



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

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

(11)



1-0038348

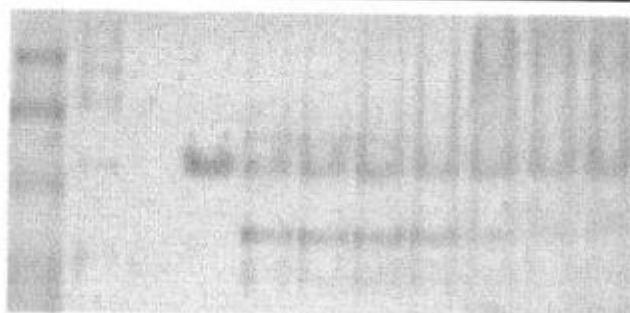
(51)^{2020.01} C07K 16/28; A61K 8/64; G01N 33/68; (13) B
A61Q 19/00; A23L 33/10; A61P 17/00

- (21) 1-2020-05309 (22) 14/08/2019
(86) PCT/KR2019/010395 14/08/2019 (87) WO2020/040481 27/02/2020
(30) 10-2018-0098309 23/08/2018 KR; 10-2019-0066179 04/06/2019 KR
(45) 25/01/2024 430 (43) 25/05/2021 398
(73) HAUUL BIO (KR)
22, Geodudanji 1-gil, Dongnae-myeon, Chuncheon-si Gangwon-do 24398, Republic of Korea
(72) NA, Hee-Jun (KR); LEE, Yun-Suk (KR); YOO, Je-Ok (KR); LEE, Kwang-Soon (KR); LEE, Kang Seung (KR); MIN, Seung Je (KR).
(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG VAMP2 DÙNG ĐỂ ỨC CHẾ SỰ TẠO THÀNH PHỨC HỢP SNARE VÀ CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng VAMP2 mà ức chế sự tạo thành phức hợp SNARE và việc sử dụng chúng, và cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng VAMP2 hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng bao gồm các CDR chuỗi nặng và các CDR chuỗi nhẹ có trình tự cụ thể. Kháng thể kháng VAMP2 được mong đợi là sẽ hữu ích trong việc cải thiện hoặc điều trị nếp nhăn trên da bằng cách ức chế sự tạo thành phức hợp SNARE.

Snap25 (1 ug)	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Syntaxin 1A (1 ug)	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Vamp2 (1 ug)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Vamp2 kháng TAT (ug)				0	0,5	1	2	5	10	20



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng VAMP2 mà ức chế các phức hợp SNARE và việc sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hiện tượng dung hợp màng trong các tế bào do các protein gọi là SNARE (SNARE: soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor - thụ thể protein gắn kết yếu tố nhạy N-ethylmaleimide tan) gây ra. Protein SNARE chỉ một nhóm protein cụ thể mà được bảo toàn rất tốt giữa các loài, và phức hợp SNARE chỉ phức hợp của các protein này. Protein SNARE có thể được chia ra làm (t-) SNARE đích và (v-) SNARE túi, và t-SNARE chỉ protein SNARE có mặt trong màng trước synap và v-SNARE chỉ protein SNARE có mặt trong các túi synap. t-SNARE bao gồm protein màng tích hợp được gọi là syntaxin1a và protein màng ngoại biên, SNAP-25 (soluble NSF attachment protein – protein gắn kết NSF tan có trọng lượng 25 kDa), và các đơn vị chức năng của nó được coi là phức hợp của nó (phức hợp t-SNARE). v-SNARE chỉ a protein màng gọi là VAMP2 ((VAMP2: vesicle-associated membrane protein 2 - protein màng gắn túi 2 hoặc synaptobrevin). Các SNARE này có vùng protein khoảng 60 đến 70 aa được gọi là 'lõi SNARE", và các vùng này tập hợp với nhau để tạo ra búi xoắn bốn được gọi là phức hợp SNARE.

Mặc dù các nghiên cứu liên quan đến phức hợp SNARE vẫn đang được tiến hành tích cực, tuy nhiên, các nghiên cứu về kháng thể ức chế phức hợp SNARE vẫn chưa đầy đủ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà ức chế phức hợp SNARE.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất kháng thể dung hợp kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó trong đó peptit TAT được liên kết bổ sung với kháng

thể kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, vector biểu hiện tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic này, và các tế bào được biến nạp bằng vector biểu hiện tái tổ hợp này.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm dùng để phát hiện kháng nguyên VAMP2 chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó làm thành phần có hoạt tính.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất mỹ phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc cải thiện nếp nhăn trên da, thực phẩm chức năng cải thiện sức khỏe, và dược phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị nếp nhăn trên da chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó làm thành phần có hoạt tính.

Giải pháp kỹ thuật

Để đạt được các mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất kháng thể kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1, CDR2 chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2 và CDR3 chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 3; và vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4, CDR2 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 5, và CDR3 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 6.

Tương tự, sáng chế đề xuất kháng thể dung hợp kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó trong đó peptit TAT được biểu hiện bằng SEQ ID NO: 7 được liên kết bổ sung với kháng thể kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất vector biểu hiện tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất các tế bào được biến nạp bằng vector biểu hiện tái tổ hợp này.

