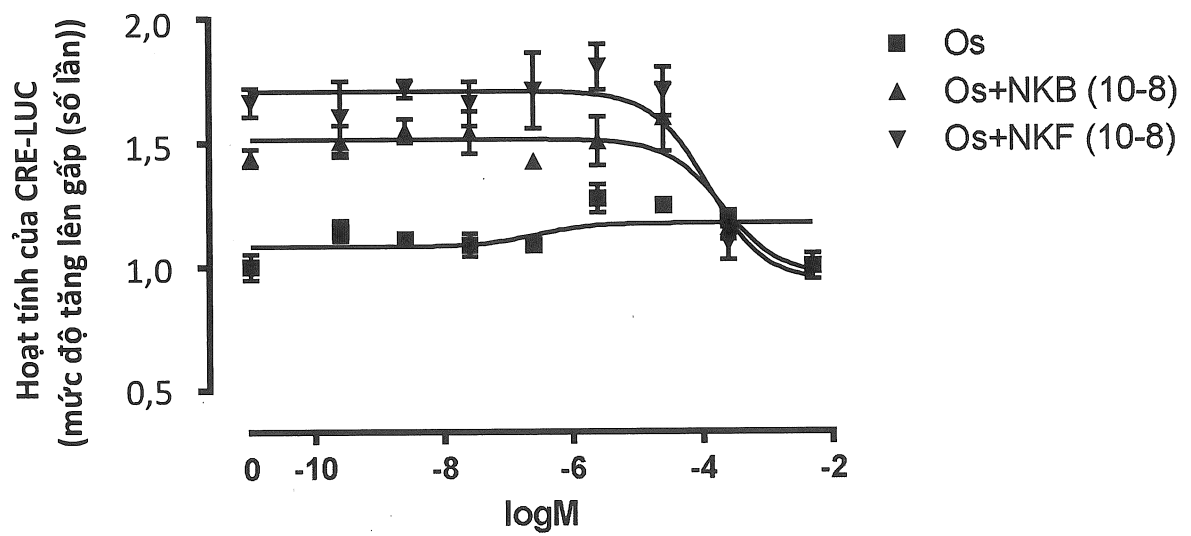


Fig.5A

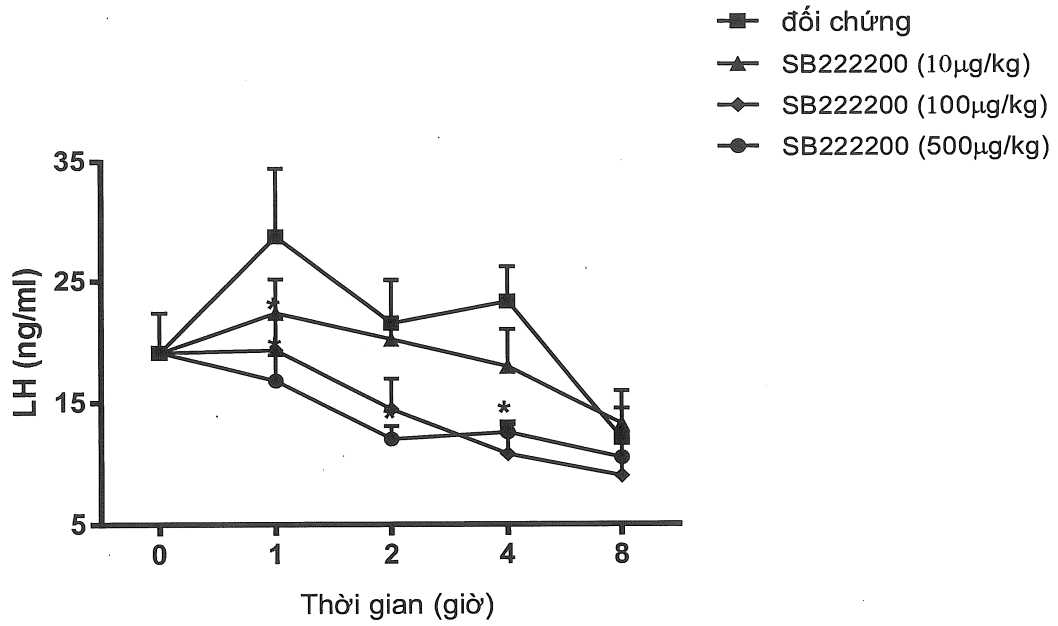


Fig.5B

