



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

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

(11)



1-0035680

(51)^{2019.01} A61K 38/10; A61K 47/66; C07K 7/08; (13) B
A61P 35/00; A61P 43/00; C07K 19/00;
A01K 67/027; A61P 15/00

(21) 1-2020-01026

(22) 23/08/2018

(86) PCT/JP2018/031136 23/08/2018

(87) WO/2019/039540 28/02/2019

(30) 2017-161556 24/08/2017 JP

(45) 25/05/2023 422

(43) 25/12/2020 393

(73) FUJITA ACADEMY (JP)

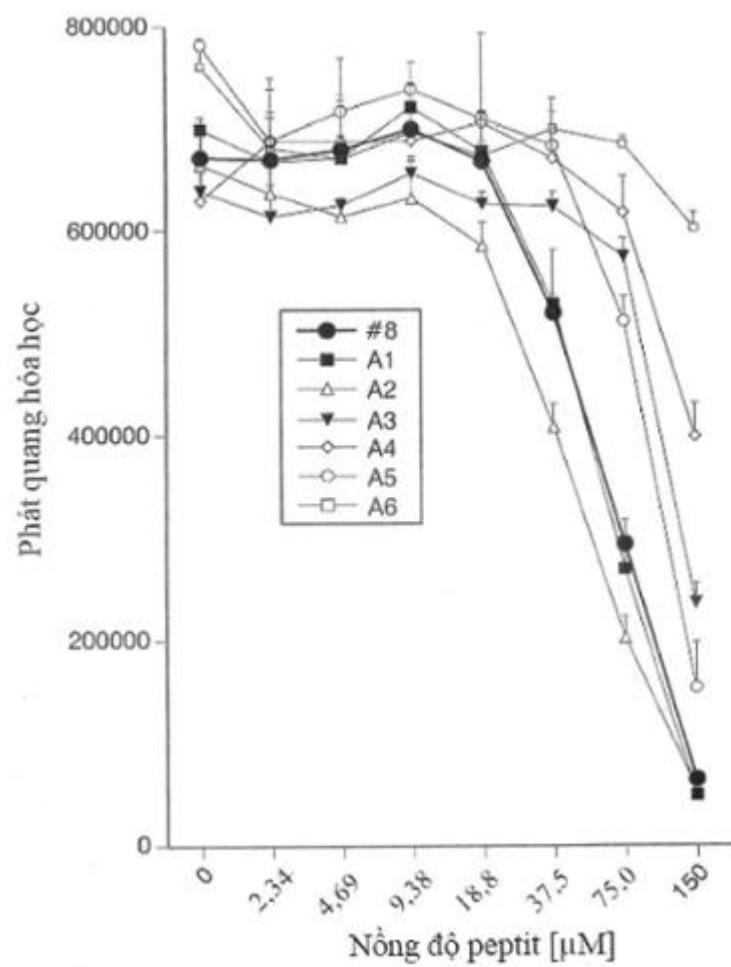
1-98, Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake-shi, Aichi 4701192, Japan

(72) SUGIHARA Kazuhiro (JP); KANAYAMA Naohiro (JP); ONODERA Yuichiro (JP);
SHIBATA Toshiaki (JP); FUKUDA Michiko (JP); NONAKA Motohiro (JP).

(74) Công ty Luật TNHH quốc tế BMVN (BMVN INTERNATIONAL LLC)

(54) CHẤT DIỆT TẾ BÀO

(57) Sáng chế đề xuất chất diệt tế bào có chứa peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 và vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích, trong đó peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 này là peptit chỉ bao gồm các L-axit amin, peptit trong đó, trong các trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1, các axit amin từ thứ 1 đến thứ 14 là các D-axit amin, và các axit amin từ thứ 15 đến thứ 19 là các L-axit amin, peptit trong đó, trong các trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1, các axit amin từ thứ 1 đến thứ 14 này là các L-axit amin, và các axit amin từ thứ 15 đến thứ 19 này là các D-axit amin, hoặc peptit chỉ bao gồm các D-axit amin.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến thuốc peptit thu được bằng cách cảm ứng chọn lọc sự tự chết tế bào (apoptosis) trong tế bào đích. Cụ thể là, sáng chế liên quan đến chất diệt tế bào chứa peptit, phương pháp xác định khả năng mắc bệnh trong đó các tế bào gây bệnh đã biểu hiện kênh nucleotit tuần hoàn beta 3 (cyclic nucleotide-gated channel beta 3 - CNGB3) và dấu ấn sinh học dùng để xác định có mắc bệnh ung thư hay không.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự tự chết tế bào có nghĩa là sự chết tế bào được kiểm soát và được điều chỉnh như cơ chế ức chế sự tăng sinh trong số các sự chết tế bào của các sinh vật nhiều ngăn. Trong các sinh vật nhiều ngăn, sự loại trừ các tế bào không cần thiết hoặc các tế bào có hại xảy ra trong quá trình sinh sản hoặc sao chép được thực hiện bằng cách gây cảm ứng sự tự chết tế bào trong tế bào này. Ngoài ra, bằng cách gây cảm ứng sự tự chết tế bào trong tế bào là nguyên nhân gây bệnh và loại trừ tế bào này, có thể hy vọng cải thiện tình trạng của bệnh này. Theo cách này, các hợp chất có hoạt tính gây cảm ứng sự tự chết tế bào được sử dụng để chữa bệnh. Ví dụ như, bằng cách gây cảm ứng sự tự chết tế bào trong tế bào ung thư, có thể hy vọng làm giảm nhẹ hoặc chữa bệnh ung thư.

Trong trường hợp trong đó việc cảm ứng sự tự chết tế bào được dùng để điều trị bệnh, tính chọn lọc đối với tế bào đích được cảm ứng sự tự chết tế bào là rất quan trọng. Trong trường hợp trong đó tính chọn lọc đích là thấp và sự tự chết tế bào được cảm ứng trong tế bào không phải là tế bào đích, các tác dụng phụ vượt quá các tác dụng chữa bệnh được mong đợi và không thích hợp làm thuốc chữa bệnh nhìn từ quan điểm an toàn. Nếu sự tự chết tế bào có thể được cảm ứng một cách riêng biệt trong tế bào đích, sẽ có được thuốc chữa bệnh hiệu quả trong đó các tác dụng phụ được ngăn chặn một cách đầy đủ.

Bệnh lạc nội mạc tử cung là bệnh trong đó các tế bào nội mạc tử cung tăng sinh tại vị trí không phải là trong khoang nội mạc tử cung. Trong nhiều trường hợp, các tế bào nội mạc tử cung tăng sinh trong phúc mạc hoặc buồng trứng của khung chậu. Các triệu chứng điển hình bao gồm đau bụng kinh (chứng thông kinh) hoặc chứng vô sinh, và trong trường hợp nghiêm trọng, bệnh nhân có thể chịu đau đớn nghiêm trọng hoặc bị ngất. Ngoài ra, với bệnh lạc nội mạc tử cung là tử cung, có trường hợp trong đó xuất hiện ung thư. Các tế bào nội mạc tử cung tăng sinh dưới sự kích thích của các hormon nữ (estrogen). Vì lý do này, sử dụng thuốc chữa bệnh cho bệnh lạc nội mạc tử cung là các thuốc hormon dùng để ức chế sự bài tiết kích tố động dục, ví dụ như, thuốc viên liều thấp, chất đối kháng chọn lọc (chất ức chế chống lại sự tăng sinh chức năng buồng trứng và tế bào nội mạc tử cung), và chất đối kháng GnRH (chất ức chế bài tiết của hormon kích thích nang). Ở đây, do liệu pháp điều trị chỉ có phẫu thuật để loại bỏ tử cung và buồng trứng này, cần phải phát triển

thuốc chữa bệnh với hy vọng điều trị bệnh lạc nội mạc tử cung bằng thuốc này.

Ví dụ như, Công bố đơn đăng ký sáng chế Mỹ số 2016/145308 bộc lộ chế phẩm peptit bao gồm peptit dung hợp giữa peptit Z13 và peptit thoát thể nhân (endosome escape peptide) liên kết đặc hiệu với kênh nucleotit tuần hoàn beta 3 (cyclic nucleotide-gated channel beta 3 - CNGB3) và peptit dung hợp giữa peptit Z13 và peptit gây cảm ứng sự tự chết tế bào. CNGB3 là phân tử được biểu hiện cao đặc biệt trên bề mặt tế bào của tế bào nội mạc tử cung (tế bào nội mạc tử cung xuất hiện không phải trong bệnh lạc nội mạc tử cung) và không được biểu hiện trên bề mặt phúc mạc. Bằng cách kết hợp cả hai peptit trong tế bào nội mạc tử cung bởi nhóm chức peptit Z13 này, có thể gây cảm ứng chọn lọc sự tự chết tế bào trong tế bào nội mạc tử cung. Theo một ví dụ, chế phẩm peptit bao gồm peptit dung hợp giữa peptit Z13 và peptit thoát thể nhân và peptit dung hợp giữa peptit Z13 và peptit gây cảm ứng sự tự chết tế bào được đưa vào phúc mạc của khỉ đầu chó đã mắc bệnh lạc nội mạc tử cung bằng phương pháp soi ổ bụng, sự tự chết tế bào có chọn lọc được cảm ứng chỉ trong tế bào ở chỗ thương tổn của bệnh lạc nội mạc tử cung, và sự tự chết tế bào không bị cảm ứng ở các tế bào bên cạnh khác (tham khảo tài liệu của Sugihara và các đồng tác giả, NATURE COMMUNICATIONS, 2014, Tập 5, Chương số 4478).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất thuốc peptit cảm ứng chọn lọc sự tự chết tế bào trong tế bào đích.

Các tác giả sáng chế phát hiện thấy rằng, kết quả của việc nghiên cứu chuyên sâu để giải quyết vấn đề này là chế phẩm peptit bao gồm peptit dung hợp giữa peptit thoát thể nhân bao gồm trình tự peptit riêng, peptit gây cảm ứng sự tự chết tế bào bao gồm trình tự peptit riêng, và peptit Z13 có hiệu quả cao xét về tính chọn lọc cao hơn và có thể cảm ứng sự tự chết tế bào trong tế bào nội mạc tử cung biểu hiện kênh nucleotit tuần hoàn beta 3 (cyclic nucleotide-gated channel beta 3 - CNGB3), so với chế phẩm peptit bao gồm peptit dung hợp giữa peptit Z13 và peptit thoát thể nhân và peptit dung hợp giữa peptit Z13 và peptit gây cảm ứng sự tự chết tế bào. Ngoài ra, các tác giả sáng chế còn phát hiện thấy rằng CNGB3 được biểu hiện không chỉ trong nội mạc tử cung và vòm mạc mà còn trong một số tế bào ung thư, nhờ đó hoàn thiện sáng chế.

Tức là, sáng chế đề xuất chất diệt tế bào, mô hình động vật bệnh lạc nội mạc tử cung dưới đây, và tương tự.

[1] Chất diệt tế bào có chứa peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 và vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích.

[2] Chất diệt tế bào theo mục [1], trong đó phân tử đích này là phân tử có trên bề mặt của tế bào hoặc mô.

[3] Chất diệt tế bào theo mục [1] hoặc mục [2], trong đó peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 này là peptit chỉ bao gồm các L-axit amin,

peptit trong đó, trong trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1, các axit amin từ thứ 1 đến thứ 14 là các D-axit amin, và các axit amin từ thứ 15 đến thứ 19 là các L-axit amin, peptit trong đó, trong trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1, các axit amin từ thứ 1 đến thứ 14 này là các L-axit amin, và các axit amin từ thứ 15 đến thứ 19 này là các D-axit amin, hoặc peptit chỉ bao gồm các D-axit amin.

[4] Chất diệt tế bào theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [3], trong đó vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích này là peptit hoặc protein, và peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 này và vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích này được liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp với nhau.

[5] Chất diệt tế bào theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [4], trong đó phân tử đích này là CNGB3 hoặc annexin I.

[6] Chất diệt tế bào theo mục [1], trong đó vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích là peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 2, và vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích này được liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp với đoạn phía sau của peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 này.

[7] Chất diệt tế bào theo mục [1], trong đó vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích này là peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 3, và peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 này được liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp với đoạn phía sau của vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích này.

[8] Chất diệt tế bào theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7], trong đó chất này các tác nhân chữa bệnh do sự tăng sinh bất thường của tế bào.

[9] Chất diệt tế bào theo mục [8], trong đó bệnh này là bệnh lạc nội mạc tử cung hoặc bệnh ung thư.

[10] Mô hình động vật bệnh lạc nội mạc tử cung, trong đó tế bào biểu hiện quá mức CNGB3 được đưa gen mã hóa CNGB3 vào được cấy trong ổ phúc mạc. [11] Phương pháp xác định khả năng mắc bệnh của bệnh trong đó các tế bào gây bệnh đã biểu hiện CNGB3, bao gồm: đo CNGB3 trong exosome được thu thập từ đối tượng động vật, và so sánh giá trị đo thu được này với giá trị chuẩn được thiết lập trước để xác định khả năng đối tượng động vật này đã mắc bệnh này chưa.

[12] Phương pháp xác định khả năng mắc bệnh theo mục [11], trong đó xác định rằng đối tượng động vật này có khả năng mắc bệnh này cao nếu giá trị đo này lớn hơn giá trị chuẩn này.

[13] Phương pháp xác định khả năng mắc bệnh theo mục [11] hoặc [12], trong đó exosome này được phân lập từ máu được thu thập từ đối tượng động vật này.

[14] Phương pháp xác định khả năng mắc bệnh theo mục bất kỳ trong số các mục từ [11] đến [13], trong đó đo CNGB3 bằng cách sử dụng peptit bao gồm trình tự axit amin

được biểu diễn bởi SEQ ID số: 2.

[15] Phương pháp xác định khả năng mắc bệnh theo mục bất kỳ trong số các mục từ [11] đến [14], trong đó đối tượng động vật này là người.

[16] Phương pháp xác định khả năng mắc bệnh theo mục bất kỳ trong số các mục từ [11] đến [15], trong đó bệnh này là bệnh lạc nội mạc tử cung hoặc bệnh ung thư.

[17] Dấu ấn sinh học bao gồm một lượng CNGB3 trong exosome và được dùng để xác định có mắc bệnh lạc nội mạc tử cung hoặc bệnh ung thư hay không.

Chất diệt tế bào theo sáng chế có thể cảm ứng rất hiệu quả sự tự chết tế bào trong tế bào đích. Vì lý do này, chất diệt tế bào này đặc biệt hiệu quả để làm tác nhân chữa bệnh cho bệnh do sự tăng sinh bất thường của tế bào của bệnh lạc nội mạc tử cung hoặc bệnh ung thư. Ngoài ra, mô hình động vật bệnh lạc nội mạc tử cung theo sáng chế hữu dụng cho các thử nghiệm hiệu quả của các hợp chất ứng viên làm thuốc chữa bệnh lạc nội mạc tử cung. Ngoài ra, bằng phương pháp đánh giá sự mắc bệnh và dấu ấn sinh học theo sáng chế, có thể đánh giá một cách thuận tiện và hiệu quả khả năng mắc bệnh của bệnh biểu hiện rõ ràng CNGB3 chẳng hạn như bệnh lạc nội mạc tử cung và bệnh ung thư.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là hình vẽ minh họa kết quả đo cường độ phát quang (RLU) của dung dịch phản ứng được xử lý bằng mỗi peptit trong Ví dụ Tham khảo 1.

FIG. 2 là hình vẽ minh họa kết quả đo cường độ phát quang (RLU) của dung dịch phản ứng được xử lý bằng mỗi peptit trong Ví dụ 1.

FIG. 3 là hình vẽ minh họa kết quả đo cường độ phát quang (RLU) của dung dịch phản ứng được xử lý bằng mỗi peptit trong số peptit 8 và các peptit từ A1 đến A6 trong Ví dụ 2. FIG. 4 là hình vẽ minh họa kết quả đo cường độ phát quang (RLU) của dung dịch phản ứng được xử lý bằng mỗi peptit trong số peptit 8 và các peptit từ B1 đến B7 trong Ví dụ 2.

FIG. 5 là hình vẽ minh họa kết quả đo cường độ phát quang (RLU) của dung dịch phản ứng được xử lý bằng mỗi peptit trong Ví dụ 3.

FIG. 6 là hình vẽ minh họa kết quả đo của của một số tế bào sống của các tế bào A431-CNGB3-myc được xử lý bằng peptit A2 trong Ví dụ 4.

FIG. 7 là ảnh nhuộm màu trong đó thử nghiệm Apop-Tag và nhuộm màu nhân được thực hiện trên các tế bào A431-CNGB3-myc được xử lý bằng peptit A2 này trong Ví dụ 4.

FIG. 8 là hình vẽ minh họa kết quả đo cường độ phát quang (RLU) của phúc mạc của mô hình chuột mắc bệnh lạc nội mạc tử cung trong đó peptit A2 này được đưa vào trong ổ phúc mạc một lần trong Ví dụ 5.

FIG. 9 là hình vẽ minh họa kết quả đo cường độ phát quang (RLU) của phúc mạc

của mô hình chuột mắc bệnh lạc nội mạc tử cung trong đó peptit A2 này được đưa vào trong ổ phúc mạc nhiều lần trong Ví dụ 5.

FIG. 10 là hình vẽ minh họa kết quả đo lượng ATP tương đối (%) của các tế bào A431-CNGB3-myc được xử lý bằng mỗi peptit trong Ví dụ 6.

FIG. 11 là hình vẽ minh họa kết quả đo lượng ATP tương đối (%) của các tế bào Ishikawa được xử lý bằng mỗi peptit trong Ví dụ 6.

FIG. 12 là hình vẽ minh họa kết quả đo lượng ATP tương đối (%) của các tế bào SNG-II được xử lý bằng mỗi peptit trong Ví dụ 6.

FIG. 13 là hình vẽ minh họa kết quả đo lượng ATP tương đối (%) của các tế bào Hec-1A được xử lý bằng mỗi peptit trong Ví dụ 6.

FIG. 14 là hình vẽ minh họa kết quả đo lượng ATP tương đối (%) của các tế bào RL95-2 được xử lý bằng mỗi peptit trong Ví dụ 6.

FIG. 15 là hình vẽ minh họa kết quả đo theo thời gian tỷ lệ tăng (%) của số photon của chuột mắc bệnh ung thư đã được đưa IF7 (RR)-(K+H) peptit vào trong Ví dụ 8.

FIG. 16 là hình vẽ minh họa kết quả đo theo thời gian tỷ lệ tăng (%) của thể tích khối u của chuột mắc bệnh ung thư đã được đưa IF7 (RR)-(K+H) peptit vào trong Ví dụ 8.

Mô tả chi tiết sáng chế

<Chất diệt tế bào>

Chất diệt tế bào theo sáng chế có chứa peptit bao gồm trình tự axit amin (KLAKLAKKLAKLAKHLAHL) được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 (sau đây, được gọi là “peptit thực hiện”) và vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích. Peptit thực hiện này là peptit trong đó peptit có hoạt tính cảm ứng sự tự chết tế bào và peptit có hoạt tính thoát khỏi endosome được liên kết ngẫu nhiên. Chất diệt tế bào theo sáng chế liên kết với phân tử đích qua vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích này và được đưa vào trong tế bào đích này bởi quá trình nhập bào. Sau đó, do sự phá hủy màng endosome bởi tác động của vị trí peptit có hoạt tính thoát khỏi endosome, chất diệt tế bào có trong endosome đã được đưa vào tế bào đích này được giải phóng trong tế bào chất của tế bào đích này. Chất diệt tế bào này được giải phóng trong tế bào chất cảm ứng sự tự chết tế bào của tế bào đích này bằng cách can thiệp vào màng ty lạp thể bởi sự tác động của vị trí peptit có hoạt tính cảm ứng sự tự chết tế bào.

Chất diệt tế bào theo sáng chế bao gồm tất cả nhóm chức peptit có hoạt tính cảm ứng sự tự chết tế bào, nhóm chức peptit có hoạt tính thoát khỏi endosome, và vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích trong phân tử. Vì lý do này, có thể cảm ứng rất hiệu quả sự tự chết tế bào trong tế bào đích, so với mỗi chế phẩm peptit độc lập bao gồm peptit trong đó peptit liên kết chọn lọc với phân tử đích được liên kết với peptit có hoạt tính cảm ứng sự tự chết tế bào và peptit trong đó peptit liên kết chọn lọc với phân tử đích được liên kết với

peptit có hoạt tính thoát khỏi endosome.

Theo sáng chế và bản mô tả sáng chế này, “tế bào đích” là đối tượng tế bào được cảm ứng sự tự chết tế bào. “Phân tử đích” là phân tử có trên bề mặt của đối tượng tế bào được cảm ứng sự tự chết tế bào hoặc trên bề mặt mô trên đó có tế bào này, và là phân tử liên kết chọn lọc với chất diệt tế bào theo sáng chế.

Như được bộc lộ trong Công bố đơn đăng ký sáng chế Mỹ số 2016/145308, peptit (sau đây, được gọi là “peptit KLAKE”) bao gồm trình tự axit amin (sau đây, được gọi là “trình tự KLAKE”) bao gồm 4 lần lặp axit amin KLAKE có tác động (hoạt tính cảm ứng sự tự chết tế bào) cảm ứng sự tự chết tế bào bằng cách can thiệp vào màng ty lạp thể. Ngoài ra, peptit (sau đây, được gọi là “peptit HLAH”) bao gồm trình tự axit amin (sau đây, được gọi là “trình tự HLAH”) bao gồm 4 lần lặp axit amin HLAH có tác động (hoạt tính thoát khỏi endosome) phá hủy màng endosome này. Peptit trong đó peptit KLAKE này được liên kết với peptit HLAH này có hoạt tính thoát khỏi endosome và hoạt tính cảm ứng sự tự chết tế bào. Tuy nhiên, cường độ hoạt tính tương ứng bị ảnh hưởng bởi độ dài của các axit amin trong mỗi peptit và thứ tự của liên kết này. Cả peptit trong đó peptit HLAH này được liên kết với đoạn phía sau (đầu tận cùng C) của peptit KLAKE này và peptit trong đó peptit KLAKE này được liên kết với đoạn phía sau (đầu tận cùng C) của peptit HLAH này có hoạt tính thoát khỏi endosome và hoạt tính cảm ứng sự tự chết tế bào, nhưng peptit trong đó peptit HLAH này được liên kết với đoạn phía sau (đầu tận cùng C) của peptit KLAKE này có hoạt tính cảm ứng sự tự chết tế bào cao.

Peptit thực hiện này bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 là peptit trong đó trình tự HLAH bao gồm 5 axit amin được liên kết với đoạn phía sau của trình tự KLAKE này bao gồm 14 axit amin. Tức là, trong trình tự axit amin của SEQ ID số: 1, các axit amin từ thứ 1 đến thứ 14 này là các vị trí có hoạt tính cảm ứng sự tự chết tế bào và các axit amin từ thứ 15 đến thứ 19 này là các vị trí có hoạt tính thoát khỏi endosome. Để thu được hoạt tính cảm ứng sự tự chết tế bào cao nhất trong trường hợp được đưa vào tế bào đích này, peptit thực hiện này là peptit trong đó độ dài của trình tự KLAKE này, độ dài của trình tự HLAH này, và thứ tự liên kết của trình tự KLAKE này và trình tự HLAH này được tối ưu hóa. Do chất diệt tế bào này có peptit thực hiện này, chất diệt tế bào theo sáng chế có hoạt tính cảm ứng sự tự chết tế bào rất cao.

Peptit thực hiện có trong chất diệt tế bào theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là peptit này là peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1, có thể là peptit bao gồm L-axit amin, có thể là peptit bao gồm D-axit amin, hoặc có thể là peptit bao gồm L-axit amin và D-axit amin. Do tính ổn định cao trong endosome và thu được hoạt tính cảm ứng sự tự chết tế bào cao hơn, ưu tiên peptit thực hiện này là peptit bao gồm ít nhất một số D-axit amin, ít nhất một trong số trình tự KLAKE này (trong trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1, các axit amin từ thứ 1 đến thứ 14 này) và trình tự HLAH này (trong trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1, các axit amin từ thứ

15 đến thứ 19 này), ưu tiên hơn đối với peptit bao gồm D-axit amin, và được ưu tiên đặc biệt trong tất cả là peptit bao gồm D-axit amin.

Trong chất diệt tế bào theo sáng chế, peptit thực hiện này bao gồm vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích và trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 có thể liên kết trực tiếp, hoặc có thể liên kết gián tiếp qua cầu nối. Cầu nối này không bị giới hạn cụ thể, và các ví dụ về cầu nối này bao gồm peptit có từ 1 đến 20 axit amin, mạch đường, polyetylen glycol, polyolefin, và tương tự. Do việc tổng hợp là tương đối dễ, các chất trong đó vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích là peptit hoặc protein, và liên kết trực tiếp với peptit thực hiện này hoặc qua peptit có từ 1 đến 20 axit amin được ưu tiên làm chất diệt tế bào theo sáng chế. Ngoài ra, trong chất diệt tế bào theo sáng chế, vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích có thể được liên kết với phía đầu tận cùng N của peptit thực hiện bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1, hoặc có thể được liên kết với phía đầu tận cùng C miễn là các tính chất liên kết với phân tử đích này không bị cản trở.

Vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích trong chất diệt tế bào theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và được xác định theo phân tử đích này. Vị trí này có thể là peptit hoặc protein, có thể là oligo nucleotit hoặc axit nucleic, có thể là mạch đường, có thể là lipit hoặc có thể là hợp chất phân tử thấp.

Phân tử đích liên kết chọn lọc với chất diệt tế bào theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là phân tử đích này là phân tử có trên bề mặt của tế bào đích hoặc mô được cảm ứng sự tự chết tế bào, và có thể là protein, có thể là mạch đường hoặc có thể là lipit.

Tính chọn lọc của chất diệt tế bào theo sáng chế trở nên cao, và do đó các tác dụng phụ giảm trong trường hợp được sử dụng làm tác nhân chữa bệnh cho các bệnh khác nhau. Từ đó, do phân tử đích này liên kết chọn lọc với chất diệt tế bào theo sáng chế, phân tử trong đó lượng biểu hiện trên bề mặt tế bào của tế bào đích hoặc bề mặt mô bao gồm tế bào đích này là rất lớn so với lượng biểu hiện trong nhiều tế bào hoặc mô khác được ưu tiên, và phân tử được biểu hiện rõ ràng trên bề mặt của tế bào đích này hoặc bề mặt mô bao gồm tế bào đích này được ưu tiên hơn.

Ví dụ như, CNGB3 là protein màng được biểu hiện cao chỉ trong nội mạc tử cung và võng mạc trong các mô bình thường. Sự tồn tại khu trú của CNGB3 trong các mô bình thường là rất không đối xứng, và điều đó chỉ thể hiện rằng biểu hiện vừa phải được xác nhận trong các thể tạng quả và biểu hiện yếu được xác nhận trong tủy xương, đám rối màng mạch, vòi trứng, mắt, buồng trứng, và các tinh hoàn. Vì lý do này, chất diệt tế bào có CNGB3 là phân tử đích trong chất diệt tế bào theo sáng chế là chất diệt tế bào có khả năng cảm ứng đặc biệt sự tự chết tế bào trong nội mạc tử cung hoặc võng mạc, và hữu dụng để làm tác nhân chữa bệnh cho các bệnh nội mạc tử cung hoặc võng mạc. Cụ thể, do sự tự chết tế bào không được cảm ứng trong các tế bào bình thường trong ổ phúc mạc hoặc khung xương chậu, và sự tự chết tế bào có thể được cảm ứng chọn lọc trong các tế bào nội mạc tử cung, rất thích hợp để làm tác nhân chữa bệnh cho bệnh lạc nội mạc tử cung.

Ngoài ra, CNGB3 cũng biểu hiện tương đối mạnh trong các tế bào ung thư khác nhau. Vì lý do này, chất diệt tế bào có CNGB3 là phân tử đích trong chất diệt tế bào theo sáng chế có tính chọn lọc cao đối với tế bào ung thư biểu hiện CNGB3 và hữu dụng để làm thuốc chống ung thư trong đó các tác dụng phụ được ngăn chặn. Các ví dụ về các bệnh ung thư biểu hiện CNGB3 bao gồm ung thư tử cung, ung thư cổ tử cung, ung thư khoang xương chậu, ung thư buồng trứng, ung thư vú, ung thư thành phúc mạc, u mạc nổi lớn, ung thư thực quản, ung thư dạ dày, ung thư ruột non, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư ruột thừa, ung thư túi mật, ung thư tụy, ung thư gan, ung thư lá lách, ung thư thận, ung thư lưỡi, ung thư họng, ung thư mũi, ung thư tuyến mang tai, ung thư tuyến giáp, u lympho ác tính, u xương, ung thư da, ung thư phổi, ung thư trung thất, ung thư tinh hoàn, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư bàng quang, u não, và các bệnh tương tự. Ngay cả khi các tế bào ung thư thu được từ cùng các loại mô bao gồm cả các tế bào ung thư biểu hiện CNGB3 và các tế bào ung thư không biểu hiện CNGB3. Vì lý do này, trong trường hợp trong đó chất diệt tế bào có CNGB3 là phân tử đích trong chất diệt tế bào theo sáng chế được sử dụng làm thuốc chống ung thư, ưu tiên kiểm tra trước bằng sinh thiết và phương pháp tương tự mà tế bào ung thư đích là tế bào biểu hiện CNGB3.

Trong trường hợp trong đó CNGB3 được sử dụng làm phân tử đích, các ví dụ về vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích này bao gồm peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 2 (VRRAXNXPG; X thể hiện axit amin tùy chọn có trong tự nhiên), peptit bao gồm trình tự axit amin thu được bằng cách biến đổi một phần trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 2 (sau đây, peptit này được gọi là “peptit liên kết CNGB3”), và tương tự (Công bố đơn đăng ký sáng chế Mỹ số 2016/145308). Các ví dụ về peptit bao gồm trình tự axit amin thu được bằng cách biến đổi một phần trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 2 bao gồm peptit trong đó 1, 2 hoặc 3 axit amin có trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 2 được xóa bỏ, được thay thế, hoặc được bổ sung thêm vào và giữ được các tính chất liên kết với CNGB3; peptit có sự tương đồng trình tự với trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 2 ít nhất là 75% hoặc nhiều hơn, ưu tiên là 85% hoặc nhiều hơn, và ưu tiên hơn là 90% hoặc nhiều hơn và giữ được các tính chất liên kết với CNGB3; và tương tự. Các ví dụ cụ thể về peptit liên kết CNGB3 này bao gồm peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 3 (VRRADNRPG) (sau đây, được gọi là “Peptit Z13”), peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 4 (VRRANRPG), peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 5 (VRRANNLPG), peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 6 (VRRANNRPG), và tương tự.

Từ quan điểm hoạt tính cảm ứng sự tự chết tế bào mạnh hơn trong tế bào biểu hiện CNGB3, do chất diệt tế bào này có CNGB3 là phân tử đích, peptit trong đó peptit Z13 này và peptit thực hiện này được liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp qua cầu nối được ưu tiên, peptit trong đó peptit Z13 này và peptit thực hiện này được liên kết trực tiếp hoặc qua peptit bao gồm từ 1 đến 20 axit amin được ưu tiên hơn, peptit trong đó peptit Z13 này được

liên kết trực tiếp với đầu tận cùng C của peptit thực hiện này hoặc qua từ 1 đến 20 axit amin được ưu tiên hơn nữa, peptit trong đó đầu tận cùng C của peptit thực hiện này được liên kết trực tiếp với đầu tận cùng N của peptit Z13 này (SEQ ID số: 26: KLAKLAKKLAKLAHLVRRADNRPG) thậm chí còn được ưu tiên hơn nữa, và peptit trong đó đầu tận cùng C của peptit thực hiện này chỉ bao gồm các D-axit amin được liên kết trực tiếp với đầu tận cùng N của peptit Z13 này chỉ bao gồm tất cả các L-axit amin được ưu tiên đặc biệt.

Ngoài ra, annexin I là protein màng được biểu hiện trong tế bào chất trong các tế bào nội mô mạch bình thường, nhưng được biểu hiện rõ ràng trên phía dòng máu của các tế bào nội mô mạch của các mạch máu mới (mạch máu khối u mới) trong các mô khối u ác tính. Phân tử liên kết chọn lọc với annexin I này được đưa vào trong cơ thể sống được đưa vào các tế bào nội mô mạch này của các mạch máu khối u mới qua liên kết với annexin I được biểu hiện trên phía dòng máu của các mạch máu khối u mới này trong các mô khối u ác tính này. Phân tử được đưa vào các tế bào nội mô mạch này được vận chuyển từ phía tế bào đỉnh đến tế bào nền bởi sự vận chuyển túi và được đưa vào các tế bào khe. Phân tử đã được đưa vào được lan truyền trong các tế bào khe và đi vào các tế bào ung thư. Vì lý do này, chất diệt tế bào có annexin I là phân tử đích trong chất diệt tế bào theo sáng chế là chất diệt tế bào có khả năng cảm ứng sự tự chết tế bào trong tế bào ung thư, và hữu dụng để làm thuốc chống ung thư. Chất diệt tế bào có annexin I là phân tử đích được đưa một cách đặc hiệu vào các tế bào nội mô mạch này của các mạch máu khối u mới, và trong quá trình vận chuyển túi trong các tế bào nội mô mạch này hoặc trong quá trình vận chuyển túi trong các tế bào khối u đã lấy, màng nội mô bị phá hủy bởi hoạt động của nhóm chức peptit HLAH và được giải phóng vào tế bào chất. Sau đó, do hoạt động của nhóm chức peptit KLAK, các tế bào đã được đưa chất diệt tế bào này vào bị tiêu diệt. Trong trường hợp trong đó chất diệt tế bào có annexin I là phân tử đích được sử dụng làm thuốc chống ung thư, các bệnh ung thư là các đối tượng điều trị không bị giới hạn cụ thể, và có thể được sử dụng cho bệnh ung thư như được mô tả làm ví dụ trên đây.

Trong trường hợp có annexin I là phân tử đích, các ví dụ về vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích bao gồm peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 7 (IFLLWQR) (sau đây, được gọi là “peptit IF7”) và peptit bao gồm trình tự axit amin trong đó nhóm chức có trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 7 được biến đổi (sau đây, peptit này được gọi là “peptit liên kết annexin I”). Các ví dụ về peptit bao gồm trình tự axit amin trong đó nhóm chức có trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 7 được biến đổi bao gồm peptit trong đó một, hai hoặc ba axit amin có trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 7 được xóa bỏ, được thay thế, hoặc được bổ sung thêm vào và peptit này giữ được khả năng liên kết với annexin I hoặc peptit có sự tương đồng trình tự với trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 7 ít nhất là 70% hoặc nhiều hơn, và ưu tiên là 85% hoặc nhiều hơn và giữ được khả năng liên kết với annexin I.

Từ quan điểm có hoạt tính cảm ứng sự tự chết tế bào mạnh hơn đối với các tế bào

ung thư, ưu tiên chất diệt tế bào có annexin I là phân tử đích này là chất diệt tế bào trong đó peptit IF7 và peptit thực hiện này được liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp qua cầu nối, ưu tiên hơn đối với peptit trong đó peptit IF7 này và peptit thực hiện này được liên kết trực tiếp hoặc qua peptit bao gồm từ 1 đến 20 axit amin, còn ưu tiên hơn nữa đối với peptit trong đó peptit thực hiện này được liên kết trực tiếp với đầu tận cùng C của peptit IF7 này hoặc qua peptit bao gồm từ 1 đến 20 axit amin, còn ưu tiên hơn nữa đối với peptit trong đó peptit thực hiện này được liên kết với đầu tận cùng C của peptit IF7 này qua peptit bao gồm từ 1 đến 5 axit amin, và ưu tiên đặc biệt đối với peptit trong đó đầu tận cùng C của peptit IF7 này chỉ bao gồm các L-axit amin được liên kết với đầu tận cùng N của peptit thực hiện này chỉ bao gồm các D-axit amin qua peptit bao gồm từ 1 đến 5 L-axit amin. Các ví dụ về peptit trong đó đầu tận cùng C của peptit IF7 này được liên kết với đầu tận cùng N của peptit thực hiện này qua peptit bao gồm từ 1 đến 5 axit amin bao gồm trình tự axit amin (IFLLWQRRRLAKLAKKLAKHLAHL) được biểu diễn bởi SEQ ID số: 40.

Trong trường hợp trong đó chất diệt tế bào theo sáng chế được sử dụng làm thuốc chữa bệnh, đường sử dụng không bị giới hạn cụ thể, và được xác định một cách thích hợp phụ thuộc vào tế bào đích này và các mô chứa các tế bào đích này. Các ví dụ về đường sử dụng chất diệt tế bào theo sáng chế bao gồm đường miệng, đường dùng tĩnh mạch, đường dùng trong màng bụng, đường dùng thực quản, và tương tự.

Chất diệt tế bào theo sáng chế có thể được bào chế dưới dạng thuốc dạng rắn dùng qua đường miệng chẳng hạn như bột, hạt nhỏ, viên nang, viên nén, và thuốc nhai được, thuốc dạng lỏng dùng qua đường miệng chẳng hạn như thuốc dạng dung dịch, và dạng xiro, thuốc tiêm, thuốc thực, thuốc phun, miếng dán, và thuốc mỡ bằng phương pháp thông thường.

Chất diệt tế bào theo sáng chế được bào chế bằng cách trộn kỹ với tá dược, chất kết dính, chất làm trơn, chất phân rã, chất làm lỏng, dung môi, chất hòa tan, chất đệm, chất tạo hỗn dịch, chất nhũ tương, chất tạo sự đẳng trương, chất ổn định, chất kháng khuẩn, chất chống oxy hóa, chất tạo hương vị, chất tạo màu, và tương tự, tùy thuộc vào yêu cầu bào chế.

Các ví dụ về tá dược này bao gồm các sacarit chẳng hạn như lactoza, glucoza, và D-manitol, các xenluloza chẳng hạn như tinh bột và xenluloza tinh thể, các rượu đường chẳng hạn như erythritol, sorbitol, và xylitol, đicacbonat, canxi cacbonat, và cao lanh. Các ví dụ về chất kết dính này bao gồm tinh bột đã được gelatin hóa trước, gelatin, cao su arabic, methyl xenluloza, carboxy methyl xenluloza, natri carboxy methyl xenluloza, xenluloza tinh thể, D-manitol, trehaloza, hydroxy propyl xenluloza, hydroxy propyl methyl xenluloza, polyvinyl pyrrolidon, rượu polyvinyl, và tương tự. Các ví dụ về chất làm trơn này bao gồm axit stearic, canxi stearat, bột talc, este của axit béo sucroza, polyetylen glycol, và tương tự. Các ví dụ về chất phân rã này bao gồm polyvinyl pyrrolidon liên kết chéo (crospovidon), hydroxy propyl xenluloza mức độ thay thế thấp, tinh bột, axit alginic, natri

alginat, và tương tự. Các ví dụ về chất làm lỏng này bao gồm axit silicic, silicic anhydrit, nhôm silicat, canxi silicat, hợp chất magie metasilicat aluminat, nhôm oxit, nhôm hydroxit, magie oxit, magie hydroxit, và tương tự. Các ví dụ về dung môi này bao gồm nước tinh khiết, dung dịch muối sinh lý, và tương tự. Các ví dụ về chất hòa tan này bao gồm dextran, polyvinyl pyrrolidon, natri benzoat, etylen điamin, salixylat amit, amit của axit nicotinic, chất dẫn xuất dầu thầu dầu được polyoxy etylen hydro hóa, và tương tự. Các ví dụ về chất đệm này bao gồm natri xitrat hydrat, natri axetat hydrat, natri hydro cacbonat, trometamol, axit boric, borac, natri phosphat hydrat hai bazơ, natri dihydro phosphat, và tương tự. Các ví dụ về chất tạo hỗn dịch này hoặc chất nhũ hóa này bao gồm natri lauryl sulfat, cao su arabic, gelatin, lecitin, glyxeryl monostearat, rượu polyvinyl, polyvinyl pyrrolidon, các xenluloza chẳng hạn như natri carboxy metyl xenluloza, dầu thầu dầu được polyoxy etylen hydro hóa, và tương tự. Các ví dụ về chất tạo đẳng trương này bao gồm các sacarit chẳng hạn như lactoza, glucoza, và D-manitol, natri clorua, kali clorua, glyxerin, propylen glycol, polyetylen glycol, urê, và tương tự. Các ví dụ về chất ổn định này bao gồm polyetylen glycol, natri dextran sulfat, natri sulfit, và tương tự. Các ví dụ về chất kháng khuẩn này bao gồm các para-hydroxybenzoic este, clobutanol, rượu benzylic, rượu phenethylic, cloresol, axit dehydroaxetic, axit sorbic, và tương tự. Các ví dụ về chất chống oxi hóa bao gồm sulfit, axit ascorbic, và tương tự. Các ví dụ về chất tạo hương vị bao gồm các chất làm ngọt thường được sử dụng trong lĩnh vực thuốc chữa bệnh và thực phẩm, hóa chất thơm, và tương tự. Các ví dụ về chất tạo màu này bao gồm các nguyên liệu tạo màu thường được sử dụng trong lĩnh vực thuốc chữa bệnh và thực phẩm.

Chất diệt tế bào theo sáng chế có thể được sử dụng nguyên thể, và cũng có thể được sử dụng dưới dạng chế phẩm chữa bệnh bao gồm cả các thành phần khác. Các ví dụ về các thành phần khác này có trong chế phẩm chữa bệnh này bao gồm tá dược, chất kết dính, chất làm trơn, chất phân rã, chất làm lỏng, dung môi, chất hòa tan, chất đệm, chất tạo hỗn dịch, chất nhũ hóa, chất tạo đẳng trương, chất ổn định, chất kháng khuẩn, chất chống oxi hóa, chất tạo hương vị, chất tạo màu, và tương tự. Ngoài ra, chế phẩm chữa bệnh này có thể còn chứa các thành phần có hiệu quả khác ngoài chất diệt tế bào theo sáng chế.

Ưu tiên chất diệt tế bào theo sáng chế được sử dụng cho các động vật có vú, ưu tiên hơn được sử dụng cho người hoặc thú nuôi chẳng hạn như chuột, chuột nhắt, thỏ, chuột lang, chuột đồng, khỉ, cừu, ngựa, gia súc, lợn, lừa, chó và mèo, và ưu tiên hơn nữa là được sử dụng cho người.

< Mô hình động vật bệnh lạc nội mạc tử cung >

Các tế bào lạc nội mạc tử cung biểu hiện CNGB3. Ngoài ra, trong nhiều bệnh lạc nội mạc tử cung, các tế bào lạc nội mạc tử cung này tăng sinh trong ổ phúc mạc. Vì lý do này, có thể thiết lập động vật này trong đó các tế bào biểu hiện quá mức CNGB3 được cấy ghép trong ổ phúc mạc làm mô hình động vật bệnh lạc nội mạc tử cung.

CNGB3 được biểu hiện quá mức không bị giới hạn cụ thể miễn là CNGB3 này là

protein thể hiện chức năng giống với chức năng của CNGB3 người loại hoang (Gene ID: 54714 của NCBI) được biểu hiện trong các tế bào lạc nội mạc tử cung này. Ví dụ như, CNGB3 này có thể là CNGB3 người, có thể là protein đồng đẳng của CNGB3 người thu được từ động vật không phải là người, có thể là thể được biến đổi của CNGB3 người hoặc thể đồng đẳng, hoặc có thể là protein có chức năng giống như chức năng của CNGB3 người.

Các ví dụ về thể được biến đổi này bao gồm protein bao gồm trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin có trình tự axit amin của CNGB3 người này hoặc thể đồng đẳng được xóa bỏ, được thay thế hoặc được bổ sung thêm vào và có chức năng như CNGB3. Ưu tiên số lượng axit amin cần được xóa bỏ và tương tự nằm trong khoảng từ 1 đến 50, ưu tiên hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 30, ưu tiên hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 20, và còn ưu tiên hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 10. Các ví dụ về các axit amin được bổ sung thêm vào đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C này của CNGB3 người này hoặc thể đồng đẳng bao gồm peptit nhãn chẳng hạn như nhãn His, nhãn Myc, và nhãn Flag. Ngoài ra, các ví dụ về thể được biến đổi này bao gồm protein bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự là 70% hoặc nhiều hơn, ưu tiên độ tương đồng trình tự là 80% hoặc nhiều hơn, ưu tiên hơn nữa độ tương đồng trình tự là 85% hoặc nhiều hơn, còn ưu tiên hơn nữa độ tương đồng trình tự là 90% hoặc nhiều hơn, và còn ưu tiên hơn nữa độ tương đồng trình tự là 95% hoặc nhiều hơn với trình tự axit amin của CNGB3 người này hoặc thể đồng đẳng này và có chức năng giống như CNGB3.

Trong sáng chế và bản mô tả sáng chế này, “các axit amin được xóa bỏ trong protein” có nghĩa là một số axit amin cấu thành nên protein bị mất (được loại ra).

Trong sáng chế và bản mô tả sáng chế này, “các axit amin trong protein được thay thế” có nghĩa là các axit amin cấu thành nên protein được thay đổi thành các axit amin khác.

Trong sáng chế và bản mô tả sáng chế này, “các axit amin trong protein được bổ sung thêm vào” có nghĩa là các axit amin mới được đưa vào trong protein.

Để điều chế các tế bào biểu hiện quá mức CNGB3, tế bào (tế bào chủ) trong đó các gen (các gen CNGB3) mã hóa CNGB3 được đưa vào có thể không bị giới hạn cụ thể, có thể là tế bào nội mô tử cung, có thể là tế bào nuôi cấy sơ cấp của tế bào không phải là tế bào nội mô tử cung này được thu thập từ các mô động vật, hoặc có thể là chủng tế bào nuôi cấy. Ngoài ra, tế bào chủ được đưa các gen CNGB3 vào có thể là tế bào thu được từ người, hoặc có thể là tế bào thu được từ động vật không phải là người.

Tế bào biểu hiện quá mức CNGB3 này thu được bằng cách đưa các gen CNGB3 vào tế bào chủ ở trạng thái có thể biểu hiện được. Cụ thể là, vật truyền biểu hiện được kết hợp caset biểu hiện bao gồm tổ hợp của ADN cần để biểu hiện CNGB3 được đưa vào tế bào chủ này. Caset biểu hiện này bao gồm gen mã hóa protein được biểu hiện này và gen khởi đầu điều khiển biểu hiện của gen này. Caset biểu hiện này có thể còn chứa bất kỳ một

hoặc nhiều gen kết thúc, vùng không được dịch mã 5', và vùng không được dịch mã 3'. Ưu tiên caset biểu hiện là caset biểu hiện bao gồm tất cả trình tự gen mã hóa protein, gen khởi đầu, gen kết thúc, vùng không được dịch mã 5', và vùng không được dịch mã 3'. Gen CNGB3 này được đưa vào tế bào chủ này có thể là bất kỳ gen nào miễn là gen này bao gồm trình tự bazơ mã hóa CNGB3 bao gồm trình tự axit amin đích, hoặc có thể được biến đổi tùy thuộc vào tần xuất codon của tế bào chủ này.

Gen khởi đầu này và gen kết thúc này có thể là bất kỳ gen nào miễn là gen khởi đầu này và gen kết thúc này hoạt động trong tế bào chủ này. Gen khởi đầu này và gen kết thúc này hoạt động trong tế bào chủ này có thể ban đầu có trong tế bào chủ này, hoặc có thể ban đầu không có trong tế bào chủ này.

Do vật truyền dùng để điều chế vật truyền biểu hiện được kết hợp caset biểu hiện của gen CNGB3 vào, có thể sử dụng vật truyền tùy chọn thường được sử dụng để đưa vào tế bào chủ này. Vật truyền này có thể là vật truyền có plasmid dạng vòng, có thể là vật truyền dạng mạch thẳng, hoặc có thể là vật truyền virus chẳng hạn như vi rút a-đê-nô (adeno virus). Cũng có thể điều chế vật truyền biểu hiện bằng cách kết hợp gen CNGB3 vào vị trí tách dòng của vật truyền biểu hiện tế bào động vật có vú có sẵn trên thị trường.

Tế bào biểu hiện quá mức CNGB3 này có thể là tế bào đã được đưa ADN lạ vào (transformant) trong đó caset biểu hiện này của gen CNGB3 này được giữ làm gen ngoài nhiễm sắc thể trong tế bào này của tế bào chủ này hoặc tế bào đã được đưa ADN lạ vào được kết hợp trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ này. Ngoài ra, do phương pháp biến đổi đưa vật truyền biểu hiện vào trong tế bào động vật có vú dùng làm vật chủ, có thể lựa chọn thích hợp một phương pháp trong số các phương pháp biến đổi đã biết chẳng hạn như phương pháp bơm vật liệu gen vào tế bào bằng liposom (lipofection), phương pháp lắng đọng canxi phosphat, phương pháp liti axetat, và phương pháp điện di (electroporation method) và thực hiện phương pháp này. Tế bào biểu hiện quá mức CNGB3 thu được có thể được nuôi cấy dưới điều kiện giống như điều kiện của tế bào động vật có vú dùng làm vật chủ.

Loài sinh vật thuộc các động vật có vú không phải là người trong đó tế bào biểu hiện quá mức CNGB3 được cấy vào ổ phúc mạc không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ như, ưu tiên thú nuôi chẳng hạn như chuột, chuột nhắt, thỏ, chuột lang, chuột đồng, khỉ, cừu, ngựa, gia súc, lợn, lừa, chó, và mèo hoặc các động vật thử nghiệm được dùng làm mô hình động vật bệnh lạc nội mạc tử cung theo sáng chế. Sự cấy ghép tế bào biểu hiện quá mức CNGB3 này vào trong ổ phúc mạc có thể được thực hiện thông thường.