Hơn thế nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng để phát hiện kháng nguyên VAMP2 chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó làm thành phần có hoạt

tính.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất mỹ phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc cải thiện nếp nhăn trên da chứa kháng thể nêu trên hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó làm thành phần có hoạt tính.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất thực phẩm chức năng cải thiện sức khỏe dùng để ngăn ngừa hoặc cải thiện nếp nhăn trên da chứa kháng thể nêu trên hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó làm thành phần có hoạt tính.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất dược phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị nếp nhăn trên da chứa kháng thể nêu trên hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó làm thành phần có hoạt tính.

Hiệu quả

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng VAMP2 ức chế phức hợp SNARE và việc sử dụng chúng, và cụ thể là, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng VAMP2 hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng bao gồm các CDR chuỗi nặng và các CDR chuỗi nhẹ có trình tự cụ thể. Kháng thể kháng VAMP2 được mong đợi là hữu ích để cải thiện hoặc điều trị nếp nhăn trên da bằng cách ức chế sự tạo thành phức hợp SNARE.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện kết quả chọn lọc sinh học dùng để sàng lọc kháng thể VAMP2 scFv.

FIG. 2 thể hiện các kết quả của phân tích ELISA dùng để sàng lọc kháng thể VAMP2 scFv.

FIG. 3 thể hiện các kết quả điều chế VAMP2 scFv có khả năng thẩm thấu tế bào thông qua việc tách dòng.

FIG. 4 thể hiện các kết quả về kích thước và độ tinh khiết của protein qua SDS-PAGE sau khi tinh chế protein VAMP2 scFv có khả năng thẩm thấu tế bào.

FIG. 5 thể hiện các kết quả của phân tích PAGE tự nhiên về khả năng ức chế sự tạo thành phức hợp SNARE của protein VAMP2 scFv có khả năng thẩm thấu tế bào.

FIG. 6 thể hiện các kết quả của ức chế hoạt tính MMP-1 collagenaza của protein VAMP2 scFv có khả năng thẩm thấu tế bào.

FIG. 7 thể hiện các kết quả đo dòng tế bào để xác định khả năng thẩm thấu tế bào của protein VAMP2 scFv có khả năng thẩm thấu tế bào.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1, CDR2 chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2 và CDR3 chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 3; và vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4, CDR2 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 5, và CDR3 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 6.

Tương tự, sáng chế đề xuất kháng thể dung hợp kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó trong đó peptit TAT được biểu hiện bằng SEQ ID NO: 7 được liên kết bổ sung với kháng thể kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Mặt khác, các CDR bao gồm các axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 6 được liệt kê trong bảng 1.

Ngoài ra, trình tự axit amin của peptit TAT được sử dụng trong sáng chế là "YGRKKRRQRRR" (SEQ ID NO: 7), và trình tự axit nucleic của peptit TAT là "TAT GGC CGC AAA AAA CGC CGC CAG CGC CGC CGC" (SEQ ID NO: 8).

Trong sáng chế, thuật ngữ “kháng thể” chỉ phân tử protein mà đóng vai trò làm thụ thể nhận biết đặc hiệu khác nguyên, bao gồm phân tử globulin miễn dịch mà phản ứng miễn dịch kháng thể đặc hiệu, ví dụ, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể có chiều dài đầy đủ và các mảnh kháng thể. Thuật ngữ “kháng thể” tương tự có thể bao gồm các phân tử hóa trị hai hoặc đặc hiệu kép (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép), kháng thể thể hai (diabody), kháng thể thể ba (triabody) hoặc kháng thể thể bốn (tetraabody).

Trong sáng chế, thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” chỉ phân tử kháng thể có thành phần phân tử duy nhất thu được từ một quần thể bao gồm chủ yếu là kháng thể giống nhau, mà thể hiện khả năng liên kết và ái lực duy nhất với epitop đặc hiệu, không giống như kháng thể đa dòng mà có thể liên kết với nhiều epitop. Trong sáng chế, thuật ngữ “kháng thể có chiều dài đầy đủ” có hai chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ và hai chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ, mỗi chuỗi nhẹ này liên kết với chuỗi nặng thông qua liên kết disulfua. Vùng cố định của chuỗi nặng có các loại gamma (γ), mu (μ), alpha (α), delta (δ), và epsilon (ϵ), và phân lớp của nó có gamma 1 ($\gamma 1$), gamma 2 ($\gamma 2$), và gamma 3 ($\gamma 3$), gamma 4 ($\gamma 4$), alpha 1 ($\alpha 1$) và alpha 2 ($\alpha 2$). Vùng cố định của chuỗi nhẹ có các loại

kappa (κ) và lambda (λ). IgG là một tiểu loại, và bao gồm IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4.