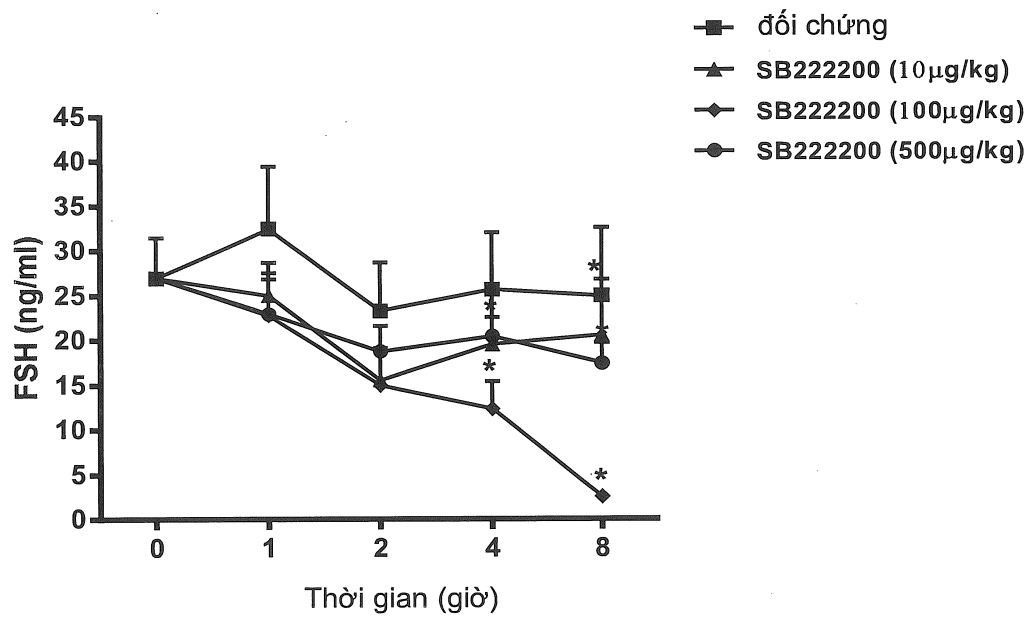


Fig.6

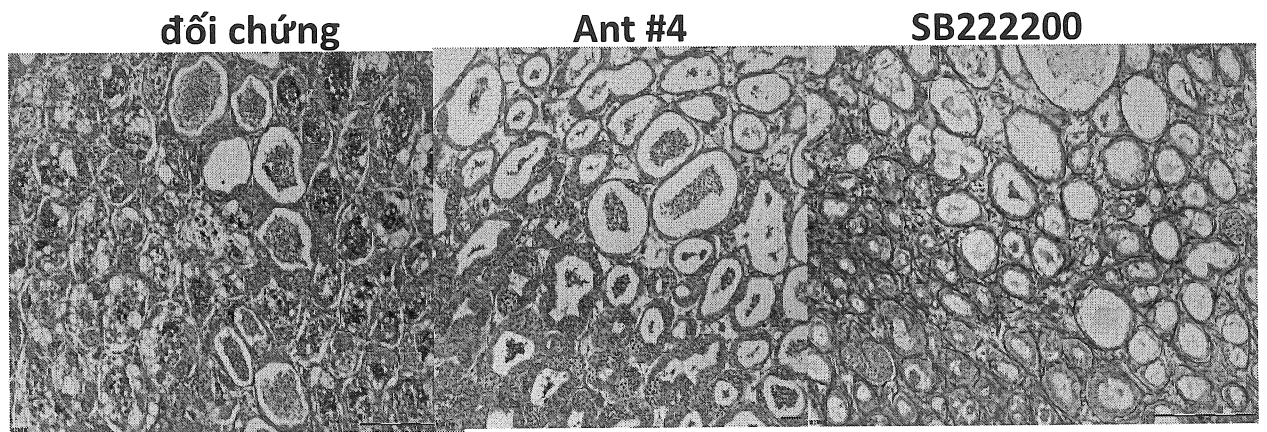


Fig.7



Fig.8