<Dấu ấn sinh học>

Exosome bao gồm các phân tử sinh học được biểu hiện trong các màng tế bào của các tế bào gốc giải phóng ra exosome này. Như được mô tả trên đây, một lượng lớn CNGB3 được biểu hiện trong các màng tế bào này của tế bào nội mạc tử cung này, và exosome này được giải phóng từ tế bào nội mạc tử cung này bao gồm CNGB3. Tương tự, CNGB3 cũng

được biểu hiện trong các tế bào ung thư khác nhau, và exosome này được giải phóng từ các tế bào ung thư bao gồm CNGB3. Vì lý do này, lượng CNGB3 trong exosome này là hữu dụng để làm dấu ấn sinh học cho bệnh lạc nội mạc tử cung hoặc bệnh ung thư.

<Phương pháp xác định khả năng mắc bệnh >

Phương pháp xác định khả năng mắc bệnh theo sáng chế (sau đây, được gọi là “phương pháp đánh giá theo sáng chế”) là phương pháp xác định khả năng mắc bệnh trong đó có biểu hiện CNGB3, bằng cách sử dụng CNGB3 này trong các exosome làm dấu ấn sinh học. Trong cơ thể động vật trong đó các tế bào gây bệnh đã biểu hiện CNGB3 để phát triển bệnh (sau đây, được gọi là “bệnh biểu hiện cao CNGB3”), một lượng lớn các exosome bao gồm một lượng lớn CNGB3 được tiết ra từ các tế bào gây bệnh này. Mặt khác, do CNGB3 được biểu hiện chỉ trong các mô bị giới hạn trong các tế bào bình thường, các exosome bao gồm một lượng lớn CNGB3 là rất ít trong cơ thể động vật không phát triển bệnh biểu hiện cao CNGB3. Vì lý do này, dựa vào lượng CNGB3 này trong exosome này, có thể nhận ra nhóm bệnh nhân và nhóm không phải bệnh nhân mắc bệnh biểu hiện cao CNGB3 này. Theo phương pháp đánh giá theo sáng chế, khả năng đối tượng động vật này đã mắc các bệnh biểu hiện cao CNGB3 được đánh giá bằng cách đo CNGB3 trong exosome được thu thập từ đối tượng động vật này, và so sánh giá trị đo thu được này với giá trị chuẩn được thiết lập trước.

Ví dụ điển hình về các bệnh biểu hiện cao CNGB3 này là bệnh lạc nội mạc tử cung hoặc bệnh ung thư trong đó CNGB3 được biểu hiện. Ngoài ra, đối tượng động vật là đối tượng được đánh giá bởi phương pháp đánh giá theo sáng chế có thể là người, hoặc có thể là động vật không phải là người. Loại sinh vật thuộc các động vật không phải người không bị giới hạn cụ thể, và ví dụ về loại sinh vật này bao gồm thú nuôi chẳng hạn như chuột, chuột nhắt, thỏ, chuột lang, chuột đồng, khỉ, cừu, ngựa, gia súc, lợn, lừa, chó, và mèo hoặc các động vật thử nghiệm. Ưu tiên đối tượng động vật là đối tượng được đánh giá bởi phương pháp đánh giá theo sáng chế là người, thú nuôi và các động vật thử nghiệm và ưu tiên hơn là người.

Cụ thể là, trong trường hợp trong đó giá trị đo của CNGB3 trong exosome này lớn hơn giá trị chuẩn được thiết lập trước, người ta đánh giá rằng đối tượng động vật được thu thập exosome có khả năng cao mắc bệnh biểu hiện cao CNGB3. Giá trị chuẩn này là giá trị chuẩn để nhận ra các bệnh nhân và người không mắc bệnh biểu hiện cao CNGB3 này.

Giá trị chuẩn này có thể thu được bằng thử nghiệm là ngưỡng có khả năng đo lượng CNGB3 trong exosome của nhóm bệnh nhân này và nhóm không phải bệnh nhân mắc bệnh biểu hiện cao CNGB3 này và phân biệt cả hai nhóm này. Phương pháp xác định giá trị chuẩn của lượng CNGB3 trong exosome này theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và, ví dụ như, thu được bằng phương pháp thông kê thông thường.

Ví dụ về phương pháp thu được giá trị chuẩn, ví dụ như, exosome của bệnh nhân được chẩn đoán là bệnh nhân mắc bệnh biểu hiện cao CNGB3 đích được thu thập bằng các

phương pháp khác chẳng hạn như xét nghiệm bệnh học được thực hiện thông thường, và đo lường CNGB3 này. Sau khi thực hiện phép đo trên nhiều bệnh nhân, có thể tính toán lượng CNGB3 trong exosome của các bệnh nhân này bằng giá trị trung bình và thiết lập giá trị bằng số bao gồm giá trị trung bình này làm giá trị chuẩn.

Ngoài ra, có thể thực hiện phép đo lượng CNGB3 trong exosome này đối với nhiều bệnh nhân có biểu hiện cao CNGB3 và nhiều người không phải bệnh nhân biểu hiện cao CNGB3, để tính toán cả lượng CNGB3 trong exosome này của nhóm bệnh nhân biểu hiện cao CNGB3 này và của nhóm không phải bệnh nhân biểu hiện cao CNGB3 này và sự biến đổi của giá trị trung bình, để thu được ngưỡng trong đó cả hai giá trị bằng số được phân biệt bởi việc xem xét các biến đổi, và để thiết lập các giá trị này làm giá trị chuẩn.

Trong bệnh biểu hiện cao CNGB3 cần được đánh giá, trong trường hợp trong đó CNGB3 được biểu hiện rõ ràng trong các tế bào gây bệnh này, giá trị chuẩn này có thể được thiết lập là giá trị giới hạn phát hiện của CNGB3. Trong trường hợp trong đó CNGB3 được phát hiện từ exosome được thu thập từ đối tượng động vật này, có thể đánh giá rằng đối tượng động vật này có khả năng cao mắc bệnh biểu hiện cao CNGB3 này, và trong trường hợp trong đó không phát hiện thấy CNGB3 này, có thể đánh giá rằng đối tượng động vật này có khả năng cao không mắc bệnh biểu hiện cao CNGB3 này.

Phương pháp đo lượng CNGB3 trong exosome này được thu thập từ đối tượng động vật này không bị giới hạn cụ thể, và có thể thực hiện phép đo bằng các phương pháp khác nhau thường được sử dụng khi đo định lượng hoặc đo bán định lượng biểu hiện của protein này. Các ví dụ về phương pháp này bao gồm các phương pháp sử dụng phản ứng miễn dịch chẳng hạn như phương pháp ELISA, hóa mô miễn dịch, và phương pháp tách phương Tây (Western blotting method). Ngoài ra, lượng CNGB3 trong exosome này được thu thập từ đối tượng động vật này có thể được thu nhận làm lượng exosome bao gồm CNGB3. CNGB3 này chủ yếu có trên bề mặt màng kép lipid của exosome này. Vì lý do này, cũng có thể đo lượng CNGB3 trong exosome này bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau để đo exosome có phân tử bề mặt đặc hiệu. Các ví dụ về các thiết bị đo exosome có phân tử bề mặt đặc hiệu này bao gồm các hệ thống đo exosome chẳng hạn như “Exo Counter” (do JVC Kenwood Corporation sản xuất), “dNano” (do Meiwafoysis Co., Ltd. sản xuất), “Nano Sight” (do Quantum Design Japan sản xuất), và “SP6800” (Sony Corporation).

Trong phương pháp đo bằng cách sử dụng phản ứng miễn dịch, có thể sử dụng bất kỳ kháng thể kháng CNGB3 nào. Ngoài ra, thay thế cho kháng thể kháng CNGB3 này, có thể sử dụng phân tử liên kết với CNGB3. Có thể sử dụng bất kỳ chất nào trong số peptit, protein, axit nucleic, phân tử thấp, và tương tự làm phân tử này. Ngoài ra, ưu tiên phân tử này là sản phẩm được gắn nhãn (một hợp chất trong đó hợp chất dán nhãn liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp với vị trí liên kết với CNGB3). Hợp chất dán nhãn này không bị giới hạn cụ thể, và, ví dụ như, có thể là phân tử thấp chẳng hạn như biotin, có thể là chất huỳnh quang,

có thể là enzym, hoặc có thể là peptit nhãn chẳng hạn như nhãn His, nhãn Myc, và nhãn Flag.

Ví dụ như, ưu tiên peptit liên kết với CNGB3 này là peptit liên kết CNGB3 được mô tả trên đây hoặc sản phẩm được gắn nhãn này, và ưu tiên đặc biệt đối với peptit Z13 hoặc sản phẩm được gắn nhãn này. Ngoài ra, cũng có thể sử dụng peptit có khả năng liên kết với CNGB3 chẳng hạn như peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 41 (MQRTRATPG) (sau đây, được gọi là “peptit Z24”) và peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 42 (VRSSRSTPQ) (sau đây, được gọi là “peptit Z11”) (đối với mỗi loại trong cả hai loại này, gọi là NPL 1). Peptit trong đó tất cả nhóm chức peptit bao gồm các L-axit amin có thể được sử dụng làm peptit liên kết với CNGB3 này, và cũng có thể sử dụng peptit bao gồm các D-axit amin làm peptit liên kết với CNGB3 này. Ví dụ như, có thể sử dụng peptit Z13 được biotin hóa, và bộ gồm avidin và streptovirin được dán nhãn enzym và huỳnh quang.

Exosome này được sử dụng trong việc đo lường CNGB3 có thể là exosome được thu thập từ đối tượng động vật, hoặc có thể chính là mẫu sinh học được thu thập từ đối tượng động vật này, nhưng ưu tiên exosome được tinh chế từ mẫu sinh học này. Việc phân tách exosome này từ mẫu sinh học này có thể được thực hiện, ví dụ như bằng cách sử dụng bộ dụng cụ dùng để phân tách exosome có sẵn trên thị trường.

Mẫu sinh học bao gồm exosome này không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể là máu, huyết tương, huyết thanh, nước mắt, nước bọt, dịch màng bụng, nước tiểu, và tương tự, hoặc có thể là các mẫu mô được thu thập từ màng niêm mạc chẳng hạn như niêm mạc tử cung và màng niêm mạc ống tiêu hóa hoặc các mô chẳng hạn như gan, dạ dày, ruột non, và ruột già. Trong số các mẫu sinh học này, máu, huyết tương, và huyết thanh được sử dụng rộng rãi làm các mẫu lâm sàng và có thể được thu thập xâm lấn tương đối ít nhất. Vì lý do này, ưu tiên exosome được phân lập từ máu được thu thập từ động vật mẫu, đặc biệt là huyết tương hoặc huyết thanh, là exosome được sử dụng để đo lường CNGB3 trong phương pháp đánh giá theo sáng chế. Do phương pháp đánh giá theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng exosome được phân lập từ huyết thanh và tương tự làm mẫu thử, phương pháp đánh giá theo sáng chế cũng hiệu quả trong việc sàng lọc nhanh bệnh biểu hiện cao CNGB3 chẳng hạn như khám sức khỏe.

Phương pháp đánh giá theo sáng chế có thể được sử dụng trong đánh giá các hiệu quả chữa bệnh trong việc điều trị bệnh biểu hiện cao CNGB3 này. Ví dụ như, phương pháp đánh giá theo sáng chế được thực hiện trên bệnh nhân mắc bệnh biểu hiện cao CNGB3 này trước khi bắt đầu và sau khi hoàn thành việc điều trị bệnh biểu hiện cao CNGB3 này. Trong trường hợp trong đó các tế bào gây bệnh biểu hiện cao CNGB3 này giảm, hoặc hoạt tính sinh lý này giảm trong cơ thể bệnh nhân bởi việc điều trị này, trong cơ thể của bệnh nhân này, lượng exosome được bài tiết từ các tế bào gây bệnh biểu hiện cao CNGB3 này giảm. Vì lý do này, trong trường hợp trong đó lượng CNGB3 trong exosome này giảm đáng kể

sau khi điều trị so với trước khi điều trị, có thể đánh giá rằng đã thu được hiệu quả điều trị bằng cách điều trị này. Ngoài ra, có thể đánh giá rằng số phần trăm giảm của lượng CNGB3 trong exosome này càng lớn, hiệu quả điều trị này càng cao. Có thể kiểm soát hiệu quả điều trị này bằng cách thực hiện phương pháp đánh giá theo sáng chế theo thời gian ngay cả trong quá trình điều trị, ngoài việc thực hiện phương pháp đánh giá này trước khi bắt đầu và sau khi kết thúc điều trị bệnh biểu hiện cao CNGB3 này.

Ngoài ra, bằng cách thực hiện phương pháp đánh giá theo sáng chế trên động vật bị nhiễm bệnh biểu hiện cao CNGB3 này ít nhất một lần theo thời gian, có thể kiểm soát việc có hoặc không có bệnh biểu hiện cao CNGB3 này của động vật bị nhiễm. Ví dụ như, trong trường hợp trong đó bệnh biểu hiện cao CNGB3 này là bệnh có nguy cơ tái phát cao ngay cả trong trường hợp đã được chữa trị chẳng hạn như bệnh ung thư hoặc bệnh lạc nội mạc tử cung, bằng cách thực hiện phương pháp đánh giá theo sáng chế trên bệnh nhân mắc bệnh biểu hiện cao CNGB3 này theo thời gian, có thể kiểm soát sự xuất hiện hoặc không xuất hiện sự tái phát. **Ví dụ thực hiện sáng chế** Tiếp theo, sáng chế sẽ được giải thích chi tiết hơn bằng cách sử dụng các ví dụ. Sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

<Mô hình tế bào bệnh lạc nội mạc tử cung (tế bào A431-CNGB3-myc)>

Chuẩn bị tế bào đã được biến đổi (tế bào A431-CNGB3-myc) thu được bằng cách đưa gen mã hóa CNGB3 người, trong đó nhân myc được hợp nhất trong đầu tận cùng C, vào tế bào A431 (chủng tế bào thu được từ bệnh ung thư tế bào loại biểu mô người) và biểu hiện mạnh mẽ của tế bào này để làm mô hình tế bào bệnh lạc nội mạc tử cung.

Thực hiện nuôi cấy tế bào A431-CNGB3-myc này ở 37°C trong môi trường cacbon dioxit 5% theo thể tích bằng cách sử dụng môi trường trong đó 10% FBS đã bị bất hoạt (bovine fetal serum, do Corning Corporation sản xuất) và 1% penicillin-streptomycin (do Invitrogen Corporation sản xuất) được chứa trong môi trường glucoza cao DMEM (DMEM High Glucoza Medium) (do GIBCO Corporation sản xuất), làm môi trường nuôi cấy. Thực hiện chuyển tiếp mỗi hai hoặc ba ngày.

<Mô hình chuột mắc bệnh lạc nội mạc tử cung>

Các tế bào A431-CNGB3-myc được cấy ghép vào khoang màng bụng của chuột bị suy giảm miễn dịch (chủng NOD/ShiJic-scid Jcl, do CLEA Japan, Inc. cung cấp) để điều chế mô hình chuột mắc bệnh lạc nội mạc tử cung.

Cụ thể là, sau khi rã đông các tế bào A431-CNGB3-myc được trữ đông, điều chế dung dịch tế bào bằng cách bổ sung thêm môi trường nuôi cấy vào các tế bào được chuyển tiếp hai lần bằng cách sử dụng đĩa 10 cm (do Thermo Fisher Scientific Co., Ltd. sản xuất, số Lô F3BAXQ103) để cho có được 1×10^7 tế bào/0,5 mL/cơ thể được sử dụng làm dung dịch thuốc điều trị. Dung dịch thuốc điều trị này được đưa vào trong màng bụng của chuột cái 7 tuần tuổi bị suy giảm miễn dịch ngay sau khi điều chế để cấy ghép các tế bào A431-CNGB3-myc này.

Đối với chuột này, từ 5 đến 10 con chuột/lồng trong lồng polycarbonat (chiều rộng (W) × chiều dài (D) × chiều cao (H) = 270 × 440 × 187 (mm)) được nuôi dưỡng trong môi trường có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 19,8°C đến 27,1°C, độ ẩm nằm trong khoảng từ 32% đến 75%, và chiếu sáng 12 giờ. Thức ăn (CRF-1 tiệt trùng (loại rắn), do Oriental Yeast Co., Ltd. sản xuất) và nước uống (nước máy tiệt trùng) được sử dụng tự do.

Khẳng định việc chuẩn bị mô hình bằng cách quan sát và thu thập khối u màng bụng. Một đến ba tuần sau khi cấy ghép tế bào A431-CNGB3-myc, tiến hành mổ xác khám nghiệm trên mỗi hai con chuột một tuần để kiểm tra bằng mắt xem liệu có quan sát thấy khối u (dạng hạt khoảng 1 mm) trong phúc mạc hay không và chụp ảnh. Sau đó, phúc mạc này được thu thập, và được cắt ra bốn vị trí (mỗi vị trí ở bên trái và bên phải của bụng và lưng), lần lượt được nhúng vào và cố định trong đệm trung tính 10% formalin, và làm lạnh. Phúc mạc này sau khi được cố định trong formalin được cho nhuộm hóa mô miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể kháng c-myc để kiểm tra tình trạng phân tán.

Kết quả của việc kiểm tra bằng mắt đối với chuột sau khi cấy ghép tế bào A431-CNGB3-myc, trong thử nghiệm thứ nhất, mặc dù khối u được xác nhận bằng mắt 1 tuần sau khi cấy ghép, không quan sát thấy sự phát tán ở màng bụng, nhưng hai hoặc ba tuần sau khi cấy ghép, xác nhận được bằng mắt khối u và sự phân tán ở màng bụng. Trong thử nghiệm thứ hai, xác nhận được bằng mắt sự phân tán ở màng bụng ngay sau khi cấy ghép 1 tuần. Ngoài ra, kết quả của việc nhuộm c-myc của đoạn mô màng bụng của chuột sau khi cấy ghép là, đã khẳng định rằng một tuần sau khi cấy ghép này, đã xảy ra sự phân tán ở màng bụng.

[Ví dụ tham chiếu 1]

Trong peptit trong đó peptit KLAK, peptit HLAH, và peptit liên kết CNGB3 được liên kết, kiểm tra ảnh hưởng của loại trình tự axit amin này của peptit liên kết CNGB3 này đến cường độ độc tính gây độc tế bào chống lại các tế bào bệnh lạc nội mạc tử cung.

Cụ thể là, hai loại peptit bao gồm các trình tự axit amin được thể hiện trong Bảng 2 được tổng hợp, và so sánh độc tính gây độc tế bào chống lại các tế bào A431-CNGB3-myc. Trong hai loại peptit này, nhóm chức trình tự KLAK này và nhóm chức trình tự HLAH này được tổng hợp từ các D-axit amin, và nhóm chức peptit liên kết CNGB3 này được tổng hợp bằng các L-axit amin.

[Bảng 1]

	KLAK-HLAH	Seq.	Seq. số
WT	14+14	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLAHLAH-VRRADNRPG	8
D5E	14+14	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLAHLAH-VRRAENRPG	9

<Đánh giá các tính chất diệt tế bào >

Hoạt tính diệt tế bào này của mỗi peptit được đánh giá bằng cách đo lượng ATP trong các tế bào A431-CNGB3-myc được xử lý bằng mỗi peptit bằng cách sử dụng bộ dụng cụ thử nghiệm CellTiter-Glo (nhãn hiệu đã được đăng ký) (do Promega sản xuất).

Cụ thể là, đầu tiên, các tế bào A431-CNGB3-myc sau hai lần chuyển tiếp được phân tán vào trong đĩa 96 lỗ (do Corning/Costar sản xuất, số lô 00515003) để có được 1×10^4 tế bào/lỗ bằng cách điều chế nồng độ của các tế bào này. Sau khi nuôi cấy trong 2 ngày sau khi phân tán, bổ sung thêm mỗi peptit vào mỗi lỗ để cho nồng độ cuối cùng lần lượt là 35,5, 75 hoặc 150 μ M, và nuôi cấy trong 24 giờ. Sau đó, lấy văng nuôi cấy ra khỏi mỗi lỗ, và bổ sung thêm đệm CellTiter-Glo vào các tế bào còn lại, và sau khi đồng nhất, thu lại văng này bằng cách ly tâm và sử dụng làm dịch thủy phân. Bổ sung thêm lượng gấp đôi PBS và 2 lần thuốc thử CellTiterGlo có lượng tương đương với dịch thủy phân này vào dịch thủy phân này và khuấy để thu được dung dịch phản ứng, và giữ yên dung dịch phản ứng này ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Đo cường độ phát quang (Luminescence) (RLU: RELATIVE LIGHT UNITS - đơn vị ánh sáng tương đối) của dung dịch phản ứng này sau khi giữ yên ở nhiệt độ phòng bằng cách sử dụng máy đọc vi đĩa đa chế độ lai ghép Synergy H1 (do BioTek Corporation sản xuất). Cường độ phát quang của dung dịch phản ứng này là chỉ báo lượng ATP. Chỉ báo này thể hiện rằng cường độ phát quang của dung dịch phản ứng này càng nhỏ, thì lượng ATP càng nhỏ, và hoạt tính diệt tế bào của peptit được đưa vào càng mạnh. Tất cả các thử nghiệm được đo ba lần và giá trị trung bình được đánh giá là hoạt tính diệt tế bào này ở nồng độ này của mỗi peptit.

Khi đánh giá hoạt tính diệt tế bào chống lại các tế bào A431-CNGB3-myc này của mỗi peptit, kết quả đo cường độ phát quang (RLU) của mỗi dung dịch phản ứng được thể hiện trong FIG. 1. Trong FIG. 1, “WT” chỉ báo kết quả của peptit WT của Bảng 1, và “D5E” chỉ báo kết quả của peptit D5E của Bảng 1, một cách tương ứng. Cả hai peptit đều thể hiện hoạt tính diệt tế bào phụ thuộc vào nồng độ. Peptit WT trong đó peptit liên kết CNGB3 này là peptit Z13 thể hiện hoạt tính diệt tế bào mạnh hơn so với peptit D5E này trong đó peptit liên kết CNGB3 này là peptit có SEQ ID số: 4.

[Ví dụ 1]

Trong peptit trong đó peptit KLAKE này, peptit HLAH này, và peptit Z13 này được liên kết, độ dài của trình tự KLAKE này và trình tự HLAH này được tối ưu hóa để cho cường độ độc tính gây độc tế bào chống lại các tế bào lạc nội mạc tử cung này trở nên tối đa.

Cụ thể là, 16 loại peptit bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trong Bảng 2 được tổng hợp, và so sánh độc tính gây độc tế bào chống lại các tế bào A431-CNGB3-myc này. Trong 16 loại peptit này, nhóm chức trình tự KLAKE này và nhóm chức trình tự HLAH này được tổng hợp từ các D-axit amin, và nhóm chức peptit Z13 này được tổng hợp bằng

các L-axit amin.

[Bảng 2]

Peptit	KLAK-HLAH	Seq.	Seq. số
1	14+14	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLAHLAH-VRRADNRPG	8
2	14+13	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLAHLA-VRRADNRPG	10
3	14+12	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLAHL-VRRADNRPG	11
4	14+11	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLAH-VRRADNRPG	12
5	14+10	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLA-VRRADNRPG	13
6	14+9	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HL-VRRADNRPG	14
7	14+8	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-H-VRRADNRPG	15
8	14+7	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-VRRADNRPG	16
	HLAH-KLAK		
9	14+14	HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-KLAKLAK-VRRADNRPG	17
10	14+13	HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-KLAKLA-VRRADNRPG	18
11	14+12	HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-KLAKL-VRRADNRPG	19
12	14+11	HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-KLAK-VRRADNRPG	20
13	14+10	HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-KLA-VRRADNRPG	21
14	14+9	HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-KL-VRRADNRPG	22
15	14+8	HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-K-VRRADNRPG	23
16	14+7	HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-VRRADNRPG	24

Nồng độ cuối cùng của mỗi peptit được bổ sung thêm vào các tế bào A431-CNGB3-myc này được phân tán vào đĩa 96 lỗ này được thiết lập là 2,34, 4,69, 9,38, 18,8, 37,5, 75 hoặc 150 μ M, và đánh giá hoạt tính diệt tế bào của mỗi peptit theo cách thức giống như cách thức trong Ví dụ tham chiếu 1, ngoại trừ thời gian nuôi cấy sau khi bổ sung thêm peptit này được đặt là 20 giờ. Khi đánh giá hoạt tính diệt tế bào chống lại các tế bào A431-CNGB3-myc này của mỗi peptit, kết quả đo cường độ phát quang (RLU) của mỗi dung dịch phản ứng được thể hiện trong FIG. 2. Trong hình vẽ này, “1” đến “16” thể hiện kết quả của dung dịch phản ứng được bổ sung thêm các peptit 1 đến 16 trong Bảng 2, một cách tương ứng. Tất cả các peptit này đều thể hiện hoạt tính diệt tế bào phụ thuộc vào nồng độ 20 giờ sau khi bổ sung thêm peptit này. Các peptit từ 1 đến 8 trong đó peptit có trình tự HLAH được liên kết với đoạn phía sau của peptit có trình tự KLAK thể hiện hoạt tính diệt tế bào mạnh hơn so với các peptit 9 đến 16 trong đó peptit có trình tự KLAK được liên kết với đoạn phía sau của peptit có trình tự HLAH. Ngoài ra, trong các peptit từ 1 đến 8, peptit ngắn nhất 8 có hoạt tính diệt tế bào mạnh hơn so với peptit dài nhất 1, và trong các peptit từ 9 đến 16, peptit ngắn nhất 16 có hoạt tính diệt tế bào mạnh hơn so với peptit dài nhất 9.