Trong sáng chế, thuật ngữ “chuỗi nặng” chỉ cả chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ lẫn các mảnh của nó bao gồm VH vùng biến đổi bao gồm trình tự axit amin có đủ các trình tự vùng biến đổi để tạo ra tính đặc hiệu với kháng nguyên và cả vùng cố định CH1, CH2 và CH3. Ngoài ra, trong sáng chế, thuật ngữ “chuỗi nhẹ” có thể bao gồm cả chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ lẫn các mảnh của nó bao gồm VL vùng biến đổi bao gồm trình tự axit amin đủ các trình tự vùng biến đổi tạo ra tính đặc hiệu với kháng nguyên và CL vùng cố định.

Trong sáng chế, các thuật ngữ “mảnh”, “mảnh kháng thể” và “mảnh liên kết kháng nguyên” được sử dụng thay thế cho nhau để chỉ mảnh bất kỳ của kháng thể theo sáng chế có chức năng liên kết kháng nguyên của kháng thể. Ví dụ về các mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂ và Fv, nhưng chúng không giới hạn ở các mảnh này.

Các kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế có thể bao gồm không chỉ các trình tự của các kháng thể được mô tả ở đây, mà còn bao gồm các tương đương sinh học của chúng, ở mức độ mà chúng có thể biểu hiện khả năng liên kết đặc hiệu với VAMP2. Ví dụ, các thay đổi bổ sung có thể được tạo ra đối với trình tự axit amin của kháng thể để cải thiện thêm ái lực liên kết và/hoặc các đặc tính sinh học khác của kháng thể, các cải biến này bao gồm, ví dụ, loại bỏ, cài xen và/hoặc thay thế các gốc trong trình tự axit amin của kháng thể. Các cải biến đối với axit amin được tạo ra dựa trên tính tương tự tương đối của các thay thế trên mạch bên axit amin, như tính kỵ nước, ưa nước, điện tích, kích thước và các yếu tố tương tự. Nó có thể thu được bằng cách phân tích kích thước, hình dáng, và kiểu thay thế trên mạch bên axit amin mà arginin, lysin và histidin đều là các gốc mang điện dương; alanin, glyxin và serin có kích thước tương tự nhau; và phenylalanin, tryptophan và tyrosin có hình dáng tương tự nhau. Do đó, dựa trên những điều trên, arginin, lysin và histidin; alanin, glyxin và serin; và phenylalanin, tryptophan và tyrosin có các chức năng sinh học tương đương.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phân tử axit nucleic” có nghĩa tổng quát bao gồm các phân tử ADN (gADN và cADN) và ARN, và các nucleotit mà là các đơn vị cấu trúc bazơ trong các phân tử axit nucleic bao gồm không chỉ các nucleotit xuất hiện trong

tự nhiên, mà còn bao gồm các phân tử tương tự có đường hoặc các vị trí bazơ được cải biến. Trình tự của các phân tử axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của sáng chế có thể được cải biến, và các cải biến bao gồm bổ sung, loại bỏ, hoặc thay thế không bảo toàn hoặc các thay thế bảo toàn đối với nucleotit.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất vectơ biểu hiện tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic này.

Trong sáng chế, "vectơ" chỉ phân tử ADN tự sao chép được sử dụng để mang gen tách dòng (hoặc mảnh khác của ADN tách dòng).

Trong sáng chế, "vectơ biểu hiện" chỉ phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm trình tự mã hóa mong muốn và trình tự axit nucleic cần cho việc biểu hiện trình tự mã hóa liên kết động trong sinh vật chủ cụ thể. Vectơ biểu hiện có thể ưu tiên chứa một hoặc nhiều đoạn gen đánh dấu có thể chọn lọc. Các đoạn gen đánh dấu này là trình tự axit nucleic có đặc tính mà có thể được chọn bằng phương pháp hóa học, và tất cả các gen có khả năng phân biệt các tế bào đã biến nạp với các tế bào chưa biến nạp được bao gồm. Các ví dụ bao gồm các gen kháng kháng sinh như ampicillin, kanamycin, genetixin (G418), bleomycin, hygromycin, chloramphenicol, v.v..., nhưng chúng không giới hạn ở các mảnh này, và có thể được chọn thích hợp bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực này.

Để biểu hiện trình tự ADN của sáng chế, rất nhiều trình tự kiểm soát biểu hiện có thể được sử dụng trong vectơ này. Các ví dụ về các trình tự kiểm soát sự biểu hiện có thể bao gồm, ví dụ, có thể là cấu trúc đã biết để kiểm soát sự biểu hiện của các gen và nhiều trình tự khác và tổ hợp của chúng, đoạn khởi đầu sớm và muộn của SV40 hoặc adenovirus, các đoạn khởi đầu, và các đoạn tăng cường của CMV, LTR retrovirus, hệ thống lac, hệ thống trp, hệ thống TAC hoặc TRC, các đoạn khởi đầu T3 và T7, đoạn chỉ huy chính và vùng khởi đầu của thực khuẩn lambda, vùng điều hòa của protein mã fd, đoạn khởi đầu cho 3-phosphoglycerat kinase hoặc glycolaza khác, các đoạn khởi đầu của phosphatase, ví dụ Pho5, các đoạn khởi đầu của hệ lai nấm men alpha và các tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn hoặc các virus.