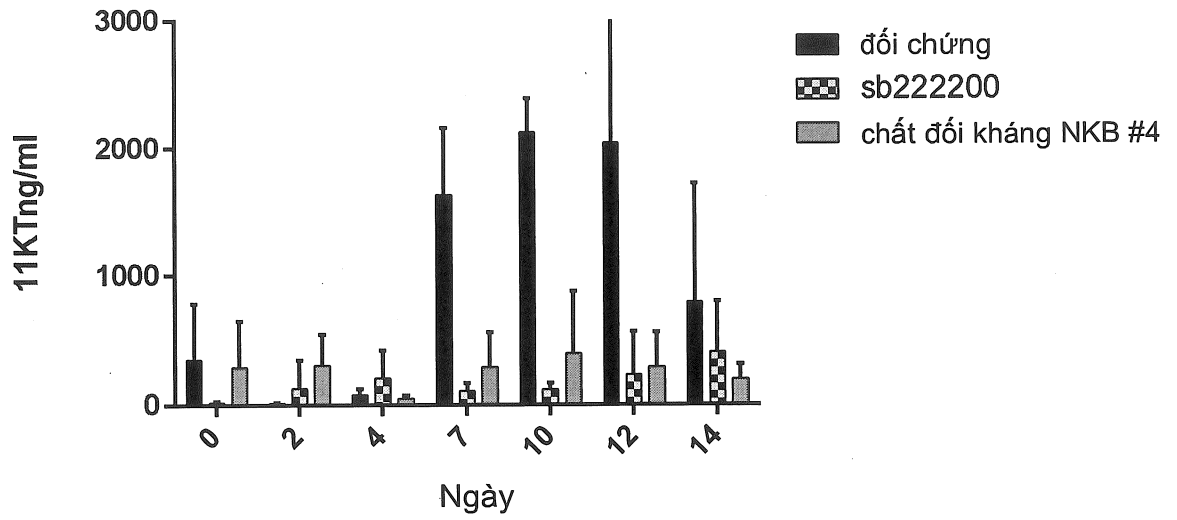


Fig. 9

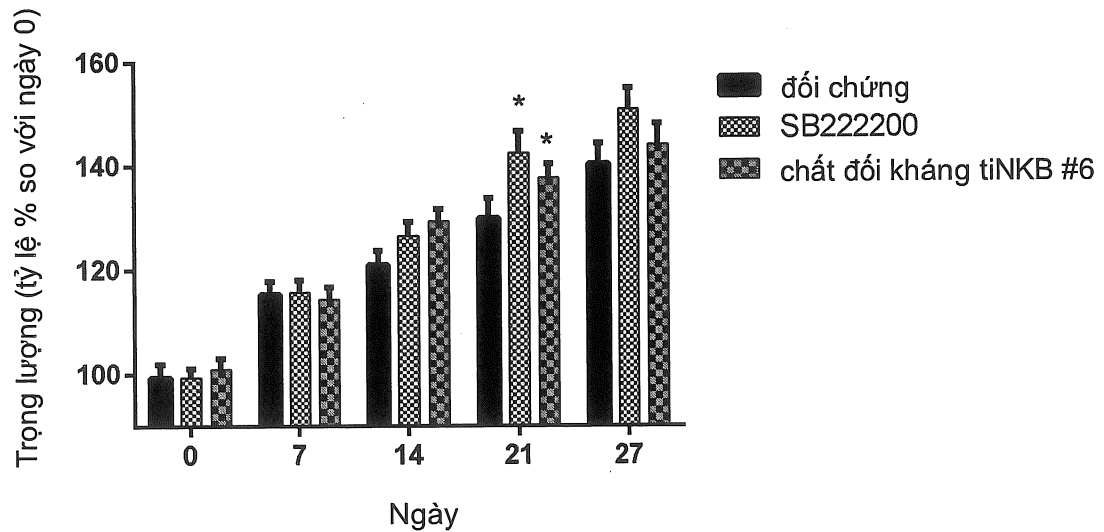


Fig. 10