[Ví dụ 2]

Peptit 8 này thể hiện hoạt tính diệt tế bào mạnh nhất trong Ví dụ 1 được làm ngắn thêm để tối ưu hóa cường độ độc tính gây độc tế bào chống lại các tế bào lạc nội mạc tử cung này đến giá trị tối đa.

Cụ thể là, 14 loại peptit bao gồm các trình tự axit amin được thể hiện trong Bảng 3 được tổng hợp, và so sánh độc tính gây độc tế bào chống lại các tế bào A431-CNGB3-myc. Trong 14 loại peptit này, nhóm chức trình tự KLAH này và nhóm chức trình tự HLAH này được tổng hợp từ các D-axit amin, và nhóm chức peptit Z13 này được tổng hợp bằng các L-axit amin.

[Bảng 3]

Peptit	KLAK-HLAH	Seq.	Seq. số
8	14+7	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-VRRADNRPG	16
A1	14+6	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLA-VRRADNRPG	25
A2	14+5	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHL-VRRADNRPG	26
A3	14+4	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAH-VRRADNRPG	27
A4	14+3	KLAKLAK-KLAKLAK-HLA-VRRADNRPG	28
A5	14+2	KLAKLAK-KLAKLAK-HL-VRRADNRPG	29
A6	14+1	KLAKLAK-KLAKLAK-H-VRRADNRPG	30

B1	13+7	KLAKLAK-KLAKLA-HLAHLAH-VRRADNRPG	31
B2	12+7	KLAKLAK-KLAKL-HLAHLAH-VRRADNRPG	32
B3	11+7	KLAKLAK-KLAK-HLAHLAH-VRRADNRPG	33
B4	10+7	KLAKLAK-KLA-HLAHLAH-VRRADNRPG	34
B5	9+7	KLAKLAK-KL-HLAHLAH-VRRADNRPG	35
B6	8+7	KLAKLAK-K-HLAHLAH-VRRADNRPG	36
B7	7+7	KLAKLAK-HLAHLAH-VRRADNRPG	37

Hoạt tính diệt tế bào của mỗi peptit được đánh giá theo cách thức giống như cách thức trong Ví dụ 1. Khi đánh giá hoạt tính diệt tế bào chống lại các tế bào A431-CNGB3-myc của mỗi peptit, kết quả đo cường độ phát quang (RLU) của dung dịch phản ứng được xử lý bằng peptit 8 này và các peptit từ A1 đến A6 được thể hiện trong FIG. 3, và kết quả đo cường độ phát quang (RLU) của dung dịch phản ứng được xử lý bằng peptit 8 này và các peptit từ B1 đến B7 được thể hiện trong FIG. 4. Trong các hình vẽ này, “#8” thể hiện kết quả của dung dịch phản ứng được bổ sung thêm peptit 8 trong Bảng 3 vào, từ “A1” đến “A6” và từ “B1” đến “B6” thể hiện kết quả của dung dịch phản ứng được bổ sung thêm các peptit từ A1 đến A6 và từ B1 đến B6 trong Bảng 3 vào, một cách tương ứng. Trong các peptit từ A1 đến A6 có trình tự KLAK bao gồm 14 axit amin, các peptit từ A3 đến A6 có trình tự HLAH bao gồm 4 axit amin hoặc ít hơn thể hiện hoạt tính diệt tế bào ngay cả khi nồng độ cuối cùng của peptit này là 75 μ M (FIG. 3). Ngoài ra, trong các peptit từ B1 đến B7 có trình tự HLAH bao gồm 7 axit amin, các peptit từ B3 đến B7 có trình tự KLAK bao gồm 11 axit amin hoặc ít hơn thể hiện hoạt tính diệt tế bào ngay cả khi nồng độ cuối cùng của peptit này là 75 μ M (FIG. 4). Ngoài ra, chỉ có peptit A2 thể hiện hoạt tính diệt tế bào mạnh hơn so với peptit 8. Từ các kết quả này, ghi nhận rằng peptit trong đó peptit có trình tự KLAK bao gồm 14 axit amin và peptit có trình tự HLAH bao gồm 5 axit amin được liên kết là peptit thực hiện thể hiện hoạt tính diệt tế bào cao nhất.

[Ví dụ 3]

Trong peptit trong đó peptit KLAK này, peptit HLAH này, và peptit Z13 này được liên kết, kiểm tra cường độ hoạt tính diệt tế bào trong trường hợp trong đó axit amin cấu thành là D-axit amin và trong trường hợp trong đó axit amin cấu thành là L-axit amin.

Cụ thể là, cường độ hoạt tính diệt tế bào của peptit A2 (cả peptit có trình tự KLAK bao gồm 14 axit amin và trình tự HLAH bao gồm 5 axit amin bao gồm các D-axit amin. Peptit này được gọi là peptit (14D + 5D)) được mô tả trong Bảng 3, peptit (14D + 5L) trong đó trong các axit amin của peptit 8 này, trình tự KLAK này bao gồm 14 axit amin bao gồm các D-axit amin, và trình tự HLAH bao gồm 5 axit amin bao gồm các L-axit amin,

peptit (14L + 5D) trong đó trong các axit amin của peptit 8 này, trình tự KLAKE bao gồm 14 axit amin bao gồm các L-axit amin, và trình tự HLAH bao gồm 5 axit amin bao gồm các D-axit amin, và peptit (14L + 5L) trong đó tất cả các axit amin của peptit 8 này bao gồm các L-axit amin được kiểm tra theo cách thức giống như cách thức trong Ví dụ 1. Tất cả nhóm chức peptit Z13 này của các peptit này chỉ bao gồm các L-axit amin.

Khi đánh giá hoạt tính diệt tế bào chống lại các tế bào A431-CNGB3-myc của mỗi peptit, kết quả đo cường độ phát quang (RLU) của dung dịch phản ứng được xử lý bằng mỗi peptit được thể hiện trong FIG. 5. Hoạt tính diệt tế bào của peptit (14L + 5L) trong đó tất cả các peptit thoát bao gồm các L-axit amin là thấp nhất, và hoạt tính diệt tế bào của peptit A2 (Peptit (14D + 5D)) trong đó tất cả các peptit thoát này bao gồm các D-axit amin là cao nhất. Dự tính rằng peptit bao gồm các D-axit amin khó được tiêu hóa trong endosome hoặc tế bào chất so với peptit bao gồm các L-axit amin, và hoạt tính thoát khỏi endosome và hoạt tính cảm ứng sự tự chết tế bào được thể hiện đầy đủ.

[Ví dụ 4]

Hoạt tính diệt tế bào của peptit A2 trong đó hoạt tính diệt tế bào này là cao nhất được kiểm tra trong các Ví dụ 2 và 3.

<Phân tích định lượng các tế bào sống >

Bổ sung thêm các tế bào A431-CNGB3-myc được phân tán trên kính phủ được đặt trong đĩa nhiều lỗ để nuôi cấy tế bào để cho nồng độ cuối cùng của peptit A2 này là 0 (mẫu đối chứng), 37,5, 75 hoặc 150 μ M, và tiến hành nuôi cấy. Sau 24, 48 hoặc 72 giờ tính từ khi bổ sung thêm peptit này, đếm số lượng tế bào (các tế bào sống) bám chặt và lan truyền trên kính phủ này. Kết quả đo số lượng các tế bào sống (tế bào/ảnh) trong một trường nhìn đơn được thể hiện trong FIG. 6. Kết quả là, khẳng định rằng số lượng tế bào sống của các tế bào A431-CNGB3-myc giảm xuống phụ thuộc vào nồng độ của peptit A2 được bổ sung thêm vào theo thời gian.

<Phân tích hoạt tính cảm ứng sự tự chết tế bào>

Bổ sung thêm các tế bào A431-CNGB3-myc này được phân tán trên kính phủ được đặt trong các đĩa nhiều lỗ để nuôi cấy tế bào để cho nồng độ cuối cùng của peptit A2 là 0 (mẫu đối chứng), 37,5, 75 hoặc 150 μ M, và tiến hành nuôi cấy. Sau 24, 48 hoặc 72 giờ tính từ khi bổ sung thêm peptit này, phát hiện thấy sự tự chết tế bào bằng cách sử dụng Bộ Dụng cụ Phát hiện Sự tự chết tế bào Fluorescein tại chỗ ApopTag (nhãn hiệu đã được đăng ký). FIG. 7 thể hiện kết quả trong đó thử nghiệm Apop-Tag được thực hiện trên các tế bào này sau 48 giờ kể từ khi bổ sung thêm peptit này. Trong hình vẽ này, “Hoechst” thể hiện kết quả nhuộm màu nhân bằng dung dịch Hoechst 33342. Kết quả là, tùy thuộc vào nồng độ của peptit A2 được bổ sung thêm vào, khẳng định rằng số lượng các tế bào được nhuộm Apop-Tag là lớn, và sự tự chết tế bào được cảm ứng bởi peptit A2 này.

[Ví dụ 5]

Peptit A2 có hoạt tính diệt tế bào cao nhất trong các Ví dụ 2 và 3 được sử dụng cho mô hình chuột mắc bệnh lạc nội mạc tử cung, và kiểm tra tác dụng chữa bệnh đối với bệnh lạc nội mạc tử cung.

<Đưa một lần peptit vào ổ phúc mạc>

0,5 mL dung dịch muối sinh lý đã được làm nóng đến 37°C trong phúc mạc được đưa vào mô hình chuột mắc bệnh lạc nội mạc tử cung sau 7 ngày tính từ khi cấy ghép các tế bào A431-CNGB3-myc vào ổ phúc mạc dưới điều kiện gây mê bằng isofluran, và ngay sau khi xoa bóp, hòa tan peptit A2 này trong dung dịch nước muối sinh lý này và đưa dung dịch này vào trong phúc mạc này. Peptit A2 này được sử dụng sao cho lượng sử dụng trên thể trọng chuột là 0 mg/10 mL/kg (mẫu đối chứng), 5 mg/10 mL/kg, hoặc 10 mg/10 mL/kg (n=3).

<Đưa nhiều lần peptit vào ổ phúc mạc>

0,5 mL dung dịch muối sinh lý đã được làm nóng đến 37°C trong phúc mạc này được đưa vào mô hình chuột mắc bệnh lạc nội mạc tử cung sau 7 ngày tính từ khi cấy ghép các tế bào A431-CNGB3-myc này vào ổ phúc mạc dưới điều kiện gây mê bằng isofluran, và ngay sau khi xoa bóp, hòa tan peptit A2 này trong dung dịch nước muối sinh lý này và đưa dung dịch này vào trong phúc mạc này (đưa một lần). Sau đó, sau 8 và 9 ngày tính từ khi cấy ghép các tế bào A431-CNGB3-myc này vào ổ phúc mạc, đưa dung dịch peptit A2 này vào theo cùng một cách thức. Tức là, dung dịch peptit A2 này được sử dụng một lần mỗi ngày, tổng số là 3 lần. Peptit A2 này được sử dụng sao cho lượng sử dụng trên thể trọng chuột là 0 mg/10 mL/kg (mẫu đối chứng), 2,5 mg/10 mL/kg, 5,0 mg/10 mL/kg, hoặc 7,5 mg/10 mL/kg (n=3).

<Thu thập phúc mạc (thu thập nguyên liệu)>

Mô hình chuột mắc bệnh lạc nội mạc tử cung đã được đưa peptit A2 này vào được làm chết bằng cách làm chảy máu dưới điều kiện gây mê bằng isofluran sau 24 giờ hoặc 48 giờ tính từ khi sử dụng thuốc lần cuối cùng để thu thập phúc mạc. Phúc mạc dùng để đo ATP được đông lạnh bằng nitơ lỏng, và được bảo quản trong tủ đông sâu cho đến khi đo. Phúc mạc dùng để chuẩn bị mẫu bệnh phẩm lần lượt được ngâm và cố định trong đệm trung tính 10% formalin, và được làm lạnh.

Đo khối lượng của mỗi chuột trước khi bị làm chết bằng chảy máu. Không có sự thay đổi cụ thể về khối lượng của mỗi chuột nếu không xét đến lượng sử dụng hay số lần sử dụng peptit A2 này.

<Đo lượng ATP>

Thực hiện đo lượng ATP bằng cách sử dụng bộ dụng cụ thử nghiệm CellTiter-Glo (nhãn hiệu đã được đăng ký) (do Promega sản xuất). Đo khối lượng của phúc mạc đã được làm đông lạnh, và bổ sung thêm 10 lần lượng đệm CellTiter-Glo chứa mô đông lạnh này vào, và sau khi đồng nhất, thu lại váng này bằng cách ly tâm và sử dụng làm dịch thủy

phân. Bổ sung thêm lượng gấp đôi PBS và 2 lần Thuốc thử CellTiterGlo có lượng tương đương dịch thủy phân này vào dịch thủy phân này và khuấy để thu được dung dịch phản ứng, và giữ yên dung dịch phản ứng này ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Đo cường độ phát quang (RLU) của dung dịch phản ứng này sau khi giữ yên ở nhiệt độ phòng bằng cách sử dụng thiết bị đọc vi đĩa đa chế độ lai ghép Synergy H1 (do BioTek Corporation sản xuất). Thiết bị này thể hiện rằng cường độ phát quang của dung dịch phản ứng này là chỉ báo về lượng ATP, và cường độ phát quang của dung dịch phản ứng này càng nhỏ, lượng ATP này càng nhỏ, và hoạt tính diệt tế bào của peptit được đưa vào là mạnh. Tất cả các thử nghiệm được đo 3 lần ($n=3$) và giá trị trung bình được đánh giá là hoạt tính diệt tế bào của mỗi peptit.

Kết quả đo cường độ phát quang (RLU) của phúc mạc của mô hình chuột mắc bệnh lạc nội mạc tử cung đã được đưa peptit A2 vào một lần được thể hiện trong FIG. 8. Ngoài ra, kết quả đo cường độ phát quang (RLU) của phúc mạc của mô hình chuột mắc bệnh lạc nội mạc tử cung đã được đưa peptit A2 này lặp lại ba lần được thể hiện trong FIG. 9. Như được thể hiện trong FIG. 8 và FIG. 9, trong bất kỳ chuột nào trong số chuột đã được đưa thuốc vào một lần và chuột được thực hiện đưa thuốc vào nhiều lần, khẳng định rằng cường độ phát quang (RLU) của phúc mạc giảm xuống phụ thuộc vào lượng peptit A2 được sử dụng, và lượng ATP trong phúc mạc này giảm xuống. Lượng ATP này giảm trong phúc mạc này có nghĩa là số lượng tế bào sống của các tế bào A431-CNGB3-myc được cấy ghép vào trong phúc mạc này giảm. Từ kết quả này, có thể nói rằng các tế bào A431-CNGB3-myc trong ổ phúc mạc bị tiêu diệt bởi peptit A2 này, tức là, peptit A2 này có thể thể hiện tác dụng diệt tế bào trong môi trường *in-vivo*, và đặc biệt hữu dụng để làm tác nhân chữa bệnh cho bệnh lạc nội mạc tử cung.

<Nhuộm TUNEL>

Thực hiện nhuộm HE và nhuộm TUNEL trên phúc mạc này để chuẩn bị mẫu bệnh học được cố định với đệm trung tính 10% formalin. Kết quả là, khẳng định rằng nhóm sử dụng peptit A2 là phương pháp TUNEL (TdT-mediated Dntp nick end labeling) dương tính (không được minh họa), và peptit A2 này cảm ứng sự tự chết tế bào và thể hiện tác dụng diệt tế bào.

[Ví dụ 6]

Kiểm tra hoạt tính diệt tế bào của peptit A2 này (Peptit (14D + 5D)) đối với các tế bào A431-CNGB3-myc và chủng tế bào thu được từ các tế bào ung thư tử cung khác nhau.

Tế bào Ishikawa thu được từ bệnh ung thư tuyến hạch nội mạc tử cung người, tế bào SNG-II thu được từ bệnh ung thư nội mạc tử cung người, tế bào Hec-1A thu được từ bệnh ung thư thận tử cung người và tế bào RL95-2 thu được từ bệnh ung thư nội mạc tử cung người được sử dụng làm chủng tế bào thu được từ bệnh ung thư này. Các tế bào này được nuôi cấy theo cách thức giống như với các tế bào A431-CNGB3-myc.

Ba loại peptit bao gồm các trình tự axit amin được thể hiện trong Bảng 4 được sử dụng làm peptit xử lý mỗi tế bào. Trong ba loại peptit này, nhóm chức trình tự KLAK này và nhóm chức trình tự HLAH này được tổng hợp từ các D-axit amin, và nhóm chức peptit Z13 này được tổng hợp bằng các L-axit amin.

[Bảng 4]

	KLAK-HLAH-Z13	Seq.	Seq. số
A2	14D+5D+Z13	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHL-VRRADNRPG	26
A2-1	14D+Z13	KLAKLAK-KLAKLAK- VRRADNRPG	38
A2-2	5D+Z13	HLAHL-VRRADNRPG	39

Hoạt tính diệt tế bào của mỗi peptit được đánh giá theo cách thức giống như cách thức trong Ví dụ 1, ngoại trừ nồng độ cuối cùng của mỗi peptit được bổ sung vào mỗi tế bào được phân tán vào đĩa 96 lỗ này được thiết lập là 0 (không bổ sung thêm peptit vào), 2,34, 4,69, 9,38, 18,8, 37,5, 75,0, 150,0 hoặc 300,0 μ M. Cường độ phát quang tương đối (%) của mỗi dung dịch phản ứng trong trường hợp trong đó cường độ phát quang (RLU) của dung dịch phản ứng không được bổ sung thêm peptit vào được đặt là 100% được tính toán làm lượng ATP tương đối (%). Kết quả tính toán này được thể hiện trong các hình vẽ từ FIG. 10 đến FIG. 14. Trong hình vẽ này, “14D – Z13 + 5D -Z13” thể hiện lượng ATP tương đối của dung dịch phản ứng được bổ sung thêm cả peptit A2-1 và peptit A2-2, “14D – Z13” thể hiện lượng ATP tương đối của dung dịch phản ứng chỉ được bổ sung thêm peptit A2 -1, “5D – Z13” thể hiện lượng ATP tương đối của dung dịch phản ứng chỉ được bổ sung thêm peptit A2 - 2, và “14D – 5D – Z13” thể hiện lượng ATP tương đối (%) của dung dịch phản ứng chỉ được bổ sung thêm peptit A2, một cách tương ứng. Như được thể hiện trong các hình vẽ từ FIG. 10 đến FIG. 14, khẳng định rằng peptit A2 này có hoạt tính diệt tế bào đối với không chỉ các tế bào A431-CNGB3-myc mà còn đối với các chủng tế bào khác nhau thu được từ tế bào ung thư tử cung. Ngoài ra, trong tế bào được xử lý bằng cả peptit trong đó peptit KLAK này và peptit Z13 này được liên kết và peptit trong đó peptit HLAH này và peptit Z13 này được liên kết, tương tự với tế bào được xử lý chỉ bằng peptit trong đó peptit KLAK này và peptit Z13 này được liên kết và tế bào được xử lý chỉ bằng peptit trong đó peptit HLAH này và peptit Z13 này được liên kết, khó quan sát thấy hoạt tính diệt tế bào hoặc hoạt tính diệt tế bào rất yếu.

[Ví dụ 7]

Do các tế bào A431 là các chủng tế bào thu được từ bệnh ung thư tế bào giống như biểu mô, mô hình chuột mắc bệnh lạc nội mạc tử cung trong đó các tế bào A431-CNGB3-myc được cấy ghép vào trong ổ phúc mạc là chuột mắc bệnh ung thư. Ở đây, peptit

(IFLLWQR-RR-KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHL, SEQ ID số: 40) trong đó peptit thực hiện bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 và peptit IF7 được liên kết (sau đây, được gọi là “peptit IF7 (RR) - (K + H)”) được đưa vào ổ phúc mạc của mô hình chuột mắc bệnh lạc nội mạc tử cung này, và kiểm tra hoạt tính diệt tế bào đối với các tế bào ung thư. Trong peptit IF7 (RR) - (K + H), nhóm chức trình tự KLAK này và nhóm chức trình tự HLAH này được tổng hợp bằng các D-axit amin, và các nhóm chức peptit khác được tổng hợp bằng các L-axit amin.

<Đưa peptit vào qua tĩnh mạch đuôi>

50 μ L dung dịch thu được bằng cách hòa tan peptit IF7 (RR) – (K + H) trong dung dịch muối sinh lý được đưa vào trong mô hình chuột mắc bệnh lạc nội mạc tử cung sau 14 ngày tính từ khi cấy ghép các tế bào A431-CNGB3-myc này vào ổ phúc mạc một lần một ngày trong sáu ngày liên tiếp qua tĩnh mạch đuôi. Peptit IF7 (RR) – (K + H) được đưa vào sao cho lượng sử dụng trên thể trọng chuột là 0 μ g/cơ thể (mẫu đối chứng), 10 μ g/cơ thể hoặc 50 μ g/cơ thể.

Kết quả là, trong nhóm đối chứng không được sử dụng peptit ($n = 8$), số lượng chuột chết sau 24 ngày tính từ khi cấy ghép các tế bào A431-CNGB3-myc vào ổ phúc mạc là 1, và tỷ lệ sống là 88,9%. So với kết quả này, trong nhóm được sử dụng peptit IF7 (RR) – (K + H) với lượng peptit IF7 (RR) – (K + H) là 10 μ g/cơ thể/ngày hoặc 50 μ g/cơ thể ($n = 6$), tỷ lệ sống là 100%. Ngoài ra, tại thời điểm kết thúc thử nghiệm, sự lan rộng của các tế bào ung thư (các tế bào A431-CNGB3-myc) trong ổ phúc mạc của tất cả các chuột được kiểm tra. Ngược lại, trong nhóm đối chứng, các tế bào ung thư này lan rộng tương đối trong toàn bộ phúc mạc, và trong nhóm được sử dụng peptit IF7 (RR) – (K + H), sự lan rộng của các tế bào ung thư trong nhiều chuột bị hạn chế tương đối. Không có sự thay đổi cụ thể về khối lượng của mỗi chuột nếu không xét đến lượng sử dụng và số lần sử dụng peptit IF7 (RR) – (K + H). Từ kết quả này, ghi nhận rằng peptit IF7 (RR) – (K + H) được sử dụng qua tĩnh mạch có hoạt tính diệt tế bào đối với các tế bào ung thư và hữu dụng để làm thuốc chống ung thư.

[Ví dụ 8]

Peptit IF7 (RR) – (K + H) được sử dụng trong Ví dụ 7 được đưa vào qua tĩnh mạch cho chuột mắc bệnh ung thư trong đó khối u được tạo ra ở lưng, và kiểm tra hoạt tính diệt tế bào đối với các tế bào ung thư.

<Chuột có khối u dưới da mắc bệnh ung thư buồng trứng được chuyển gen Luciferaza (chuột OVCAR3-Luc)>

Sử dụng mô khối u thu được bằng cách nuôi cấy chủng tế bào ung thư buồng trứng đã được đưa gen luciferaza vào (các tế bào OVCAR3-Luc, được chuyển giao từ cơ sở khác) làm mô khối u cần được cấy ghép vào chuột. Thực hiện nuôi cấy các tế bào OVCAR3-Luc ở 37°C trong môi trường cacbon dioxit 5% thể tích bằng cách sử dụng môi trường RPMI

1640 (11875-093, gibe by life technologies) làm môi trường nuôi cấy.

Khoảng 1×10^6 tế bào OVCAR3-Luc được cấy ghép vào lưng của chuột SCID cái tám tuần tuổi (họ C.B-17/Icr-scid/scid Jcl, do CLEA Japan, Inc. cung cấp) để tạo ra chuột OVCAR3-Luc.

<Đưa peptit vào theo đường tĩnh mạch đuôi>

Theo cách thức giống như cách thức trong Ví dụ 7, 50 μL dung dịch thu được bằng cách hòa tan peptit IF7 (RR) – (K + H) trong dung dịch muối sinh lý được đưa vào trong chuột OVCAR3-Luc một lần một ngày trong sáu ngày liên tiếp qua tĩnh mạch đuôi. Peptit IF7 (RR) – (K + H) được sử dụng với lượng sử dụng trên thể trọng chuột là 0 $\mu\text{g}/\text{cơ thể}$ (mẫu đối chứng) hoặc 10 $\mu\text{g}/\text{cơ thể}$.