Vectơ biểu hiện kháng thể theo sáng chế có thể là hệ thống vectơ trong đó các chuỗi nhẹ và các chuỗi nặng được biểu hiện đồng thời trong vectơ đó, hoặc là hệ thống trong đó các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được biểu hiện tương ứng trong các vectơ riêng biệt. Trong trường hợp sau, cả hai vectơ này đều được đưa vào tế bào chủ thông qua việc đồng biến nạp và biến nạp theo đích. Việc đồng biến nạp là phương pháp sàng lọc các tế

bào biểu hiện cả các chuỗi nhẹ và các chuỗi nặng sau khi cùng lúc đưa từng vector ADN mã hóa các chuỗi nhẹ và các chuỗi nặng vào trong tế bào chủ. Việc biến nạp theo đích là phương pháp lựa chọn các tế bào được biến nạp bằng vector chứa chuỗi nhẹ (hoặc chuỗi nặng) và một lần nữa, biến nạp các tế bào đã chọn biểu hiện chuỗi nhẹ bằng vector chứa chuỗi nặng (hoặc chuỗi nhẹ) để biểu hiện cả các chuỗi nhẹ lẫn các chuỗi nặng, và theo đó, cuối cùng chọn được các tế bào.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất các tế bào được biến nạp bằng vector biểu hiện tái tổ hợp.

Các tế bào có khả năng tách dòng liên tục và biểu hiện vector của sáng chế một cách ổn định có thể là tế bào chủ bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, có thể bao gồm các tế bào chủ nhân sơ, *Escherichia coli*, các chủng Bacillus như *Bacillus subtilis* và *Bacillus thuringiensis*, Streptomyces, Pseudomonas (ví dụ, *Pseudomonas putida*), Proteus mirabilis hoặc Staphylococcus (ví dụ, *Staphylococcus carnosus*), nhưng không giới hạn ở các tế bào chủ nêu trên.

Trong phương pháp điều chế kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, việc nuôi cấy các tế bào đã biến nạp có thể được thực hiện trong môi trường thích hợp và theo các điều kiện nuôi cấy đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Quy trình nuôi cấy này có thể được thực hiện bằng cách điều chỉnh dễ dàng theo chủng đã chọn bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực này. Việc nuôi cấy tế bào được chia thành nuôi cấy trong hỗn dịch và nuôi cấy kiểu bám dính theo con đường sinh trưởng tế bào và nó được phân loại thành phương pháp theo mẻ, bán liên tục và phương pháp liên tục, phụ thuộc vào phương pháp nuôi cấy. Môi trường được sử dụng để nuôi cấy phải thỏa mãn đầy đủ các yêu cầu đối với chủng cụ thể.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng để phát hiện kháng nguyên VAMP2 chứa kháng thể nêu trên hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó làm thành phần có hoạt tính.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất mỹ phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc cải thiện nếp nhăn trên da chứa kháng thể nêu trên hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó làm thành phần có hoạt tính. Cụ thể, mỹ phẩm này có thể ức chế việc tạo thành phức hợp SNARE.

Mỹ phẩm có thể bao gồm chất làm ổn định, chất làm tan, các chất phụ trợ thông thường, như các vitamin, các chất màu và các hương liệu, và chất mang, ngoài thành phần có hoạt tính.

Mỹ phẩm có thể được sản xuất ở dạng chế phẩm bất kỳ thường được sản xuất trong lĩnh vực kỹ thuật và có thể là dạng chế phẩm được chọn từ nhóm bao gồm kem bôi ngoài da, kem bôi, nước thơm làm mềm, nước thơm dưỡng ẩm, bộ sản phẩm chăm sóc, nước hoa, dầu dưỡng tóc, dầu gội đầu, dầu xả, dầu xả dưỡng tóc, chế phẩm xử lý tóc, gel, nước thơm dưỡng da, chế phẩm làm mềm da, chế phẩm làm săn da, chế phẩm làm se da, nước thơm, nước sữa dưỡng, nước làm ẩm, nước dưỡng, kem mát xa, kem dưỡng, kem bôi cho mắt, kem giữ ẩm, kem bôi tay, phấn nền, tinh chất dưỡng, chế phẩm chống nắng, xà phòng, chế phẩm rửa mặt dạng bột, nước rửa mặt, nước dưỡng thể và chế phẩm làm sạch toàn thân, nhưng không giới hạn ở các chế phẩm nêu trên. Thành phần của mỗi trong số các chế phẩm này có thể chứa các chất nền khác nhau và các chất phụ gia mà cần thiết và thích hợp để tạo nên chế phẩm này, và loại và lượng các thành phần này có thể dễ dàng được chọn bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực này.

Khi chế phẩm ở dạng bột nhão, kem hoặc gel, nó có thể sử dụng dầu động vật, dầu thực vật, sáp, parafin, tinh bột, tragacanth, dẫn xuất của xenluloza, polyetylen glycol, silic, bentonit, silic oxit, talc hoặc kẽm oxit và các chất tương tự, làm thành phần chất mang.

Khi chế phẩm ở dạng bột hoặc dạng phun xịt, nó có thể sử dụng lactoza, talc, silic oxit, nhôm hydroxit, canxi silic oxit hoặc bột polyamit, làm thành phần chất mang, và cụ thể, dạng phun xịt này có thể chứa thêm các chất đẩy như cloflohydrocarbon, propan/butan hoặc dimetyl ete.