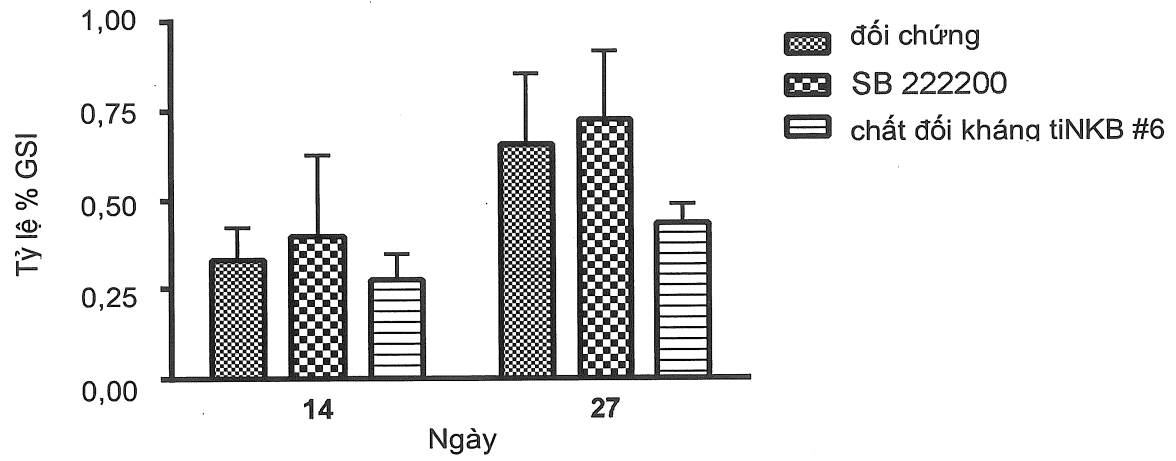


Fig. 11

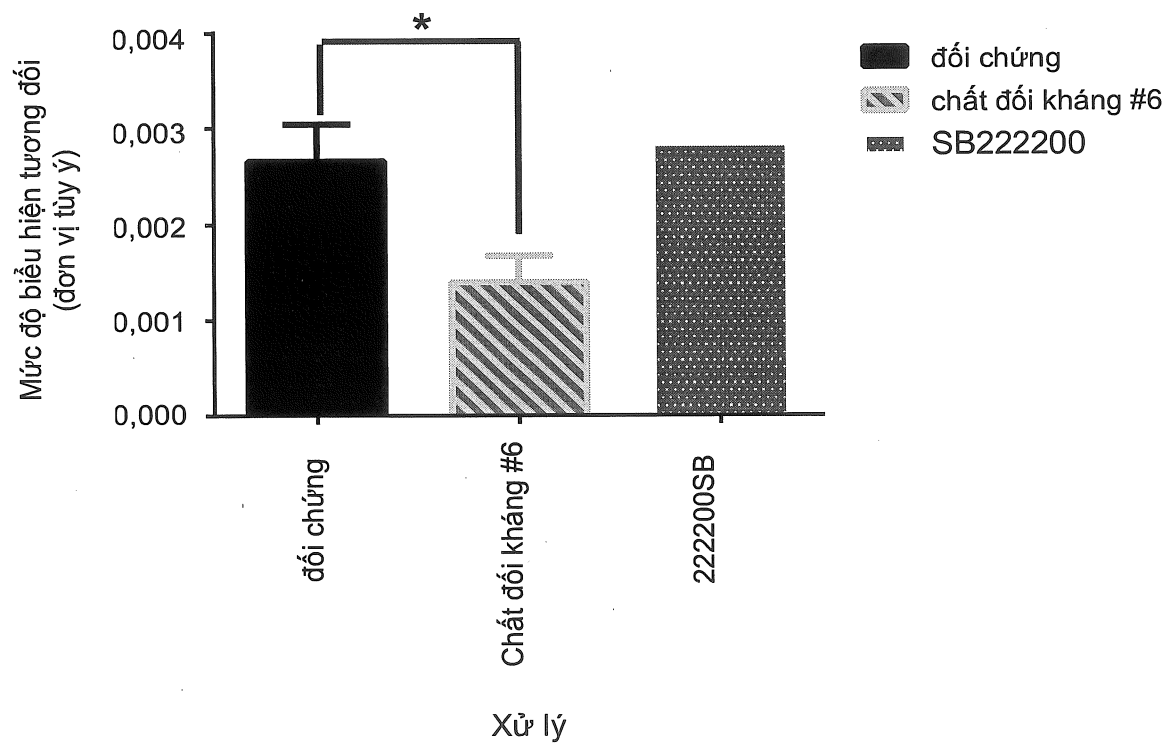


Fig. 12A