<Đo kích thước mô khối u>

Mỗi chuột được cho thử nghiệm hình ảnh phát quang, và đo số lượng photon của các khối u trên lưng và kích thước của mô khối u theo thời gian.

(1) Đo số photon

Tiến hành đo bằng cách sử dụng thiết bị hình ảnh phát quang *in vivo* (Xenogen IVIS-200, do Caliper Corporation sản xuất) bằng cách sử dụng cơ chế phát quang luciferin-luciferaza. Đầu tiên, 100 μL dung dịch 30 mg/mL kali D-luciferin (126-05116, do Wako Pure Chemical Industries, Ltd. sản xuất) được đưa vào ổ phúc mạc của chuột OVCAR 3-Luc. Sau 15 phút kể từ khi đưa vào, chuột này được đo bằng thiết bị hình ảnh phát quang *in vivo*, và đếm số lượng các photon.

(2) Đo thể tích khối u

Thể tích khối u được dự tính (mm^3) trên lưng của mỗi chuột OVCAR3-Luc thu được từ đường kính dài của khối của u bằng phương trình sau. Đường kính dài (mm) và đường kính ngắn (mm) của khối u được đo bằng cách sử dụng thước kẹp.

$$[\text{Thể tích khối u được dự tính } (\text{mm}^3)] = [\text{đường kính dài (mm)}] \times [\text{đường kính ngắn (mm)}] \times [\text{đường kính ngắn (mm)}] \times 1/2$$

FIG. 15 thể hiện sự thay đổi tạm thời về tỷ lệ tăng (%) của số lượng các photon của khối u trên lưng của mỗi chuột, và FIG. 16 thể hiện sự thay đổi tạm thời về tỷ lệ tăng (%) của thể tích khối u (mm^3) trên lưng của mỗi chuột. Cả tỷ lệ tăng của số lượng các photon và tỷ lệ tăng của thể tích khối u đều dựa vào giá trị của dung dịch peptit vào ngày trước ngày bắt đầu đưa vào (100%). Trong hình vẽ này, “việc điều trị” thể hiện thời gian điều trị trong đó dung dịch peptit này được đưa vào qua tĩnh mạch. Như được thể hiện trong FIG. 15, trong chuột được điều trị bằng peptit IF7 (RR) - (K + H), số lượng các photon hầu như không tăng trong suốt thời gian điều trị bằng peptit này, và tỷ lệ tăng sau thời gian điều trị bằng peptit này cũng nhỏ hơn so với nhóm đối chứng (nước muối). Ngoài ra, mặc dù không có sự chênh lệch về thể tích khối u giữa nhóm đối chứng này và nhóm

sử dụng peptit IF7 (RR) - (K + H) trong thời gian điều trị bằng peptit này, tỷ lệ tăng sau thời gian điều trị của nhóm được sử dụng peptit IF7 (RR) - (K + H) nhỏ hơn rõ ràng. Từ kết quả, có thể nói rằng việc sử dụng peptit IF7 (RR) - (K + H) có thể tiêu diệt mô khối u *in vivo*, và peptit này là hữu dụng để làm thuốc chống ung thư.

[Ví dụ tham chiếu 2]

Các lát cắt được vùi trong parafin của các mô ung thư của các bộ phận khác nhau được nhuộm miễn dịch bằng kháng thể kháng-CNGB3 để kiểm tra có hay không có biểu hiện CNGB3. Hai loại (OV20811 và OV2088) trong số bốn loại dây mô ung thư buồng trứng người có sẵn trên thị trường (Dây mô ung thư buồng trứng (do US Biomax sản xuất)) và hai loại (FDA800a và MC964a) trong số các dây mô ung thư (dây mô khối u nhiều bộ phận) của các bộ phận khác nhau được sử dụng làm các lát cắt mô này. Ngoài ra, trong số các kháng thể có sẵn trên thị trường, hai loại Biorbyt (Catalog No. orb 156415 BRT 100UG) (sau đây, đôi khi được gọi là “kháng thể orb”) và Osenses (Code; OSC00253W) (sau đây, được gọi là “kháng thể 253W”) được sử dụng làm kháng thể kháng CNGB3.

Thực hiện nhuộm miễn dịch các lát cắt mô như sau. Đầu tiên, lát cắt mô được vùi trong parafin được cho phản ứng với chất chặn để thử nghiệm tính miễn dịch lỏng (Immunoblock, do DS Pharma Biomedical Co., Ltd. sản xuất) trong 30 phút để chặn phản ứng không đặc hiệu, và sau đó thực hiện xử lý rửa hai lần bằng TBST (nước muối sinh lý đệm Tris (Tris buffer physiological saline) chứa Tween 20) trong 5 phút. Sau đó, lát cắt mô này được nhúng trong nước hydro peroxit 0,3%, được phản ứng trong 5 phút, được chặn đối với hoạt tính peroxidaza nội sinh, và được rửa hai lần trong 5 phút bằng TBST. Sau đó, lát cắt mô này được nhúng trong dung dịch hydro peroxit 0,3%, được phản ứng trong 5 phút, và sau đó được xử lý chặn hoạt tính peroxidaza trong. Sau đó, thực hiện xử lý rửa bằng TBST hai lần trong 5 phút. Sau đó, lát cắt mô này được nhúng trong dung dịch kháng thể gốc thu được bằng cách pha loãng kháng thể kháng CNGB3 này 100 lần với chất pha loãng kháng thể REAL (Code S2022, do Dako Corporation sản xuất) và được phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, và sau đó thực hiện xử lý rửa hai lần bằng TBST trong 5 phút. Ngoài ra, lát cắt mô này được phản ứng với kháng thể phụ được dẫn nhãn (EnVision + System-HRP-labeled Polymer anti-rabbit antibody, do Dako Corporation sản xuất) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, và sau đó thực hiện xử lý rửa hai lần bằng TBST trong 5 phút. Sau đó, xử lý lát cắt mô này bằng thuốc thử nhuộm màu DAB [DAB + Chất lỏng (kích thước lớn), RUO (K3468), do Dako Corporation sản xuất] trong 5 phút để tạo màu. Sau khi nhuộm màu DAB, lát cắt mô này được rửa bằng nước, được xử lý bằng hematoxylin của Mayer trong 2 phút để nhuộm nhân, và sau đó được bịt kín.

Kết quả nhuộm của OV20811 trong số các dây mô ung thư buồng trứng người được thể hiện trong các Bảng từ 5 đến 10, và kết quả nhuộm của OV2088 được thể hiện trong các Bảng từ 11 đến 16, một cách tương ứng. Kết quả nhuộm của FDA800a trong số các dây mô ung thư của các bộ phận khác nhau được thể hiện trong các Bảng 17 và 18, và

kết quả nhuộm của MC964a được thể hiện trong các Bảng từ 19 đến 21, một cách tương ứng. Trong các bảng này, trong cột của mỗi kháng thể kháng CNGB3, “+” có nghĩa là kết quả của nhuộm miễn dịch với kháng thể này, và “-” có nghĩa là kết quả của việc không nhuộm miễn dịch với kháng thể này, một cách tương ứng. Ghi nhận rằng phần lớn các lát cắt mô được nhuộm miễn dịch với kháng thể kháng CNGB3 và CNGB3 được biểu hiện.

[Bảng 5]

OV20811		Cấp độ	Giai đoạn	orb	253 W
1	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch	1	Ia	+	+
2	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch		I	-	-
3	Ung thư biểu mô tuyến (rải rác)	-	Ia	+	+
4	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	2	II	+	+
5	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú		Ia	-	+
6	Ung thư biểu mô tuyến thể nhú dạng nhầy	1	Ic	-	+
7	Ung thư biểu mô tuyến thể nhú dạng nhầy (mô và mạch máu xơ)	-	Ia	+	-
8	Ung thư biểu mô tuyến thể nhú dạng nhầy	1		+	-
9				-	-
10				+	+
11			IIa	+	+
12	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	2	Ic	+	+
13			Ib	+	-
14			IIIc	+	+
15				+	-
16			IV	+	-
17		3	Ic	+	+
18	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú (ung thư biểu mô hoại tử rải rác)	-	IIIa	+	+
19	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	3	Ic	+	+
20			Ib	+	+
21		2		-	+

22			IIb	+	+
23			Ia	+	+
24			IIb	+	+
25			Ib	+	+
26	Ung thư biểu mô tuyến thể nhú dạng nhầy	3		+	-
27			Ia	+	+
28			IIa	+	+
29			Ib	+	+
30	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	2	Ia	+	+
31			IIa	+	+
32		-	Ib	+	+
33		3	Ia	+	+
34		2	IIIc	+	+
35		2-3	II	+	+
36	Ung thư biểu mô tuyến thể nhú dạng nhầy	2	I	+	+
37	Ung thư biểu mô tuyến thể nhú dạng nhầy (hoại tử khối u)	-	Ib	-	-

[Bảng 6]

OV20811		Cấp độ	Giai đoạn	orb	253W
38	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	3	IIa	+	+
39			IV	+	+
40				+	+
41		2	Ib	+	+
42		2-3	Ia	-	+
43	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú (mô và mạch máu xơ)	-	IIIc	+	+
44	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	3	IV	+	+
45	Ung thư biểu mô tuyến thể nhú dạng nhầy		IIIc	+	+

46				+	+
47			Ia	+	+
48		-		+	+
49	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	1	IIIb	+	+
50		3	Ia	+	+
51			IIb	+	+
52	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch	2	II	+	+
53		3	Ia	+	+
54	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	2		+	+
55			IIa	+	+
56	Ung thư biểu mô tuyến thể nhú dạng nhầy	3	Ia	+	+
57	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú		II	+	+
58	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch	2	IIIc	+	+
59	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú		Ib	+	+
60	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú		IIIc	+	+
61	Ung thư biểu mô tuyến thể nhú dạng nhầy có hoại tử	3	Ia	+	+
62			IIa	+	+
63	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú		Ia	+	+
64		-	IIa	+	+
65	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch		Ia	+	+
66		3	II	+	+
67			Ib	+	+
68	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú		Ic	+	+
69		2	Ia	+	+
70		3		+	+
71	Ung thư biểu mô tuyến thể nhú dạng nhầy	-	Ib	+	+
72	Ung thư biểu mô tuyến thể nhú dạng nhầy (mô bạch thể)	-	Ia	+	+
73	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú (mô xơ)	-		+	+

74	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	3	III	+	+
----	--	---	-----	---	---

[Bảng 7]

OV20811		Cấp độ	Giai đoạn	orb	253W
75	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú (mô buồng trứng)	-	Ic	-	+
76	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	3	IIa	+	+
77				+	+
78			IIb	+	+
79			II	+	+
80			Ib	+	+
81				+	+
82	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú (mô buồng trứng)	-	II	+	+
83	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	3	Ia	+	+
84	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú (viêm cấp tính mô và mạch máu xơ)	-		+	+
85	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	3	Ib	+	+
86			I	+	+
87			Ia	+	+
88			I	+	+
89	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	2		+	+
90		3	II	+	+
91			Ic	-	+
92			Ib	+	+
93	Ung thư biểu mô tuyến (rải rác)	-	III	-	+
94	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	3	I	+	+
95			Ia	+	+
96			Ib	+	+

97	Ung thư biểu mô tuyến dạng nhầy		IIa	-	+
89			Ib	+	+
99			Ia	+	+
100			II	+	+
101	Ung thư biểu mô tuyến	2	Ia	+	+
102		1	Ib	+	+
103	Ung thư biểu mô tuyến nội mạc tử cung (hoại tử khối u)	-	II	-	-
104	Ung thư biểu mô tuyến nội mạc tử cung	1		+	+
105	Ung thư biểu mô tuyến nội mạc tử cung (hoại tử khối u)	-	Ic	-	-

[Bảng 8]

OV20811		Cấp độ	Giai đoạn	orb	253W
106	Ung thư biểu mô tuyến nội mạc tử cung	1	Ia	+	+
107	Ung thư biểu mô tuyến nội mạc tử cung (rải rác)		IIa	-	+
108			Ia	+	+
109			I	-	+
110				+	+
111			Ib	+	+
112			Ia	+	+
113			IIa	+	+
114			I	+	+
115			Ia	+	+
116		3	I	+	+
117		2	Ia	+	+
118	I		+	+	
119		3	IIa	+	+
120			IV	+	+

121		2	Ic	+	+	
122			IIc	+	+	
123		3	Ia	+	+	
124			Ic	+	+	
125			Ib	+	+	
126			IIa	+	+	
127	Ung thư biểu mô tế bào rõ ràng	-	I	-	-	
128				+	+	
129			Ung thư biểu mô tế bào rõ ràng (rải rác) có hoại tử khối lớn	IIIc	-	+
130			Ung thư biểu mô tế bào rõ ràng (rải rác) có hoại tử	I	+	+
131			Ung thư biểu mô tế bào rõ ràng		+	+
132					+	+
133			Ung thư biểu mô tế bào rõ ràng (hoại tử khối u)	II	-	-
134				Ic	+	+
135			Ung thư biểu mô tế bào rõ ràng	I	+	+
136					+	+
137	Ung thư biểu mô không biệt hóa				+	+
138			Ia	+	+	
139	Ung thư biểu mô tế bào có vảy từ sự chuyển hóa ác tính của u quái	1	I	+	+	
140		2	Ia	+	+	
141			IIa	+	+	
142			IIIc	+	+	
143			Ia	+	+	
144		3		+	+	

[Bảng 9]

OV20811	Cấp độ	Giai đoạn	orb	253W
145	Ung thư biểu mô tế bào có vảy	-	Ib	+

146	Ung thư biểu mô tế bào chuyển tiếp
147	
148	
149	
150	Ung thư biểu mô xoang nội bì
151	
152	
153	
154	
155	
156	
157	
158	
159	
160	
161	
162	
163	
164	U tế bào dạng hạt
165	
166	
167	
168	
169	
170	
171	
172	
173	
174	

	+	+
IIIc	+	+
Ia	-	+
	+	+
	-	+
IV	-	+
Ic	-	-
	-	+
Ib	-	+
I	-	+
	-	+
II	+	+
Ib	-	+
II	-	+
Ib	-	+
IV	-	-
Ia	+	-
	+	-
I	-	+
Ic	-	+
Ib	-	-
I	-	+
Ia	-	+
Ib	-	-
Ia	-	+
IIb	+	-
Ic	-	-
I	-	+
Ia	-	-

175			-	-
176			-	+
177			+	+
178			-	-

[Bảng 10]

OV20811		Cấp độ	Giai đoạn	orb	253W	
179	U tế bào dạng hạt	-	Ib	+	-	
180				-	-	
181			Ia	-	-	
182			II	-	+	
183			Ib	N.T.	+	
184	U nghịch mầm		Ia	+	+	
185			Ib	+	+	
186			Ia	+	+	
187				+	+	
188				+	-	
189			IIb	+	-	
190			Ia	-	-	
191			I	-	+	
192			Ia	-	-	
193				+	+	
194				-	-	
195			U tế bào Sertoli		+	+
196				Ic	-	-
197				I	-	-
198	U tế bào vỏ nang		Ia	-	-	
199				-	-	

200	U tế bào vỏ nang ác tính	Ib	-	+
201		III	-	-
202	U quái ác tính	Ia	-	+
203	U quái chưa thuần thực	Ib	-	-
204			-	-
205		I	-	-
206	U nguyên bào sinh dục nam nữ	Ia	-	-
207	Ung thư biểu mô xơ ác tính		-	-
208	U tế bào steroid không đặc hiệu ác tính		-	-

[Bảng 11]

OV2088		Cấp độ	Giai đoạn	orb	253W
1	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	1	Ia	+	+
2				+	+
3		2	Ib	+	+
4				-	-
5		1	Ia	-	+
6				-	+
7		2	Ib	+	+
8				+	+
9		1	Ia	-	-
10				-	-
11				-	+
12				-	+
13				-	-
14	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú (mô và mạch máu xơ)	-		-	-
15	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	1	Ic	-	-
16				-	-

17	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch	2		+	+
18			I	+	+
19				+	+
20		1		-	+
21			Ia	-	+
22				+	-
23			Ic	-	+
24				+	+
25			III	-	-
26	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú			-	-
27				-	+
28				-	+
29			Ia	-	+
30				-	-
31				-	-
32		2		-	-
33			Ib	+	+
34				+	+
35	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch có hoại tử		IIIa	-	-
36	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch (rải rác)			+	-
37			I	+	+
38	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú			+	+
39			Ib	+	+
40				+	-

[Bảng 12]

OV2088	Cấp độ	Giai đoạn	orb	253W
41	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch (rải rác)	2	Ib	-

42	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch (mô và mạch máu xơ)	-		-	-
43	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch	3	Ia	-	-
44				-	-
45		2		-	+
46				-	+
47	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch (mô và mạch máu xơ)	-		-	-
48				-	-
49	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch	3	Ib	+	+
50				+	+
51	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch (mô buồng trứng)	-		+	+
52				-	+
53	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	3	Ia	-	+
54				-	+
55		2	II	+	+
56				+	+
57		3	Ib	-	+
58				-	+
59				+	+
60				+	-
61		2	III	-	-
62				-	-
63			I	+	+
64				-	+
65	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch (mô hoại tử)	-		-	-
66				-	-
67	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch	3	Ib	-	+
68				+	+
69				+	+

70	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú (mô và mạch máu xơ)	-		+	+
71	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch (mô hoại tử)		Ic	-	+
72				-	+
73			III	-	+
74				-	-
75			II	+	+
76	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch	3		+	+
77			Ic	-	+
78				-	+
79			Ia	-	+
80				-	+

[Bảng 13]

OV2088		Cấp độ	Giai đoạn	orb	253W
81			IIc	+	+
82		3		+	+
83	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch		Ia	+	+
84				-	+
85		2	Ib	+	+
86	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch (mô buồng trứng)	-		-	+
87			II	+	+
88				+	+
89			I	-	+
90				-	+
91	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch	3	II	-	+
92				-	+
93			IV	+	-
94				+	-

95			II	-	+
96				-	+
97			IIa	-	+
89				-	+
99				-	-
100				+	+
101	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch (viêm cấp tính mô và mạch máu xơ)	-	Ia	+	+
102	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch	3		+	+
103	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch (mô và mạch máu	-	Ic	+	+
104	xơ)			-	+
105	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch		Ic	+	+
106				-	-
107	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	3	Ib	-	-
108				-	-
109			Ia	-	-
110	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch			-	-
111			Ib	-	+
112	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch (mô buồng trứng)	-		-	+
113			Ia	+	-
114				+	-
115				-	-
116	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch	3		-	+
117			I	-	-
118				-	+
119				-	+
120				-	-

[Bảng 14]

OV2088		Cấp độ	Giai đoạn	orb	253 W
121	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch kèm ung thư biểu mô tế bào rõ ràng	3	Ia	-	+
122				-	-
123	Ung thư biểu mô tuyến thể nhú dạng nhầy	1	I	-	-
124				-	-
125		2	Ic	-	-
126				-	+
127	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch thể nhú	1-2	II	-	-
128				-	-
129	Ung thư biểu mô tuyến thể nhú dạng nhầy	1	I	+	+
130				+	+
131			Ia	+	+
132				+	+
133		+		+	
134		+		+	
135	Ung thư biểu mô tuyến dạng nhầy	2		-	-
136				-	-
137		I	-	-	
138			-	-	
139	Ung thư biểu mô tuyến	3	Ia	-	-
140				-	-
141	Ung thư biểu mô tuyến từ sự chuyển hóa ác tính của u quái			-	-
142				-	-
143	Ung thư biểu mô tuyến			-	-
144				-	-

145	Ung thư biểu mô tuyến dạng nội mạc tử cung (rải rác)	-	Ib	+	+
146				+	+
147	Ung thư biểu mô tế bào có vảy từ sự chuyển hóa ác tính của u quái (u quái thuần thực rải rác)		IIIc	N.T.	N.T.
148				+	+
149	Ung thư biểu mô tế bào có vảy từ sự chuyển hóa ác tính của u quái	3	Ib	+	-
150	-			-	
151	Ung thư biểu mô tế bào có vảy			-	+
152				-	+
153	Ung thư biểu mô tế bào có vảy từ sự chuyển hóa ác tính của u quái		Ia	+	-
154				+	-
155	Ung thư biểu mô xoang nội bì	-		-	+
156				-	+
157			Ib	-	+
158				-	+
159				-	-
160				-	-

[Bảng 15]

OV2088		Cấp độ	Giai đoạn	orb	253W
161	Ung thư biểu mô lạc nội mạc tử cung	2	Ia	+	+
162				+	+
163	U tế bào dạng hạt	-		-	-
164				-	+
165				+	+
166				+	+
167			Ib	-	-
168				+	+
169				-	-

170				-	-
171	U tế bào vỏ nang - lớp hạt			-	-
172				-	-
173				-	-
174	U tế bào dạng hạt			-	-
175			Ia	-	+
176				-	+
177				+	-
178				+	-
179	Ung thư biểu mô tế bào rõ ràng	2	I	+	+
180				+	+
181		3		+	+
182				+	+
183	Ung thư biểu mô tế bào rõ ràng có hoại tử	2	IIIc	+	+
184				-	-
185	U nghịch mầm		I	-	+
186				-	+
187			Ia	+	+
188				+	+
189			Ib	-	-
190				-	-
191				-	+
192	U quái chưa thuần thực	-		-	-
193			Ia	-	+
194				-	-
195	Hội chứng carcinoid giáp (rải rác)		Ib	+	+
196				+	+
197	Ung thư biểu mô không biệt hóa có đặc điểm thần kinh nội tiết			+	-
198				+	-

199	Ung thư biểu mô tế bào chuyển tiếp	2		+	+
200				+	N.T.

[Bảng 16]

OV2088		Cấp độ	Giai đoạn	orb	253W
201	Canxinosacôm	-	Ia	-	-
202				-	-
203	-		-	-	
204			-	-	
205	Ung thư biểu mô phôi		Ia	-	-
206				N.T.	N.T.
207	U lympho tế bào B lớn lan tỏa		-	-	-
208				-	-

[Bảng 17]

FDA800a			orb	253W
1	Da	Ung thư biểu mô tế bào đáy của vùng da chằm	+	-
2		Ung thư biểu mô tế bào có vảy của thành ngực trái	+	-
3	Phổi	Ung thư biểu mô tế bào nhỏ	-	-
4		Ung thư biểu mô tuyến	+	-
5		Ung thư biểu mô tế bào có vảy	-	+
6		Ung thư biểu mô tế bào lớn	+	+
7		Ung thư tiểu phế quản-phế nang	-	-
8	Tinh hoàn	U tinh bào	+	-
9		U tinh bào	-	-
10		Ung thư biểu mô tuyến phôi	+	+
11	Tuyến tiền liệt	Ung thư biểu mô tuyến (cấp độ Gleason: 4; điểm Gleason: 4+5)	+	+
12		Ung thư mô liên kết	-	-

13	Túi mật	Ung thư biểu mô tuyến	+	+
14		Ung thư biểu mô vảy tuyến	+	-
15	Ruột non	Ung thư biểu mô tuyến	+	-
16		Ung thư ruột ác tính cấp độ thấp	-	+
17	Tuyến tụy	Ung thư biểu mô tuyến ống dẫn	+	+
18		Ung thư biểu mô tế bào đảo	-	+
19	Ruột kết	Ung thư biểu mô	+	+
20		Ung thư ruột ác tính cấp độ thấp	+	+
21	Trực tràng	Ung thư biểu mô tuyến	+	+
22		Ung thư ruột ác tính cấp độ thấp	-	-
23		Ung thư tế bào hắc tố ác tính	+	+
24	Thực quản	Ung thư biểu mô tế bào có vảy	+	+
25		Ung thư biểu mô tuyến	+	-
26	Ruột thừa	Ung thư biểu mô tuyến	+	+
27	Lưỡi	Ung thư biểu mô tế bào có vảy	+	+
28	Tuyến mang tai	Ung thư biểu mô nang dạng tuyến	+	+
29	Dạ dày	Ung thư biểu mô tuyến dạng nhầy	+	+
30	Gan	U nguyên bào gan	+	-
31		Ung thư biểu mô tế bào gan	+	+
32	Vú	Ung thư biểu mô ống dẫn tại chỗ	+	+
33		Ung thư biểu mô ống dẫn xâm lấn	+	+
34		Ung thư biểu mô ống dẫn tại chỗ	+	-
35		Ung thư biểu mô thể tử	N.T.	N.T.
36	Tử cung	Ung thư biểu mô nội mạc tử cung	+	+
37		Ung thư biểu mô tế bào rõ ràng có hoại tử (rải rác)	+	+
38		U xơ tử cung	-	-
39		Ung thư biểu mô tế bào có vảy	+	+
40	Cổ tử cung	Ung thư biểu mô tuyến loại nội mạc cổ tử cung	+	+