Khi chế phẩm là dạng dung dịch hoặc nhũ tương, dung môi, chất làm tan, hoặc chất nhũ hóa được sử dụng làm thành phần chất mang, các ví dụ là nước, etanol, isopropanol, etyl cacbonat, etyl axetat, rượu benzylic, benzyl benzoat, propylen glycol, dầu 1,3-butyglycol, este béo của glyxerol, polyetylen glycol hoặc các este của axit béo với sorbitan.

Khi chế phẩm ở dạng huyền phù, nó có thể sử dụng các chất pha loãng dạng lỏng như nước, etanol hoặc propylen glycol, các chất tạo huyền phù như rượu isostearylic được etoxy hóa, các este polyoxyetylen sorbitol, và các este polyoxyetylene sorbitan, xenluloza vi tinh thể, nhôm metahydroxit, bentonit, thạch hoặc tragacanth, làm thành phần chất mang.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất thực phẩm chức năng cải thiện sức khỏe dùng để ngăn ngừa hoặc cải thiện nếp nhăn trên da chứa kháng thể nêu trên hoặc mảnh liên kết kháng

nguyên của nó làm thành phần có hoạt tính. Cụ thể, thực phẩm này có thể ức chế sự tạo thành phức hợp SNARE.

Thực phẩm chức năng tăng cường sức khỏe có thể được cung cấp ở dạng bột, cốm, viên nén, viên nang, xiro, đồ uống hoặc viên tròn, và thực phẩm tốt cho sức khỏe này được sử dụng kết hợp với thực phẩm hoặc các chất phụ gia khác ngoài thành phần có hoạt tính là thành phần theo sáng chế, và nó có thể được sử dụng thích hợp theo phương pháp thông thường. Lượng được trộn của thành phần có hoạt tính có thể được xác định thích hợp theo mục đích sử dụng chúng, ví dụ, để ngăn ngừa, tăng cường sức khỏe hoặc trị bệnh.

Liều hữu hiệu của kháng thể nêu trên hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng được chứa trong thực phẩm chức năng tăng cường sức khỏe có thể được sử dụng theo liều hữu hiệu của dược phẩm nhưng nó có thể là khoảng nêu trên hoặc ít hơn trong trường hợp dùng lâu dài cho mục đích tăng cường sức khỏe và vệ sinh hoặc để kiểm soát sức khỏe và rõ ràng là thành phần có hoạt tính có thể được sử dụng với lượng ít nhất là ở khoảng nêu trên do không có vấn đề bất kỳ phát sinh liên quan đến tính an toàn.

Không có giới hạn cụ thể về loại thực phẩm chức năng tăng cường sức khỏe, và các ví dụ về chúng bao gồm thịt, xúc xích, bánh mì, sô cô la, kẹo cứng, bim bim, bánh kẹo, bánh pizza, mì tôm, các loại mì khác, gôm, sản phẩm sữa bao gồm kem đá, các loại súp khác nhau, các đồ uống, trà, nước uống, các đồ uống có cồn và các phức chất vitamin, v.v...

Ngoài ra, sáng chế đề xuất dược phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị nếp nhăn trên da chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó làm thành phần có hoạt tính. Cụ thể, dược phẩm này có thể ức chế sự tạo thành phức hợp SNARE.

Ngoài ra dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm chất mang dược dụng, và chất mang dược dụng này thường được sử dụng trong bào chế và có thể bao gồm lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, mannitol, tinh bột, cao su acacia, canxi phosphat, alginat, gelatin, canxi silicat, xenluloza vi tinh thể, polyvinylpyrrolidon, xenluloza, nước, xiro, metylxenluloza, metylhydroxybenzoat, propylhydroxybenzoat, talc, axit stearic, magie và dầu khoáng, và các chất tương tự, nhưng không giới hạn ở các chất này. Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm chất làm trơn, chất làm ẩm, chất làm ngọt, chất tạo hương vị, chất nhũ hóa, chất tạo huyền phù, chất bảo quản, v.v... ngoài các thành phần nêu trên.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa, và để dùng ngoài đường tiêu hóa, nó có thể được dùng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch, tiêm trong cơ, tiêm trong màng bụng, dùng trong màng trong, dùng khu trú, dùng trong mũi, dùng trong phổi, dùng qua trực tràng, v.v... Khi dùng qua đường miệng, protein hoặc peptit được tiêu hóa, vì vậy dược phẩm dùng qua đường miệng này có thể được bào chế để hoạt chất được bao hoặc được bảo vệ tránh bị phân hủy trong dạ dày, và dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng bằng thiết bị bất kỳ có khả năng vận chuyển hoạt chất tới tế bào đích.

Các liều thích hợp của dược phẩm theo sáng chế thay đổi theo các yếu tố như phương pháp bào chế, cách dùng, độ tuổi của bệnh nhân, cân nặng, giới tính, tình trạng bệnh, thực phẩm tiêu dùng, thời điểm dùng, đường dùng, tốc độ bài tiết, và tính nhạy đáp ứng, và thông thường, bác sĩ có kinh nghiệm có thể dễ dàng xác định và đưa ra liều hữu hiệu cho mục đích điều trị hoặc ngăn ngừa mong muốn.