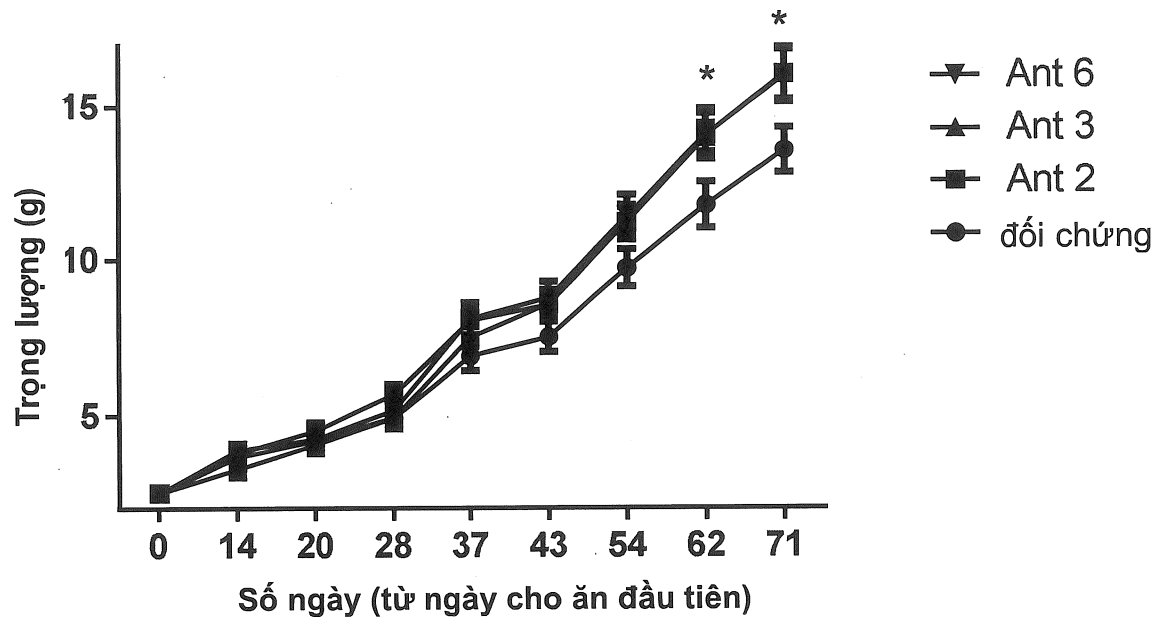


Fig.12B

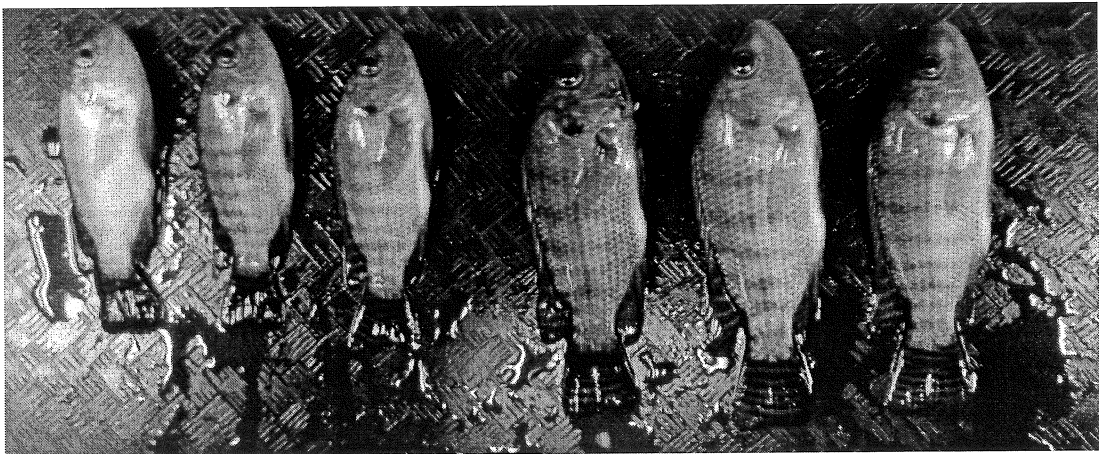


Fig.13