[Bảng 18]

FDA800a			orb	253W
41	Buồng trứng	Ung thư biểu mô tuyến dạng nhầy	-	+
42		Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch	+	+
43	Trung thất	U tuyến ức (tuýp B3)	+	+
44	Tuyến giáp	Ung thư biểu mô thể tủy	-	-
45		Ung thư biểu mô dạng nhú	+	+
46	Não	U màng não không điển hình	-	+
47		U màng não thất ác tính của thùy chẩm phải	-	-
48		U tế bào thần kinh đệm ít gai không biệt hóa có vôi hóa (rải rác)	-	-
49		U nguyên bào thần kinh đệm biến dạng được của thùy chẩm phải	+	-
50		U nguyên tủy bào tiểu não	+	-
51	Bàng quang	Ung thư biểu mô tế bào chuyển tiếp	-	-
52		Sacôm cơ trơn ác tính cấp độ thấp	+	-
53	Thận	Ung thư biểu mô tế bào chuyển tiếp	-	+
54		Ung thư biểu mô tế bào thận thể nhú	-	-
55		Ung thư biểu mô tế bào rõ ràng	+	+
56	Hạch bạch huyết	U lympho tế bào B lớn lan tỏa	+	-
57		U lympho tế bào B lớn lan tỏa đùi phải	-	-
58		U lympho tế bào B lớn lan tỏa hàm dưới	-	-
59		U lympho tế bào B lớn lan tỏa lá lách	-	-
60		U lympho Hodgkin xương đòn trái	-	-
61	Mô mềm	Sacôm cơ trơn thành ngực	-	-
62		Ung thư mô liên kết thể phôi chân trái	-	-
63	Khoang sau màng bụng	Ung thư mô liên kết	-	-
64		U ngoại bì thần kinh nguyên thủy	-	-
65	Thành bụng	Sacôm tế bào rõ ràng	+	+
66	Khoang sau	U nguyên bào thần kinh	-	-

	màng bụng			
67	Ổ phúc mạc	Sacôm mỡ thể nhầy	-	-
68	Khoang xương chậu	U sụn	+	+
69	Mô mềm	U xơ thần kinh lưng dưới bên phải	N.T.	N.T.
70	Khoang xương chậu	Sacôm hoạt dịch thành ngực phải	-	-
71	Xương	Sacôm xương xương đùi phải	-	-
72	Phúc mạc	U trung biểu mô ác tính	-	-

[Bảng 19]

MC964a			orb	253W
1	Não	U bào hình sao	+	-
2		U thần kinh đệm ít nhánh không biệt hóa	-	-
3		U màng não thất ác tính	+	-
4		U bào hình sao	+	-
5		U bào hình sao	+	-
6		U nguyên bào thần kinh đệm	+	+
7	Thực quản	Ung thư biểu mô tế bào có vảy (rải rác)	+	+
8		Ung thư biểu mô tế bào có vảy (rải rác)	+	+
9		Ung thư biểu mô tế bào có vảy	+	+
10	Dạ dày	Ung thư biểu mô	-	-
11		Ung thư biểu mô	+	+
12		U tế bào khe	+	+
13	Gan	Ung thư biểu mô tế bào gan	+	+
14		U đường mật	+	+
15		U nguyên bào gan	+	+
16	Ruột non	Ung thư biểu mô	+	+
17		U lympho tế bào B lớn lan tỏa	-	-
18		U tế bào khe	+	+

19		Ung thư biểu mô	+	+
20	Ruột kết	U tế bào khe	-	+
21		U lympho tế bào B lớn lan tỏa	-	-
22		Ung thư biểu mô	+	+
23	Trực tràng	U tế bào khe	+	+
24		U tế bào khe	+	-
25		Ung thư biểu mô tế bào đảo	+	+
26	Tuyến tụy	Ung thư biểu mô	+	+
27		Ung thư biểu mô	+	+
28	Màng nối lớn	Ung thư biểu mô di căn	+	+
29		U nghịch mầm di căn	-	+
30		U tế bào khe	-	-
31	Phổi	Ung thư biểu mô không biệt hóa tế bào nhỏ	-	-
32		Ung thư biểu mô không biệt hóa tế bào nhỏ	-	-
33		U carcinoid không điển hình	+	-
34		Ung thư biểu mô tế bào có vảy	+	+
35		Ung thư biểu mô	+	+
36		Ung thư biểu mô tế bào có vảy	+	+

[Bảng 20]

MC964a			orb	253W
37	Cổ tử cung - dạ con	Ung thư biểu mô tế bào có vảy	+	+
38		Ung thư biểu mô tế bào có vảy	+	+
39		Ung thư biểu mô tế bào có vảy	+	+
40	Tử cung	Ung thư biểu mô tuyến nội mạc tử cung	+	+
41		Ung thư biểu mô tuyến nội mạc tử cung	+	+
42		Ung thư biểu mô tế bào rõ ràng	-	+
43	Vú	Ung thư biểu mô tiểu thùy xâm lấn	+	-
44		Ung thư biểu mô ống dẫn xâm lấn	-	+

45		Sacôm nang diệp thể	-	-
46	Buồng trứng	Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch	-	-
47		Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch	-	+
48		Ung thư biểu mô tuyến thanh dịch	+	+
49	Lá lách	U lympho tế bào B lớn lan tỏa	+	-
50		U lympho không phải dạng Hodgkin lan tỏa	-	-
51		U lympho tế bào B lớn lan tỏa	+	+
52	Tuyến tiền liệt	Ung thư biểu mô (cấp độ Gleason: 3; điểm Gleason:3+4)	+	+
53		Ung thư biểu mô (cấp độ Gleason: 3; điểm Gleason:3+3)	+	+
54		Ung thư biểu mô (cấp độ Gleason: 3; điểm Gleason:2+3)	-	+
55	Tinh hoàn	U tinh có hoại tử	-	+
56		U lympho tế bào B lớn lan tỏa	-	-
57		Ung thư biểu mô tuyến phôi	+	+
58	Thận	Ung thư biểu mô tế bào rõ ràng	-	+
59		Ung thư biểu mô tế bào rõ ràng	-	+
60		Ung thư biểu mô dạng sacôm	-	-
61	Bàng quang	Ung thư biểu mô tế bào chuyển tiếp	+	+
62		Ung thư biểu mô tuyến dạng nhầy	+	+
63		Sacôm cơ trơn	+	+

[Bảng 21]

MC964a			orb	253W
64	Hạch bạch huyết	U lympho Hodgkin cổ	+	+
65		U lympho Hodgkin cổ	-	+
66		U lympho tế bào B lớn lan tỏa háng trái	-	-
67		U lympho tế bào B lớn lan tỏa khớp khuỷu tay nhẹ	-	-
68	Trung thất	U lympho tế bào T lan tỏa ở trung thất	-	-
69	Mạc treo ruột	U lympho tế bào B lớn lan tỏa mạc treo ruột	+	-

70	Xương	Sacôm xương chân trái	+	+
71		Sacôm xương xương đùi phải	-	+
72		Sacôm xương xương đùi phải	-	+
73		Sacôm sụn biệt hóa ngược gần xương cùng	-	-
74		Sacôm sụn xương đùi phải biệt hóa tốt	+	+
75		Sacôm sụn trung mô gần xương cùng	+	-
76	Da	Ung thư biểu mô tế bào có vảy ở cằm	+	+
77	Lưỡi	Ung thư biểu mô tế bào có vảy ở môi	+	+
78	Mũi	Ung thư biểu mô tế bào có vảy ở mũi	+	+
79	Lưỡi	Ung thư biểu mô tế bào có vảy ở họng	+	+
80	Thanh	Ung thư biểu mô tế bào có vảy ở thanh quản	+	+
81	quang	Ung thư biểu mô tế bào có vảy ở thanh quản	+	+
82	Họng	U lympho tế bào B lớn lan tỏa ở họng	-	-
83	Họng	Ung thư biểu mô tế bào có vảy ở thanh quản	+	+
84	Mũi	Ung thư biểu mô tế bào có vảy ở mũi hầu	-	-
85	Lưỡi	Ung thư biểu mô tế bào có vảy	+	+
86		Ung thư mô liên kết thể phổi	-	+
87		Ung thư biểu mô tuyến nước bọt	+	+
88	Mô mỡ	Sacôm mỡ dạng nhầy ở chân trái	+	+
89	Mô xơ	U xơ phân lập thành ngực	-	-
90		Sacôm xơ cẳng tay trái	+	+
91	Tuyến giáp	Ung thư biểu mô thể tùy	+	+
92		Ung thư biểu mô dạng nhú	+	+
93		U lympho tế bào B lớn lan tỏa	-	-
94	Da	Ung thư tế bào hắc tố ác tính mép hậu môn	+	+
95		Ung thư biểu mô tế bào đáy da đầu	-	-
96		Ung thư biểu mô tế bào có vảy của thành ngực trái	+	+

[Ví dụ 9]

Đo lượng CNGB3 trong các exosome được phân lập từ máu để kiểm tra xem liệu có thể phân biệt bệnh nhân mắc bệnh biểu hiện cao CNGB3 với người không mắc bệnh biểu hiện cao CNGB3 hay không. Các thử nghiệm sau được thực hiện với sự phê duyệt của Hội đồng đánh giá thể chế của Trường đại học Y khoa Hamamatsu (Hamamatsu Medical University Institutional Review Board).

<Mẫu huyết thanh>

Máu được thu thập từ hai người khỏe mạnh (những người không có khối u, chưa từng được xác nhận là bị lây nhiễm bất kỳ bệnh nào và được dự đoán là khỏe mạnh) và các bệnh nhân từ Trường Y thuộc Đại học Y khoa Hamamatsu (Hamamatsu Medical University School of Medicine) (ba bệnh nhân mắc bệnh ung thư buồng trứng, ba bệnh nhân mắc bệnh ung thư tử cung, ba bệnh nhân mắc bệnh ung thư vú, một bệnh nhân mắc bệnh ung thư cổ tử cung, hai bệnh nhân mắc bệnh ung thư ruột kết, ba bệnh nhân mắc bệnh lạc nội mạc tử cung, và một bệnh nhân mắc bệnh cơ tuyến tử cung) được ly tâm và bảo quản các phần huyết thanh thu được ở -80°C . Các bệnh nhân mắc bệnh cơ tuyến tử cung là các bệnh nhân mắc cả bệnh lạc nội mạc tử cung và u xơ tử cung.

<Tách exosome >

Exosome được phân lập từ huyết thanh này bằng cách sử dụng bộ dụng cụ phân lập exosome (Exosome Isolation Kit) (do Fujifilm Wako Pure Chemical Industries, Ltd. sản xuất) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể là, đầu tiên, huyết thanh được ly tâm ở tốc độ $1,000 \times g$ ở 4°C trong 20 phút, và thu lại váng này. Ly tâm váng thu thập được ở tốc độ $10,000 \times g$ ở 4°C trong 30 phút, và chuyển váng này vào ống mới. Sau đó, trộn 1,0 mL váng này với các hạt bắt exosome bằng máy quay ở 4°C trong 180 phút. Sau đó, sau khi rửa các hạt bắt này, rửa giải exosome này bằng 100 μL đệm rửa giải và bảo quản ở -20°C .

<Tổng hợp peptit>

Sử dụng peptit được tổng hợp bởi GenScript Inc. làm peptit Z13 được biotin hóa (peptit bao gồm các L-axit amin) trong đó biotin được liên kết với peptit Z13 (VRRADNRPG: SEQ ID số: 3).

<Thấm avidin >

Trộn exosome được phân lập từ 800 μL huyết thanh với đệm Laemmli được cô đặc để điều chế mẫu đo. Mẫu đo này được phân lập bởi SDS-PAGE và sau đó được chuyển vào màng PVDF. Màng PVDF này được chặn trong TBST có chứa 5% BSA (0,1 % theo thể tích Tween-20) ở nhiệt độ phòng trong 60 phút. Màng PVDF này sau khi thấm được rửa và được nuôi cấy qua đêm ở 4°C trong TBST có chứa peptit Z13 được biotin hóa với nồng độ 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Sau đó, màng này được rửa bằng TBST, và sau đó được nuôi cấy ở nhiệt độ phòng trong 60 phút trong TBST có chứa avidin liên kết HRP (peroxidaza củ cải ngựa) với nồng độ 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (do Thermo Fisher Scientific sản xuất). Phát hiện CNGB3 trên màng này bằng cách sử dụng hệ thống camera CCD (do ATTO sản xuất) và đoạn môi

ECL (do GE Healthcare sản xuất). Thực hiện phân tích đo mật độ bằng cách sử dụng phần mềm phân tích hình ảnh “CS Analyzer 4” (do ATTO sản xuất).

<Phân tích thống kê>

Tất cả các phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm thống kê trung bình “GraphPad Prism 6” (do GraphPad Software Corporation sản xuất).

Cường độ tín hiệu của dải CNGB 3 và giá trị tương đối của dải này (giá trị tương đối với cường độ tín hiệu của người khỏe mạnh 1 là 1) thu được trong kết quả của thâm auidin của mỗi mẫu đo được thể hiện trong Bảng 22. Tuy nhiên, do các bệnh nhân ung thư vú 1 và 2 có thể chỉ đảm bảo lượng nhỏ huyết thanh, các exosome được phân lập từ 100 μ L huyết thanh được sử dụng, và bệnh nhân ung thư vú 3 được sử dụng các exosome được phân lập từ 37,5 μ L huyết thanh. Vì lý do này, cường độ tín hiệu của các mẫu bệnh nhân ung thư vú được điều chỉnh bằng cách nhân với với số nghịch đảo của lượng huyết thanh sử dụng.

[Bảng 22]

Mẫu đối tượng	Cường độ tín hiệu	Cường độ tín hiệu tương đối
Người khỏe mạnh 1	1082305	1,00
Người khỏe mạnh 2	1188517	1,10
Bệnh nhân ung thư buồng trứng 1	4377691	4,04
Bệnh nhân ung thư buồng trứng 2	3907260	3,61
Bệnh nhân ung thư buồng trứng 3	3620987	3,35
Bệnh nhân ung thư thân tử cung 1	2681313	2,48
Bệnh nhân ung thư thân tử cung 2	2939504	2,72
Bệnh nhân ung thư thân tử cung 3	14049406	12,98
Bệnh nhân ung thư vú 1	18864576	17,43
Bệnh nhân ung thư vú 2	41851784	38,67
Bệnh nhân ung thư vú 3	20114133	18,58
Bệnh nhân ung thư cổ tử cung dạ con 1	3480924	3,22
Bệnh nhân ung thư ruột già 1	6057912	5,60

Bệnh nhân ung thư ruột già 2	2285673	2,11
Bệnh nhân lạc nội mạc tử cung 1	13117100	12,75
Bệnh nhân lạc nội mạc tử cung 2	4358049	4,24
Bệnh nhân lạc nội mạc tử cung 3	3454806	3,36
Bệnh nhân cơ tuyến tử cung 1	5835780	5,67

Kết quả là, trong tất cả các mẫu, phát hiện thấy dải của CNGB3, và khẳng định rằng CNGB3 có chứa trong các exosome này. Lượng CNGB3 của các exosome được phân lập từ các bệnh nhân ung thư, các bệnh nhân lạc nội mạc tử cung và các bệnh nhân cơ tuyến tử cung lớn hơn gấp hai lần các exosome được phân lập từ người khỏe mạnh. Từ kết quả này, khẳng định rằng trong các exosome được phân lập từ huyết thanh của các bệnh nhân có biểu hiện cao CNGB3 trong các tế bào gây bệnh của các bệnh nhân này, chẳng hạn như các bệnh nhân có khối u, các bệnh nhân lạc nội mạc tử cung, và các bệnh nhân mắc bệnh cơ tuyến tử cung, chứa lượng CNGB3 lớn hơn đáng kể so với trong các exosome được phân lập từ huyết thanh, và do đó, bằng cách thiết lập giá trị chuẩn thích hợp (giá trị cắt), có thể đánh giá khả năng mắc bệnh biểu hiện cao CNGB3 dựa vào lượng CNGB3 trong các exosome này.

Ngoài ra, khẳng định rằng CNGB3 thậm chí còn xuất hiện trong các exosome của người khỏe mạnh, mặc dù với lượng rất nhỏ. Điều này có thể là do phân tử có tính chất liên kết cao với CNGB3 chẳng hạn như peptit liên kết CNGB3 được sử dụng để phát hiện CNGB3 của các exosome trong huyết thanh với độ nhạy rất cao. Do có thể phát hiện các exosome bao gồm CNGB3 được giải phóng từ lượng cực kỳ nhỏ của các tế bào ung thư trong cơ thể của những người khỏe mạnh, có thể dự đoán rằng cũng có thể phát hiện trước không chỉ bệnh ung thư mà còn bệnh ung thư giai đoạn sớm ngay cả trong trường hợp trong đó các exosome trong huyết thanh được thiết lập làm các mẫu xét nghiệm bằng cách sử dụng peptit liên kết CNGB3.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chất diệt tế bào bao gồm:

peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1; và

vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích, vị trí này được liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp qua cầu nối với peptit này,

trong đó peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 này không chứa alanin được liên kết với đầu tận cùng C của peptit này.

2. Chất diệt tế bào theo điểm 1, trong đó phân tử đích này là phân tử có trên bề mặt của tế bào hoặc mô.

3. Chất diệt tế bào theo điểm 1, trong đó peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 này là

peptit chỉ bao gồm các L-axit amin,

peptit trong đó, trong trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 này, các axit amin từ thứ 1 đến thứ 14 là các D-axit amin, và các axit amin từ thứ 15 đến thứ 19 là các L-axit amin,

peptit trong đó, trong trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 này, các axit amin từ thứ 1 đến thứ 14 này là các L-axit amin, và các axit amin từ thứ 15 đến thứ 19 này là các D-axit amin, hoặc

peptit chỉ bao gồm các D-axit amin.

4. Chất diệt tế bào theo điểm 1, trong đó

vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích này là peptit hoặc protein, và

peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 này và vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích này được liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp với nhau.

5. Chất diệt tế bào theo điểm 1, trong đó phân tử đích này là kênh nucleotit tuần hoàn beta 3 (cyclic nucleotide-gated channel beta 3 - CNGB3) hoặc annexin I.

6. Chất diệt tế bào theo điểm 1, trong đó

vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích này là peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 2, và

vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích này được liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp với đoạn phía sau của peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 này.

7. Chất diệt tế bào theo điểm 1, trong đó

vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích này là peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 7, và

peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 này được liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp với đoạn phía sau của vị trí liên kết chọn lọc với phân tử đích này.