Dược phẩm theo sáng chế được bào chế ở dạng liều đơn vị bằng cách bào chế sử dụng chất mang dược dụng và/hoặc tá dược bằng cách đưa nó vào trong vật chứa đa liều, theo phương pháp mà có thể dễ dàng thực hiện được bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Ở thời điểm này, chế phẩm có thể ở dạng dung dịch, hỗn dịch hoặc nhũ tương trong môi trường chứa dầu hoặc môi trường chứa nước, hoặc có thể ở dạng chất chiết, bột, viên đạn, bột, cốm, viên nén hoặc viên nang, và ngoài ra có thể bao gồm chất phân tán hoặc chất làm ổn định.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng dưới dạng chất trị liệu đơn lẻ hoặc kết hợp với chất trị liệu khác và có thể được dùng lần lượt hoặc đồng thời với các chất trị liệu thông thường.

Sau đây, các ví dụ của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết để hiểu sáng chế. Tuy nhiên, sáng chế có thể được thể hiện bằng các phương án ở nhiều dạng khác nhau và không nên coi các phương án này là giới hạn, và các phương án này được cung cấp ở đây chỉ để minh họa rõ sáng chế cho người có kỹ năng trong lĩnh vực sáng chế đề cập.

Ví dụ thực hiện sáng chế

<Ví dụ 1> Sàng lọc kháng thể VAMP2 scFv

1. Chọc lọc sinh học

Việc chọc lọc sinh học được tiến hành sử dụng thư viện OPAL có độ đa dạng

$7,6 \times 10^9$. 4 μ g kháng nguyên VAMP2 được cố định trên hạt từ epoxy và thực khuẩn đầu vào được cho phản ứng. Hiệu giá đầu ra được đo bằng cách rửa giải thực khuẩn được cho phản ứng với kháng nguyên. Cứ mỗi thời điểm, đo hiệu giá đầu vào và hiệu giá đầu ra để thu được thông tin chọn lọc sinh học và để khẳng định rằng nó đang chạy bình thường. Đối với mỗi thời điểm, thực khuẩn đầu vào là 4×10^{12} cfu/ml $\geq$ thực khuẩn được sử dụng. Các kết quả của việc chọn lọc liên tiếp theo thứ tự 1, 2, 3 được thể hiện trên FIG. 1. Các đầu ra 1×10^8 cfu/ml và $2,7 \times 10^8$ cfu/ml VAMP2 lần lượt thu được (FIG. 1). Do đó, đã khẳng định được rằng việc chọn lọc sinh học này đã được thực hiện bình thường.

2. Phân tích ELISA

Phân tích ELISA được thực hiện để sàng lọc các kháng thể có độ nhạy cao và tính đặc hiệu cao. Thực khuẩn thu được được gây nhiễm bằng *E. coli* và cấy vạch trên đĩa LB mà đã bổ sung các chất kháng sinh. Sau khi ủ trong máy ủ ở 30°C trong 16 giờ, các dòng thu được được thu gom ngẫu nhiên. Sau khi mỗi dòng được nuôi cấy trong môi trường LB medium, IPTG được xử lý để biểu hiện scFv, và *E. coli* được làm tan để thực hiện ELISA đối với phân tan. Đầu tiên, 1 μ g/ml protein tái tổ hợp VAMP2 được cố định trong đĩa ELISA 96 lỗ và được phong bế bằng PBS chứa 1% BSA. Sau 1 giờ, dịch tan tế bào thu được ở trên được xử lý và cho phản ứng ở 4°C trong 16 giờ. Sau khi rửa đĩa này ba lần bằng PBS chứa 0,1% Tween20, kháng thể kháng HA liên hợp HRP được pha loãng ở tỷ lệ 1:1000 trong dung dịch phong bế và được cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Đĩa này được rửa 5 lần bằng PBS chứa 0,1% Tween20, và sau đó tạo màu bằng cơ chất TMB để đo lượng scFv kháng thể liên kết với kháng nguyên bằng đoạn dẫn ELISA. FIG. 2 thể hiện các kết quả của ELISA sử dụng VAMP2. 192 kháng thể được phân tích, và một dòng dương tính thu được bằng cách tùy ý xác định OD 0,5 làm chỉ dẫn dương tính và OD 0,1 làm chỉ dẫn âm tính. Ngoài ra, phân tích này cũng được thực hiện lặp lại nhiều lần sử dụng 192 cụm kháng khác, và tổng số là 9 dòng được chọn (FIG. 2).

<Ví dụ 2> Phân tích trình tự kháng thể VAMP2 scFv

Các dòng đơn lẻ được chọn thông qua việc đọc trình tự đối với 9 dòng dương tính VAMP2 đã chọn bằng phân tích ELISA. Việc đọc trình tự là cần thiết do có khả năng các dòng giống nhau tồn tại giữa các dòng dương tính đã được chọn trước đó. Kết quả của việc phân tích trình tự là khẳng định được rằng tất cả 9 VAMP2 đều thuộc cùng một dòng (Bảng 1).

[Bảng 1]

		CDR1	CDR2	CDR3		CDR1	CDR2	CDR3
VAMP1	L	TGSSSNIGSNNVT	SDSH	GSWDYSLSA	H	NYSMS	AIYSDGSSI	KYRSSKHTPLPSYSNAMDV

<Ví dụ 3> Điều chế scFv kháng VAMP2 có khả năng thẩm tế bào

1. Điều chế cấu trúc TAT-VAMP2 scFv

Sản phẩm PCR trong đó vị trí enzym giới hạn và TAT được cài xen được tạo ra bằng cách sử dụng một trong số các scFv đã chọn trước đó làm đoạn mồi. 30 µl mỗi sản phẩm PCR được xử lý bằng 4 µl đệm 3,1, 1 µl Sal1, 1 µl Xho1 và 4 µl nước cất, được cho phản ứng ở 37°C trong 1 giờ, và sau đó, AND được tách riêng để thu được đoạn cài xen được cài xen vào trong vector. Vector pET28a(+) được biến nạp vào trong tế bào khả biến DH5α, và sau đó cấy vạch trên các đĩa LB đã bổ sung kanamycin, ủ ở 37°C trong 16 giờ, và ngày tiếp theo, các cụm khuẩn được lấy để chủng vào môi trường LB đã bổ sung kanamycin, và nuôi cấy ở 37°C trong 16 giờ. Ngày tiếp theo, vector được tách riêng sử dụng bộ kit mini-prep, và 30 µl vector được xử lý bằng 4 µl đệm 3.1, 1 µl Sal1, 1 µl Xho1, 1 µl CIP và 3 µl nước cất để phản ứng trong 1 giờ ở 37°C sau đó tinh chế. Nồng độ của vector sau khi tinh chế và đoạn cài xen được đo bằng thiết bị Nanodrop, và việc nối được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ sử dụng T4 ligaza theo tỷ lệ vector/đoạn cài xen. Sau khi kết thúc việc nối, nó được biến nạp thành DH5α, cấy vạch trên đĩa LB đã bổ sung kanamycin, ủ ở 37°C trong 16 giờ, và ngày tiếp theo, các cụm khuẩn được lấy để chủng vào môi trường LB đã bổ sung kanamycin và ủ ở 37 °C trong 16 giờ. Ngày tiếp theo, để khẳng định có việc cài xen của đoạn cài xen, plasmit được tách riêng ra và cắt bằng Sal1 và Xho1, và dải này được khẳng định bằng cách điện di trên gel 1% agarosa (FIG. 3).

2. Tinh chế TAT-Kháng thể VAMP2 scFv

Dòng TAT-Kháng thể VAMP2 scFv đã tách dòng được biến nạp vào trong vật chủ *E. coli* BL21(DE3), và thể biến nạp này được gây cảm ứng bằng 1 mM IPTG. Kháng thể scFv được tạo huyền phù trong đệm làm tan (Tris-HCl 50 mM, độ pH=7,5, NaCl 150 mM), nghiền sử dụng máy siêu âm và được ly tâm để thu được dịch nổi. Việc tinh chế protein được thực hiện sử dụng nhựa có ái lực đối với Ni-NTA. Protein sau khi tinh chế được khẳng định là có kích thước protein vào khoảng 30 kDa thông qua phân tích SDS-PAGE (FIG. 4).

<Ví dụ 4> Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào của kháng thể scFv kháng VAMP2 có

khả năng thẩm tế bào

Để xác định khả năng gây độc tế bào của TAT-kháng thể VAMP2 scFv, các tế bào PC12, các tế bào thần kinh ở động vật có vú, được nuôi cấy ở 37°C trong máy ủ CO₂. Sau khi nuôi cấy, mỗi trong số các kháng thể TAT-VAMP2 scFv được xử lý bằng nồng độ (0,1, 1, 10, 50, 100, 200, 400 ppm) và ngoài ra được nuôi cấy trong cùng điều kiện nuôi cấy. Sau khi nuôi cấy, dung dịch MTT{3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoli bromua} được bổ sung vào và được ủ, và sau đó dung dịch nuôi cấy được loại bỏ, DMSO (dimethyl sulfoxit) được bổ sung vào để lysis thích hợp, và độ hấp thụ được đo bằng hệ thống đĩa đọc ELISA ở 570 nm, và các giá trị được thể hiện trong Bảng 2. Như nêu trong Bảng 2, khi TAT-VAMP2 scFv được xử lý ở các nồng độ 0,1, 1, 10, 50, 100, 200, 400 ppm, đã khẳng định được rằng hầu như không có sự thay đổi về hình dạng tế bào và khả năng sống của các tế bào thần kinh ở động vật có vú ở nồng độ lên tới 400 ppm. Do đó, đã phát hiện thấy rằng TAT-VAMP2 scFv là một hợp chất không gây độc tế bào ở nồng độ lên tới 400 ppm.