8. Chất diệt tế bào theo điểm 1, chất này là tác nhân chữa bệnh cho bệnh do sự tăng sinh bất thường của tế bào.

9. Chất diệt tế bào theo điểm 8, trong đó bệnh này là bệnh lạc nội mạc tử cung hoặc bệnh ung thư.

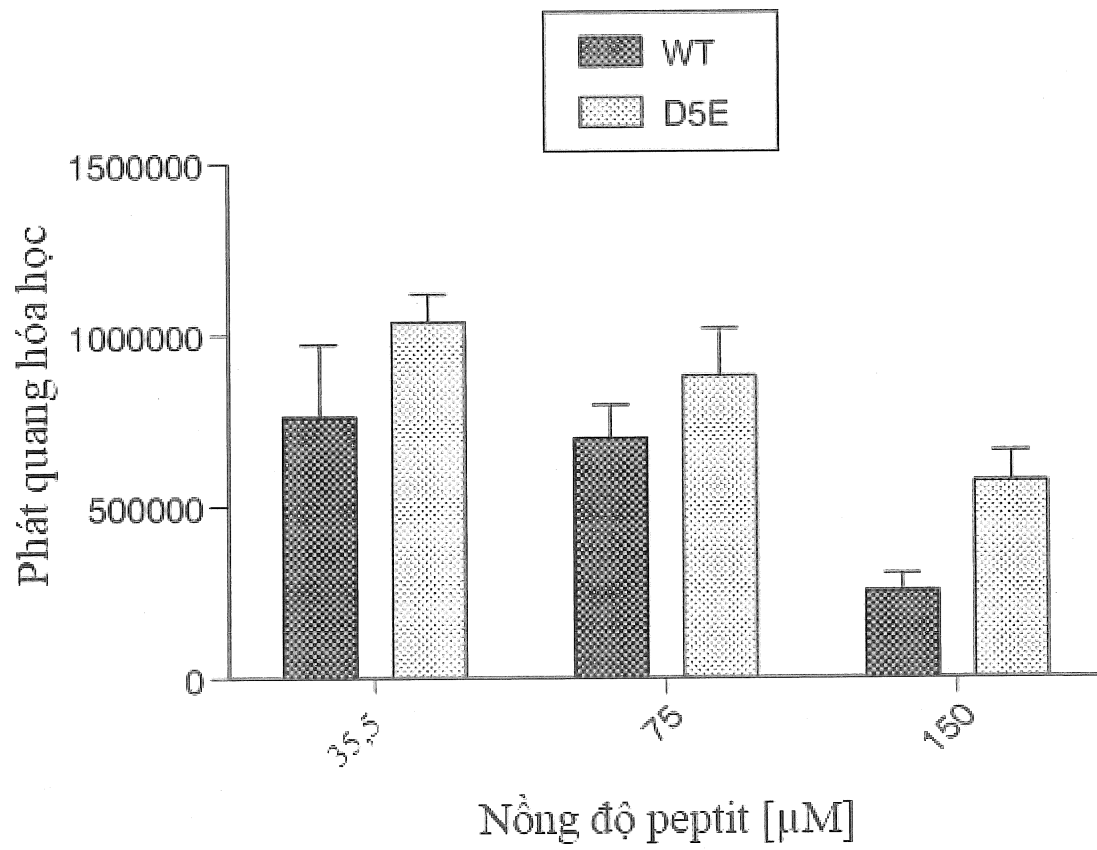


FIG. 1

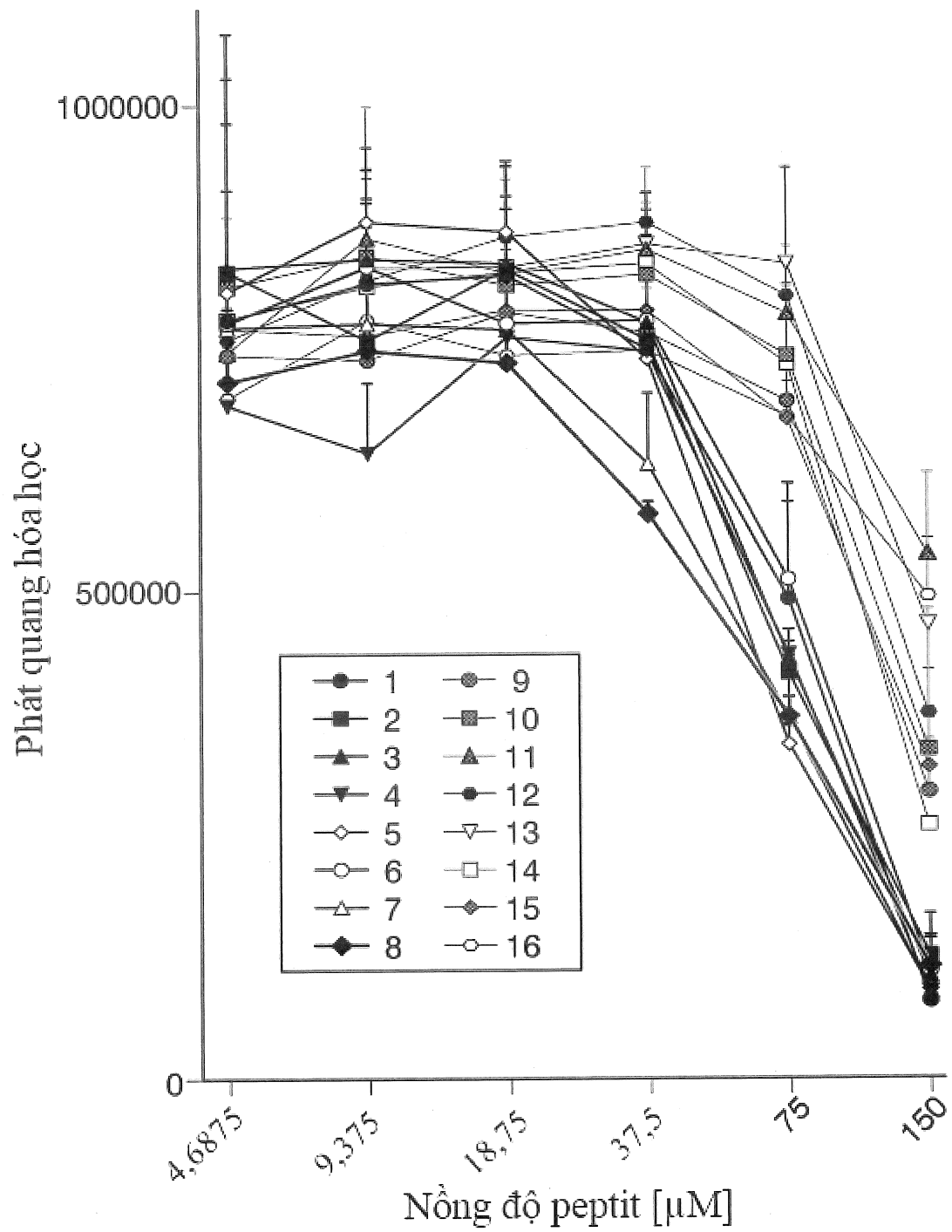


FIG. 2

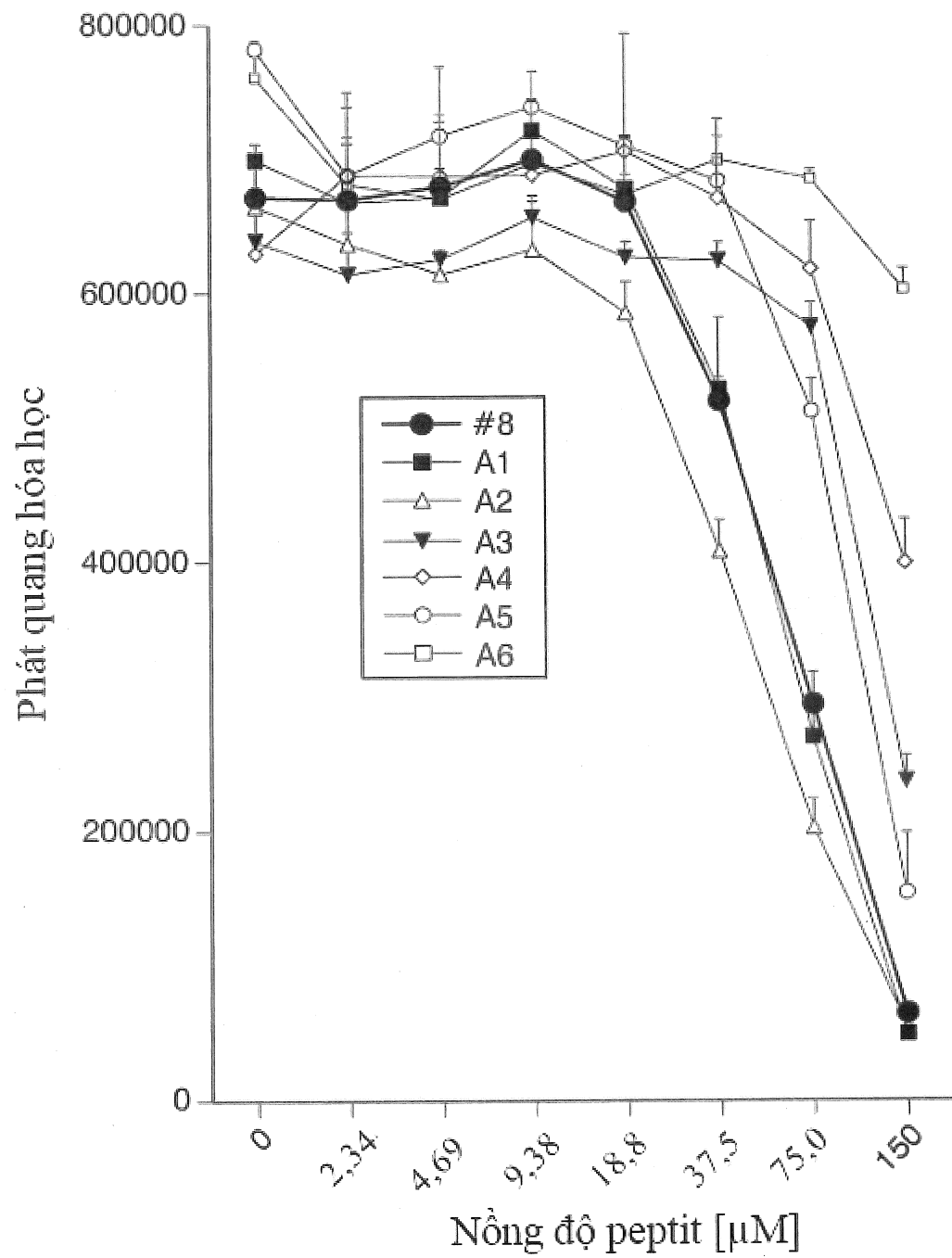


FIG. 3

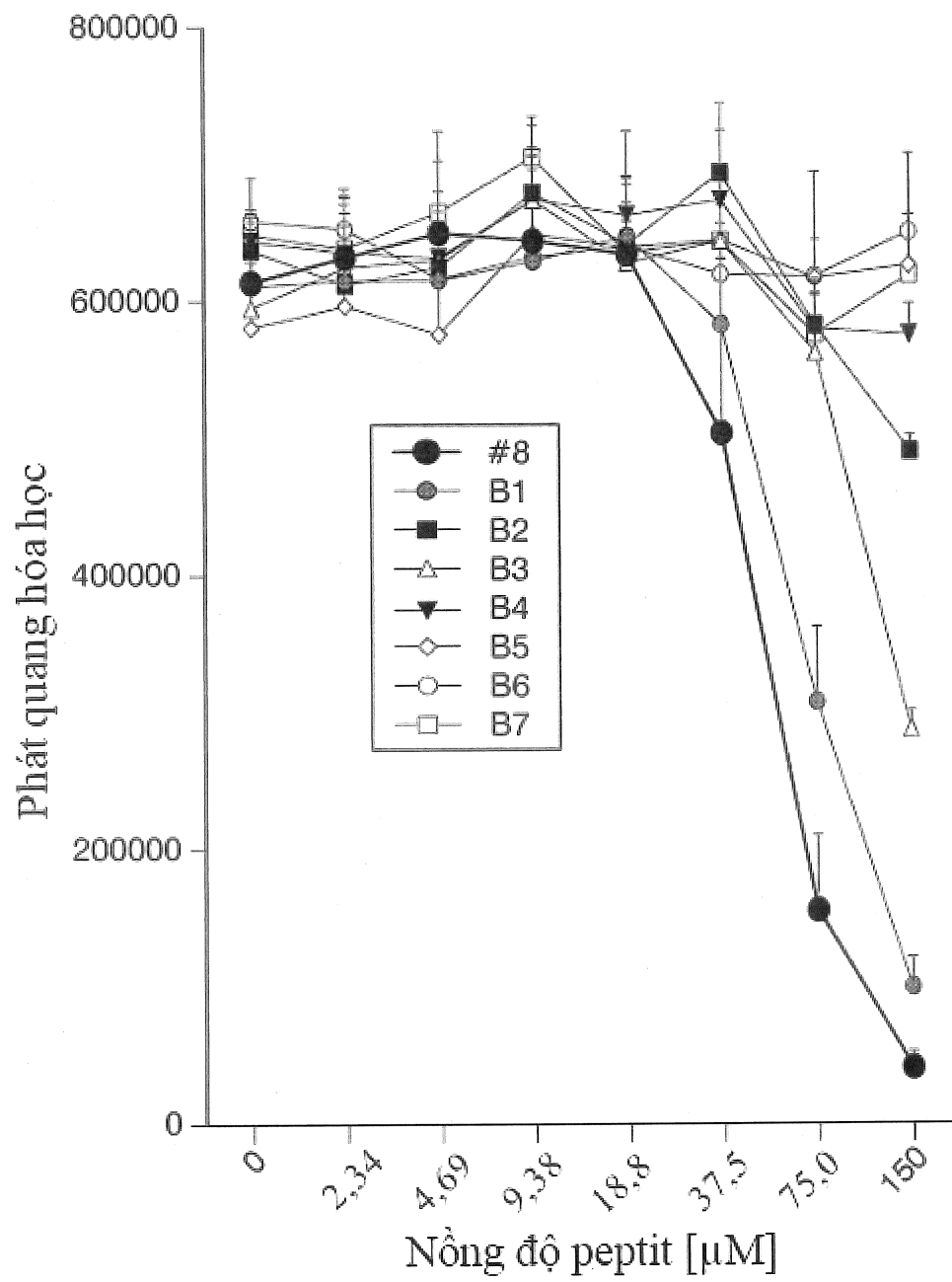


FIG. 4

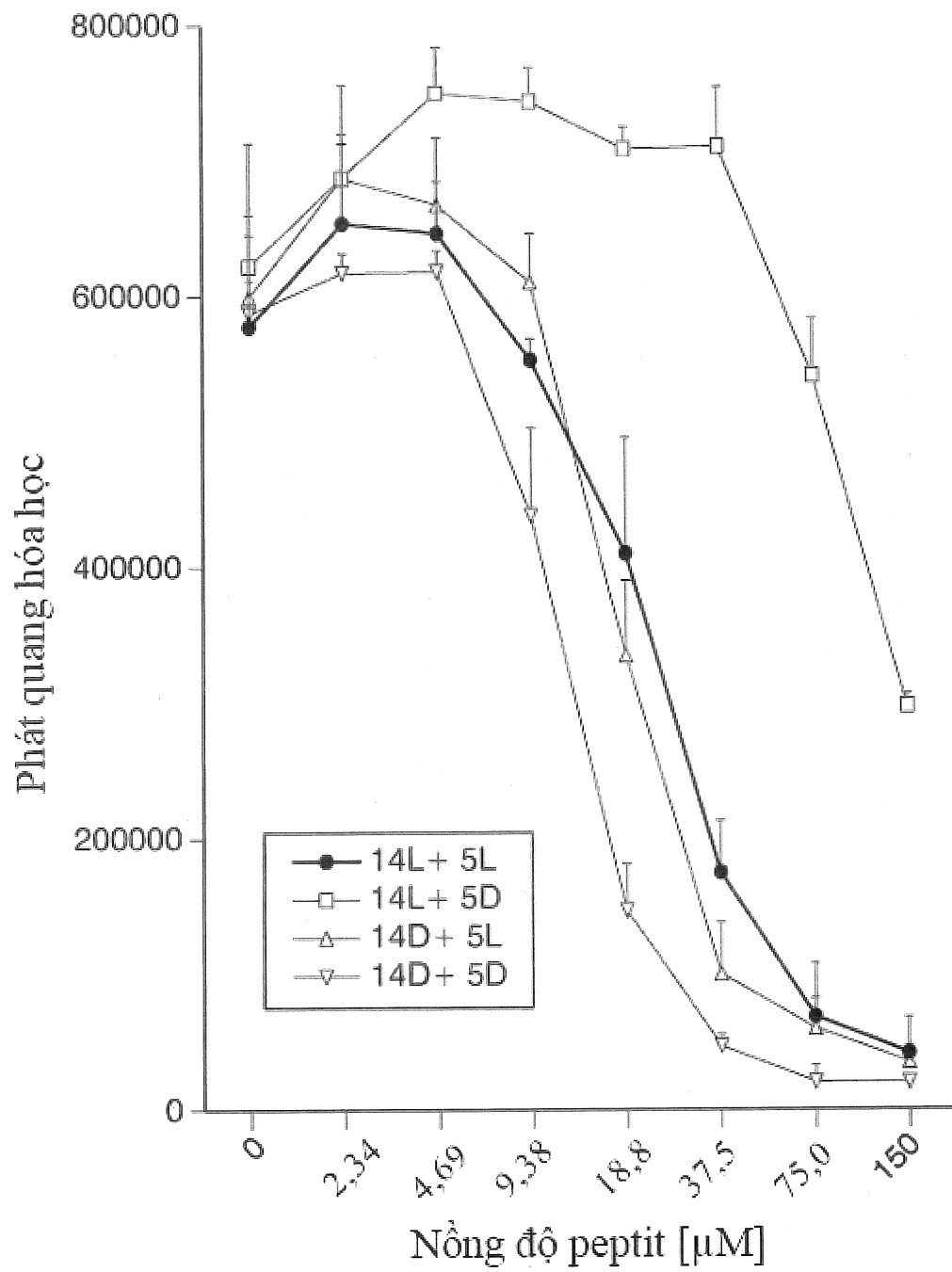


FIG. 5

Các tế bào sống

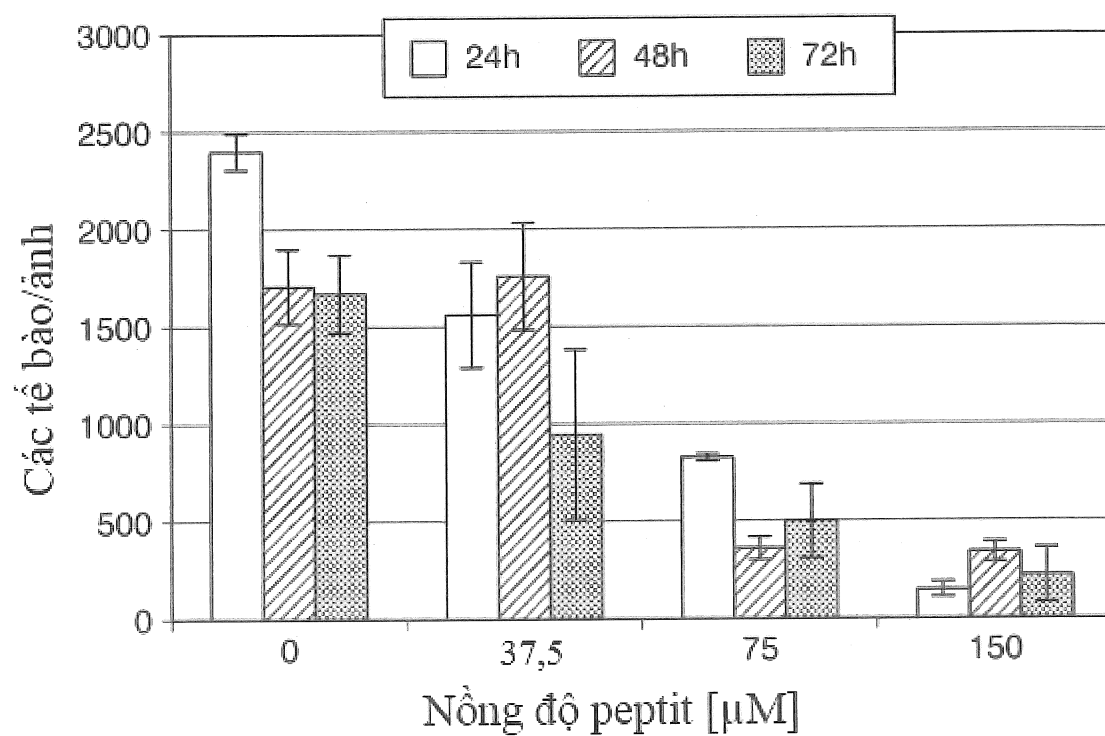


FIG. 6

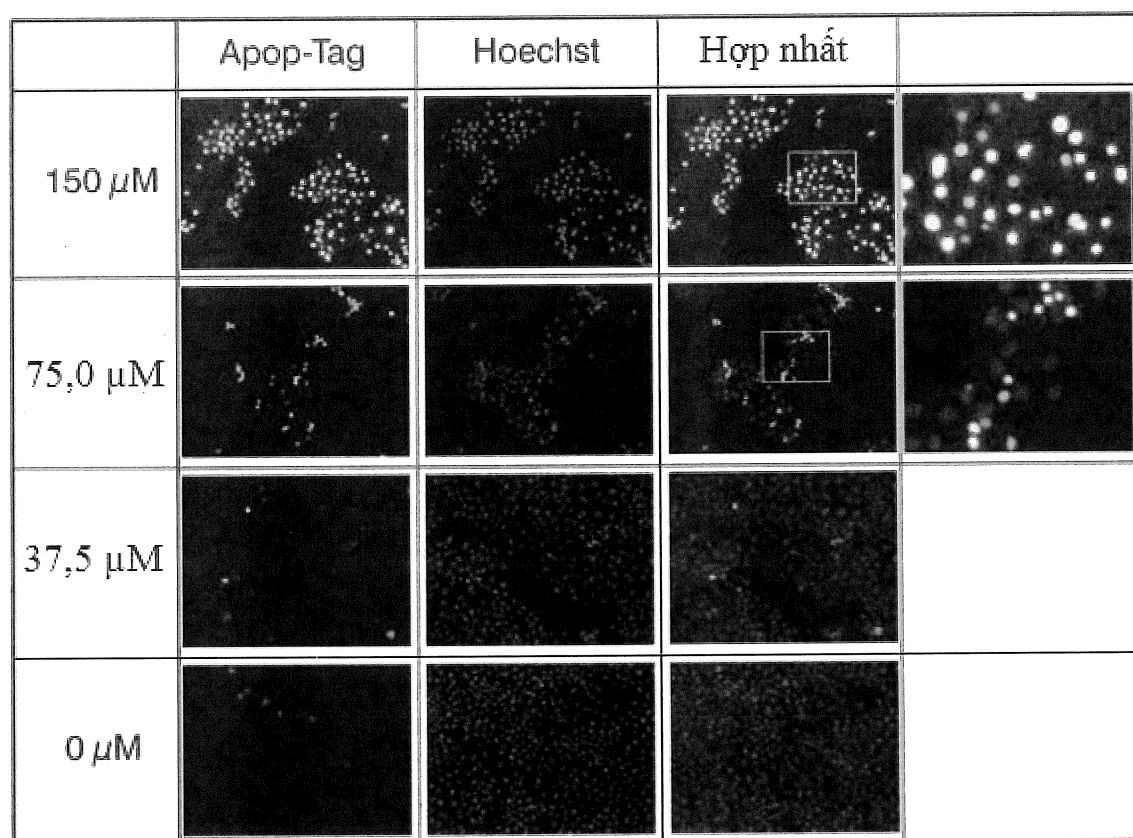


FIG. 7

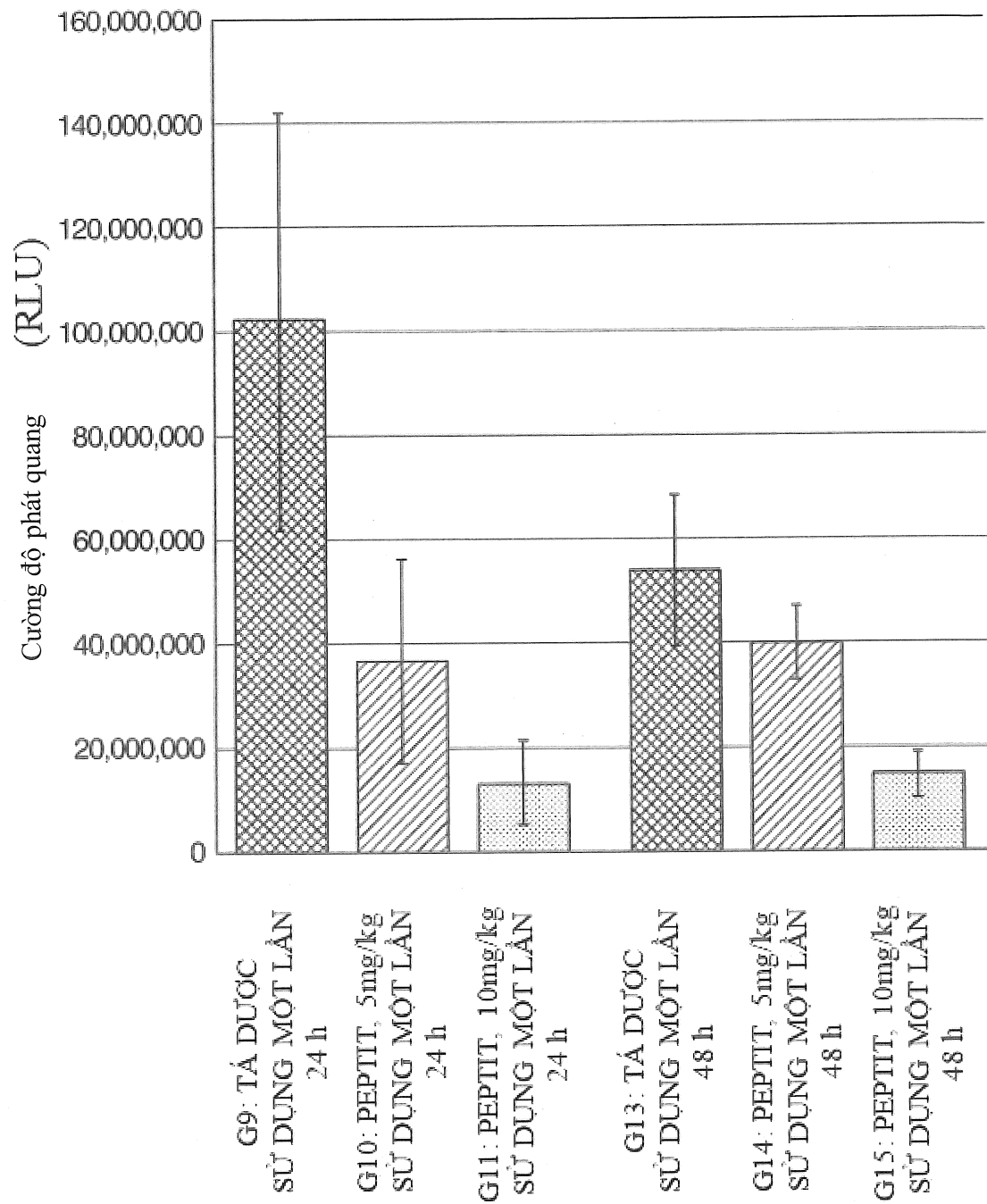


FIG. 8

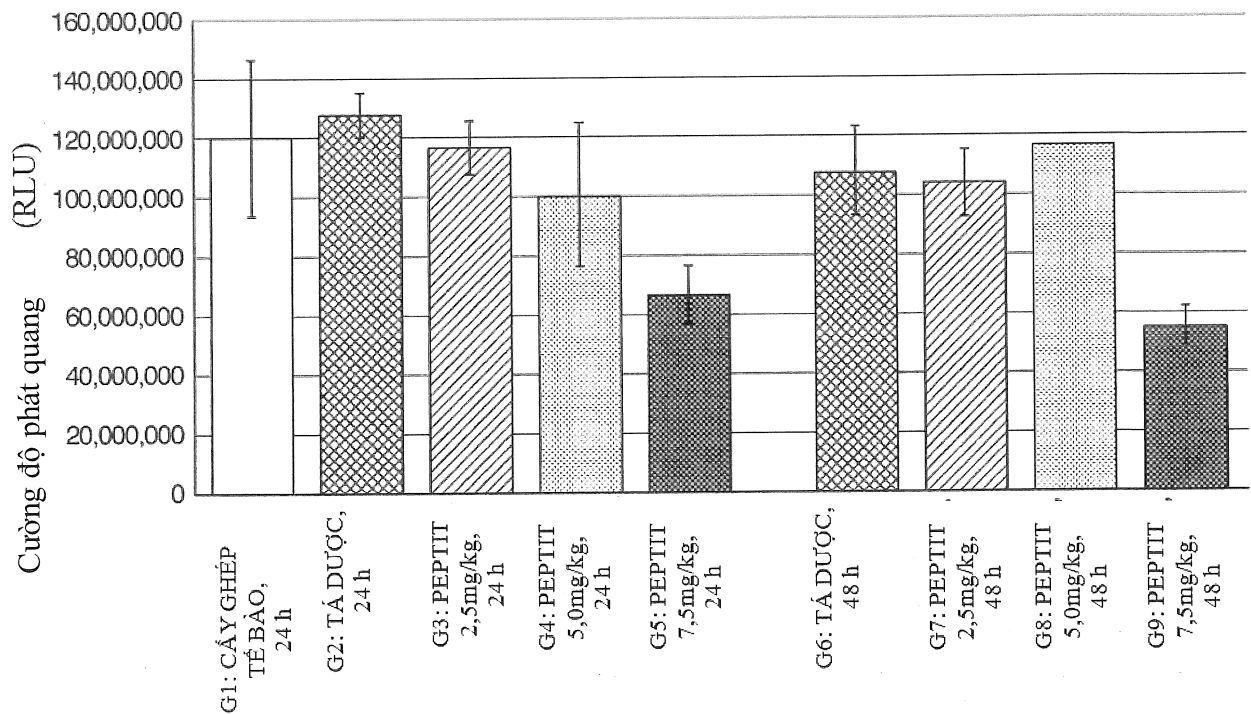


FIG. 9

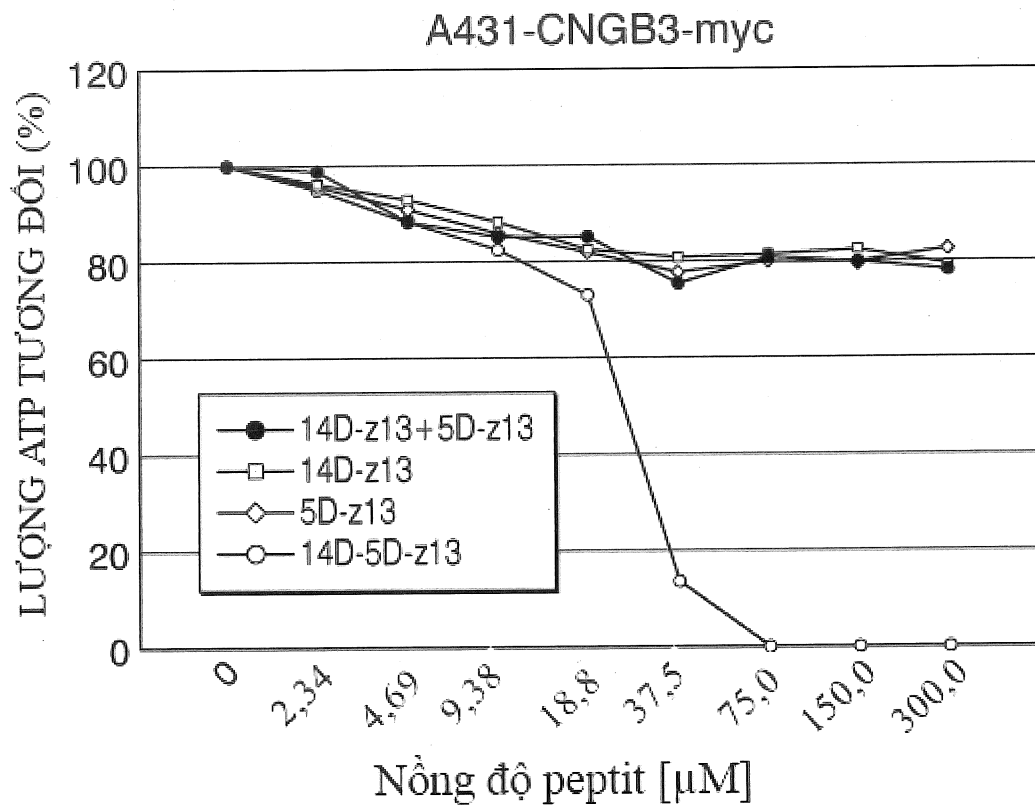


FIG. 10

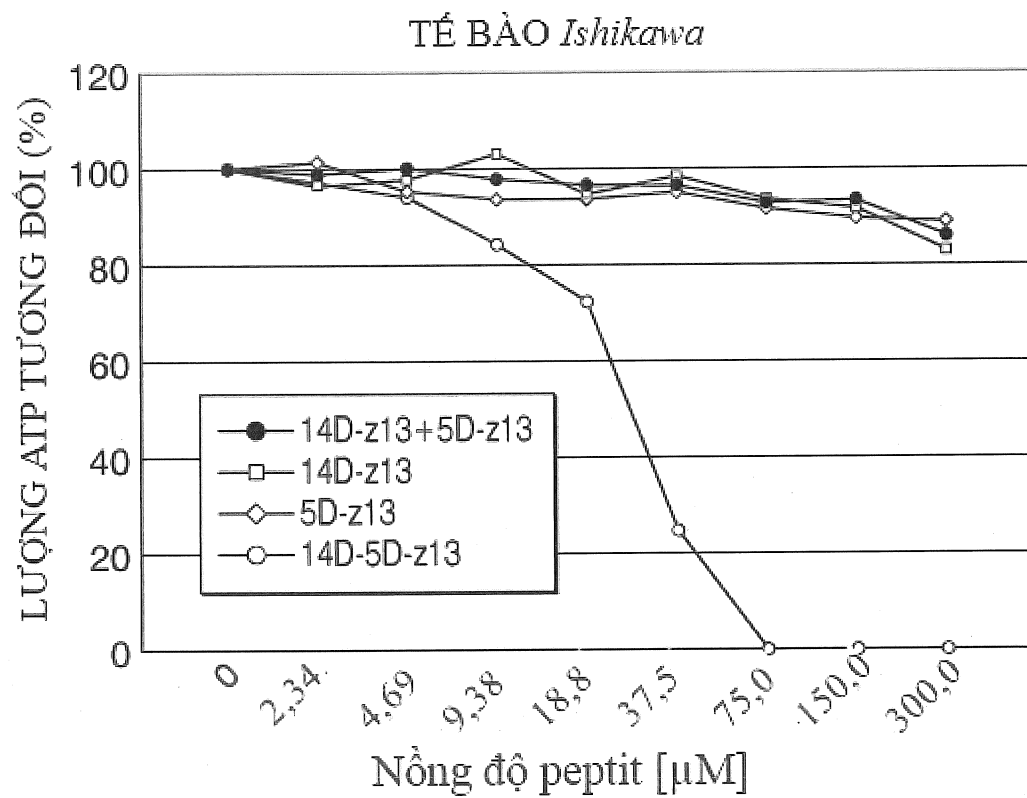


FIG. 11

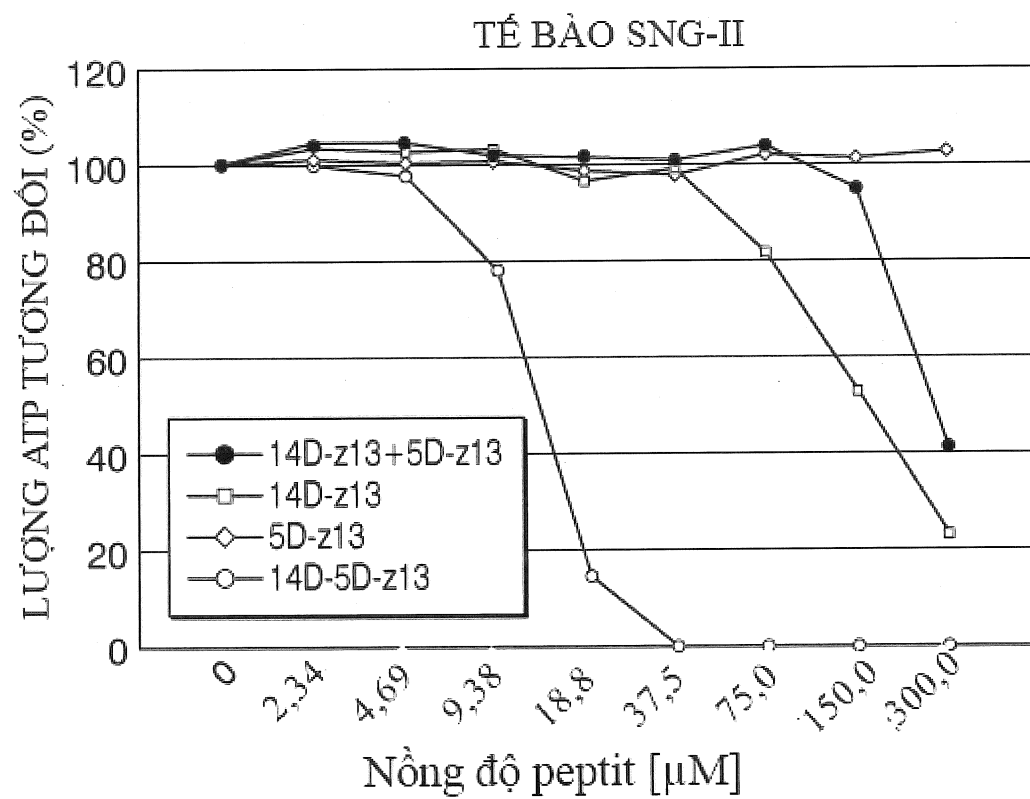


FIG. 12

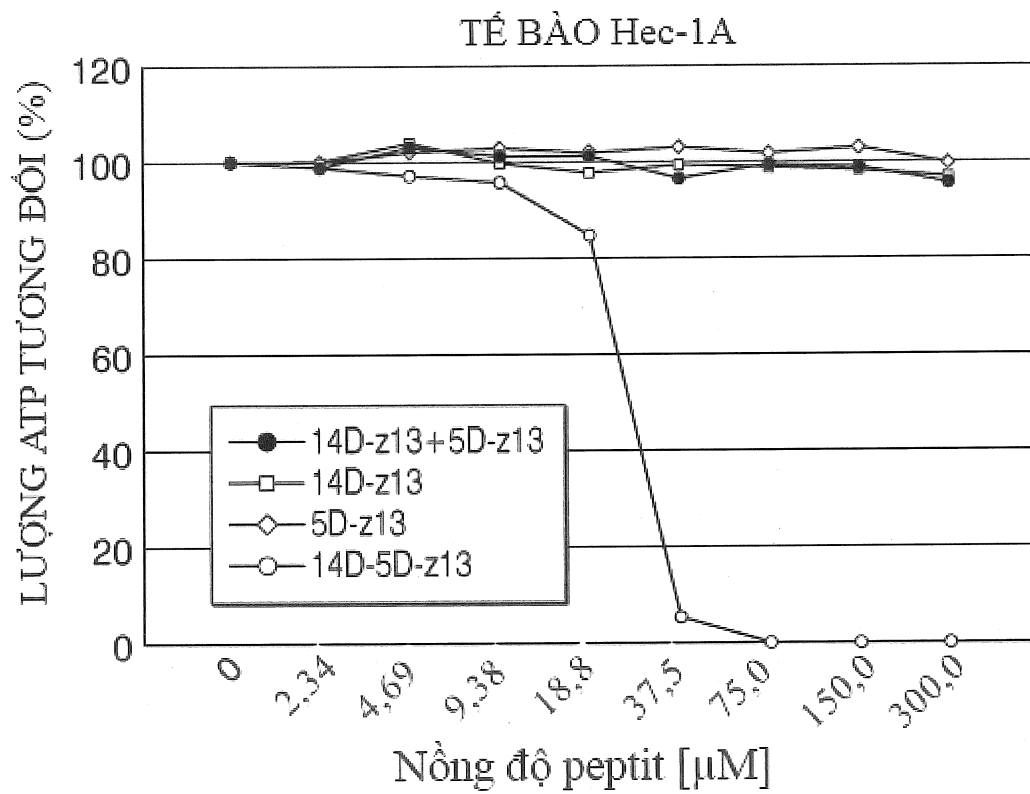


FIG. 13

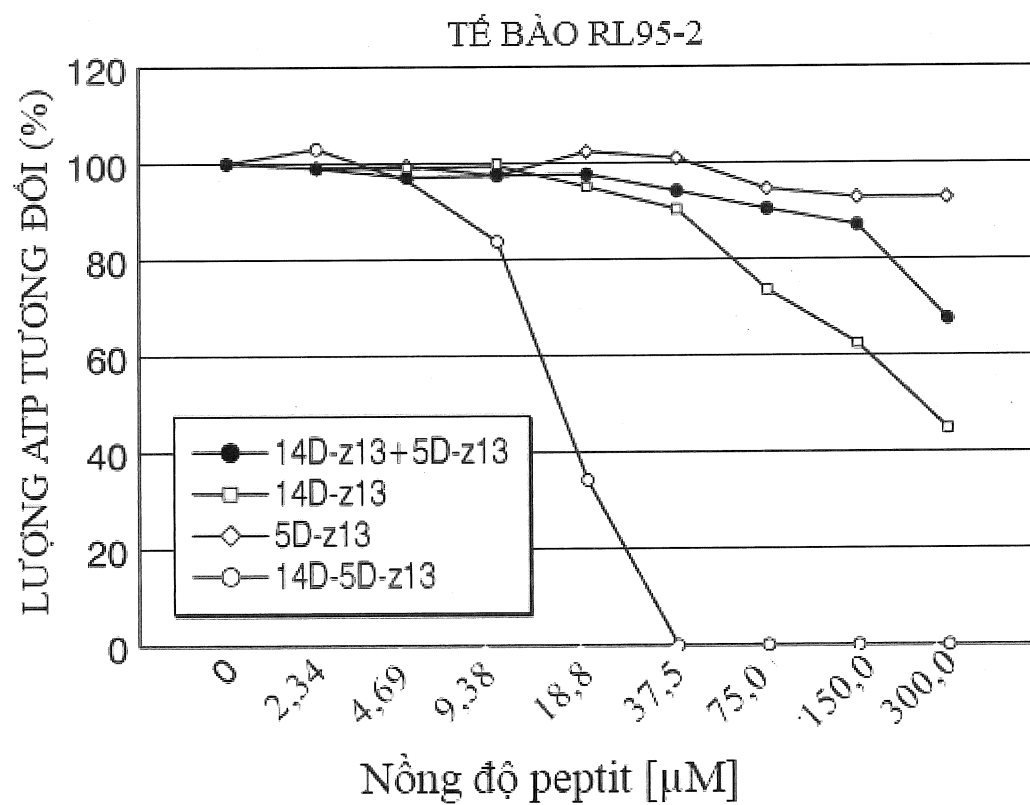


FIG. 14

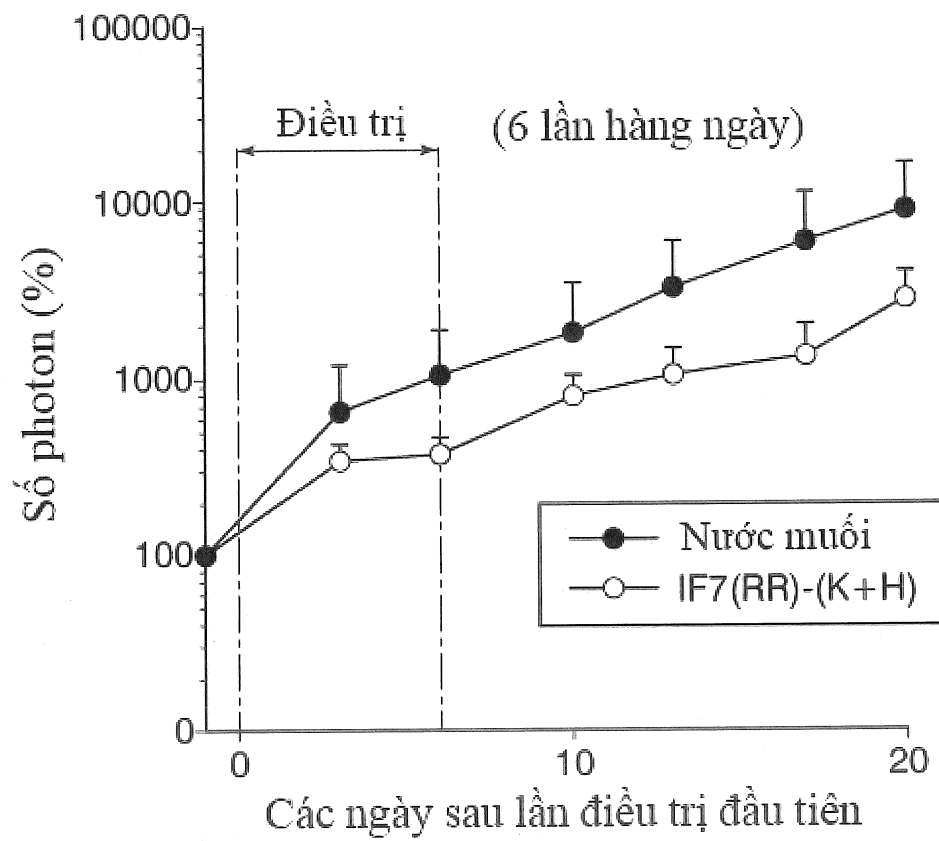


FIG. 15

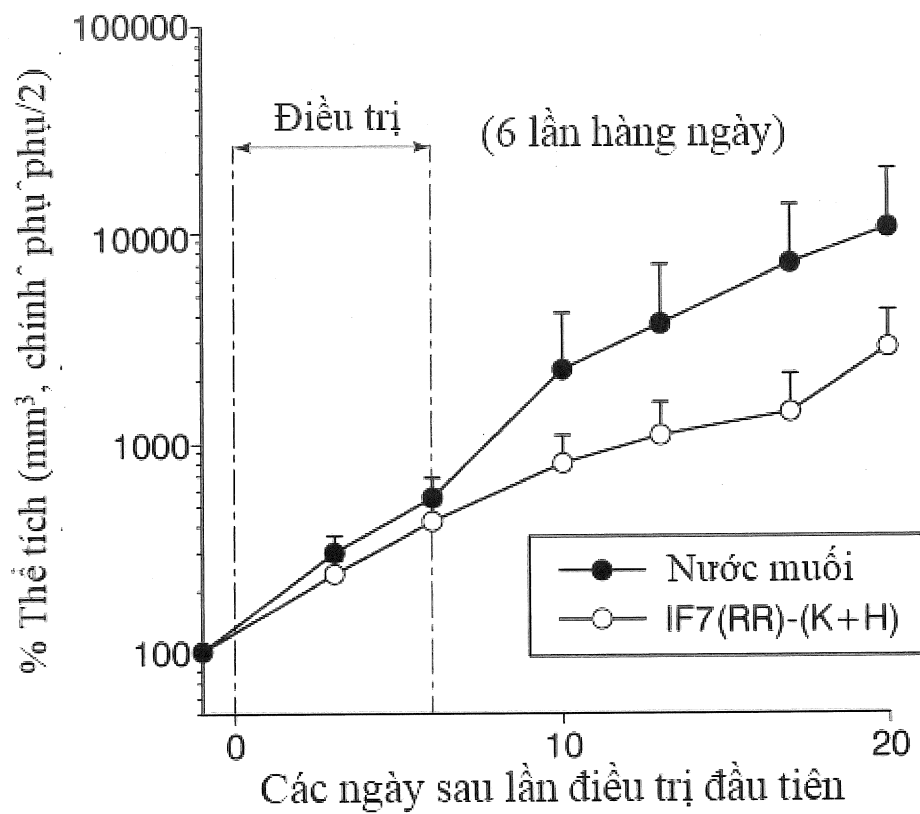


FIG. 16

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Trường Đại học Y khoa Hamamatsu (Hamamatsu University School of Medicine)
 <120> Chất diệt tế bào
 <130> PC26227
 <160> 42

<210>	1
<211>	19
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo
<220>	
<223>	Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit thực hiện
<400>	1

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu
1 5 10 15
Ala His Leu

<210>	2
<211>	9
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo
<220>	
<223>	Mô tả trình tự nhân tạo: peptit liên kết CNGB3
<220>	
<221>	misc_feature
<222>	(5)..(5)
<223>	Xaa có thể là bất kỳ axit amin có trong tự nhiên
<220>	
<221>	misc_feature
<222>	(7)..(7)
<223>	Xaa có thể là bất kỳ axit amin có trong tự nhiên
<400>	2

Val Arg Arg Ala Xaa Asn Xaa Pro Gly
1 5

<210>	3
<211>	9
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo
<220>	
<223>	Mô tả trình tự nhân tạo: peptit Z13
<400>	3

Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
1 5

$\langle 210 \rangle$	4
$\langle 211 \rangle$	9

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit liên kết CNGB3
 <400> 4
 Val Arg Arg Ala Glu Asn Arg Pro Gly
 1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit liên kết CNGB3
 <400> 5
 Val Arg Arg Ala Asn Asn Leu Pro Gly
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit liên kết CNGB3
 <400> 6
 Val Arg Arg Ala Asn Asn Arg Pro Gly
 1 5

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: IF7 peptide
 <400> 7
 Ile Phe Leu Leu Trp Gln Arg
 1 5

<210> 8
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLAH(14)-HLAH(14)-Z13
 <400> 8
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu
 1 5 10 15
 Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Val Arg Arg Ala

20 25 30
 Asp Asn Arg Pro Gly
 35
 <210> 9
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLAH(14)-HLAH(14)-D5E
 <400> 9
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu
 1 5 10 15
 Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Val Arg Arg Ala
 20 25 30
 Glu Asn Arg Pro Gly
 35
 <210> 10
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLAH(14)-HLAH(13)-Z13
 <400> 10
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu
 1 5 10 15
 Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala Val Arg Arg Ala Asp
 20 25 30
 Asn Arg Pro Gly
 35
 <210> 11
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLAH(14)-HLAH(12)-Z13
 <400> 11
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu
 1 5 10 15
 Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Val Arg Arg Ala Asp Asn
 20 25 30
 Arg Pro Gly
 35
 <210> 12
 <211> 34

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLA(14)-HLA(11)-Z13
 <400> 12
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu
 1 5 10 15
 Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg
 20 25 30
 Pro Gly

<210> 13
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLA(14)-HLA(10)-Z13
 <400> 13
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu
 1 5 10 15
 Ala His Leu Ala His His Leu Ala Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro
 20 25 30
 Gly

<210> 14
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLA(14)-HLA(9)-Z13
 <400> 14
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu
 1 5 10 15
 Ala His Leu Ala His His Leu Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20 25 30

<210> 15
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLA(14)-HLA(8)-Z13
 <400> 15
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu
 1 5 10 15
 Ala His Leu Ala His His Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20 25 30

<210> 16
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLAK(14)-HLAH(7)-Z13
 <400> 16
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu
 1 5 10 15
 Ala His Leu Ala His Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20 25 30

<210> 17
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit HLAH(14)-KLAK(14)-Z13
 <400> 17
 His Leu Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Lys Leu
 1 5 10 15
 Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Val Arg Arg Ala
 20 25 30
 Asp Asn Arg Pro Gly
 35

<210> 18
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit HLAH(14)-KLAK(13)-Z13
 <400> 18
 His Leu Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Lys Leu
 1 5 10 15
 Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Val Arg Arg Ala Asp
 20 25 30
 Asn Arg Pro Gly
 35

<210> 19
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit HLAH(14)-KLAK(13)-Z13
 <400> 19

His Leu Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Lys Leu
 1 5 10 15
 Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Val Arg Arg Ala Asp Asn
 20 25 30
 Arg Pro Gly
 35

<210> 20
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit HLAH(14)-KLAK(13)-Z13
 <400> 20

His Leu Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Lys Leu
 1 5 10 15
 Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg
 20 25 30
 Pro Gly

<210> 21
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit HLAH(14)-KLAK(13)-Z13
 <400> 21

His Leu Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Lys Leu
 1 5 10 15
 Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro
 20 25 30
 Gly

<210> 22
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit HLAH(14)-KLAK(13)-Z13
 <400> 22

His Leu Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Lys Leu
 1 5 10 15
 Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20 25 30

<210> 23

<211> 31
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit HLAH(14)-KLAK(13)-Z13
 <400> 23
 His Leu Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Lys Leu
 1 5 10 15
 Ala Lys Leu Ala Lys Lys Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20 25 30

<210> 24
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit HLAH(14)-KLAK(13)-Z13
 <400> 24
 His Leu Ala His Leu Ala His His Leu Ala His Leu Ala His Lys Leu
 1 5 10 15
 Ala Lys Leu Ala Lys Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20 25 30

<210> 25
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLAK(14)-HLAH(6)-Z13
 <400> 25
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu
 1 5 10 15
 Ala His Leu Ala Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20 25

<210> 26
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLAK(14)-HLAH(5)-Z13
 <400> 26
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu
 1 5 10 15
 Ala His Leu Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20 25

<210> 27

<211> 27
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLA(14)-HLA(4)-Z13
 <400> 27
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu
 1 5 10 15
 Ala His Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20 25

<210> 28
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLA(14)-HLA(3)-Z13
 <400> 28
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu
 1 5 10 15
 Ala His Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20 25

<210> 29
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLA(14)-HLA(2)-Z13
 <400> 29
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu
 1 5 10 15
 Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20 25

<210> 30
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLA(14)-HLA(1)-Z13
 <400> 30
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Val
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20

<210> 31

<211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLAH(13)-HLAH(7)-Z13
 <400> 31
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala His Leu Ala
 1 5 10 15
 His Leu Ala His Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20 25

<210> 32
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLAH(12)-HLAH(7)-Z13
 <400> 32
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu His Leu Ala His
 1 5 10 15
 Leu Ala His Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20 25

<210> 33
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLAH(11)-HLAH(7)-Z13
 <400> 33
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys His Leu Ala His Leu
 1 5 10 15
 Ala His Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20 25

<210> 34
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLAH(10)-HLAH(7)-Z13
 <400> 34
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala His Leu Ala His Leu Ala
 1 5 10 15
 His Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20 25

<210> 35

<211> 25
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: KLA(9)-HLA(7)-Peptit Z13
 <400> 35
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu His Leu Ala His Leu Ala His
 1 5 10 15
 Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20 25

<210> 36
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLA(8)-HLA(7)-Z13
 <400> 36
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys His Leu Ala His Leu Ala His Val
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20

<210> 37
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLA(7)-HLA(7)-Z13
 <400> 37
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu Ala His Leu Ala His Val Arg
 1 5 10 15
 Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20

<210> 38
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLA(14D)-Z13
 <400> 38
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Val Arg
 1 5 10 15
 Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 20

<210> 39

<211> 28
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit KLAK(14)-HLAH(5)-Z13
 <400> 39
 His Leu Ala His Leu Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly
 1 5 10

<210> 40
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit IF7(RR)-(K+H)
 <400> 40
 Ile Phe Leu Leu Trp Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys
 1 5 10 15
 Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu Ala His Leu
 20 25

<210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit Z24
 <400> 41
 Met Gln Arg Thr Arg Ala Thr Pro Gly
 1 5

<210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit Z11
 <400> 42
 Val Arg Ser Ser Arg Ser Thr Pro Gln
 1 5