[Bảng 2]

Nồng độ (ppm)	TAT-VAMP2 scFv
0	100%
0,1	92,9±6,5%
1	106,6±9,0%
10	120,2±2,0%
50	133,4±5,9%
100	116,8±3,1%
200	137,5±6,3%
400	143,0±5,3%

<Ví dụ 5> Thử khả năng ức chế sự tạo thành phức hợp SNARE scFv kháng VAMP2 có khả năng thẩm tế bào

Để xác định xem liệu TAT-kháng thể VAMP2 scFv có ức chế sự tạo thành phức hợp SNARE, phân tích PAGE tự nhiên được tiến hành. Khi các protein SNARE: SNAP25, Syntaxin 1A và protein VAMP2 (LSbio Co.) được trộn ở nồng độ 1:1:1 (1 µg), đã khẳng định được rằng việc tạo thành phức hợp bị ức chế bằng cách bổ sung TAT-Kháng thể VAMP2 scFv. 1 µl mỗi protein được thêm vào, và mỗi trong số các kháng thể TAT-VAMP2 scFv được xử lý đến nồng độ (0,5, 1, 2, 5, 10, 20 µg), trộn nhanh sử dụng

máy trộn xoáy, và được cho phản ứng ở 4°C trong 1 giờ. Khi phản ứng được hoàn thành, dung dịch đệm mẫu được thêm vào để làm dừng phản ứng, và khẳng định việc phức hợp SNARE được tạo thành trên PAGE tự nhiên 10% (FIG. 5). Như được thể hiện trên FIG. 5, TAT-VAMP2 scFv ức chế hiệu quả phức hợp SNARE theo cách phụ thuộc nồng độ (5, 10, 20 µg), và TAT-VAMP2 scFv ức chế sự tạo thành phức hợp SNARE 50% ở nồng độ 5 µg.

<Ví dụ 6> Đánh giá sự ức chế biểu hiện MMP-1 của scFv kháng-VAMP2 có khả năng thâm tế bào

Để nghiên cứu tác động đến sự sản xuất collagen của TAT-VAMP2 scFv, hiệu quả ức chế hoạt tính MMP-1 bằng TAT-VAMP2 scFv được thử nghiệm sử dụng phương pháp PCR theo thời gian thực. Các tế bào thần kinh ở động vật có vú, các tế bào PC12, được nuôi cấy ở 37°C trong máy ủ CO₂. Sau khi ủ, UVA được chiếu xạ sử dụng hệ thống chiếu xạ UV. Sau đó, 10 ppm TAT-kháng thể scFv VAMP2 và 100 ppm adenosin dưới dạng đối chứng dương được xử lý và ngoài ra, nuôi cấy trong cùng điều kiện nuôi cấy. Sau khi nuôi cấy, các tế bào này được thu gom bằng Trizol 300 µl, chuyển vào các lọ 1,5 ml, và 50 µl cloroform được bổ sung vào và trộn xoáy và để ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Sau đó, dịch nổi được chuyển vào ống mới bằng cách ly tâm ở 4°C và 15.000 vòng/phút trong 15 phút, được trộn với cùng lượng 2-propanol, và cho phép để nguyên ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, sau đó ly tâm ở 4°C và 12,000 vòng/phút trong 20 phút. Sau khi ly tâm, 2-propanol được loại bỏ, và 300 µl etanol 75% được thêm vào, sau đó ly tâm ở 4°C và 10,000 vòng/phút trong 10 phút, etanol 75% được loại bỏ, và viên lắng ARN được làm khô nhiệt độ phòng để loại bỏ etanol còn lại. 30 µl nước tinh khiết đã được xử lý bằng DEPC được thêm vào viên lắng nêu trên để hòa tan và định lượng ở 260 nm. 1 µg ARN tổng số được sử dụng cho RT-PCR và hỗn hợp khô TOPscript RT được sử dụng cho RT-PCR. MMP-1 và GAPDH được sử dụng trong phương pháp PCR theo thời gian thực được tổng hợp và được sử dụng trong MacroGen, và các trình tự axit nucleic được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây. PCR theo thời gian thực được thực hiện sử dụng TOPreal™ Qpcr 2X PreMIX. Như được thể hiện trên FIG. 6, TAT-VAMP2 scFv ức chế MMP-1 collagenaza, mà gây ra việc hình thành các nếp nhăn thông qua các tia cực tím. Đã khẳng định được rằng tác dụng cải thiện các nếp nhăn ưu việt hơn so với đối chứng khi được xử lý bằng 10 ppm.

[Bảng 3]

Đoạn mồi	Trình tự	
MMP-1	Xuôi	5'-ACGCAGATTTAGCCTCCGAA-3'
	Ngược	5'-TGACTTGGTAATGGGTTGCC-3'
GAPDH	Xuôi	5'-GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3'
	Ngược	5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'

<Ví dụ 7> Xác định khả năng thâm tế bào của scFv kháng VAMP2 có khả năng thâm tế bào

Để khẳng định hoạt tính thâm tế bào của TAT-VAMP2 scFv, hoạt tính thâm tế bào được khẳng định sử dụng các tế bào PC12, mà là các tế bào thần kinh ở động vật có vú. Các tế bào PC-12 được nuôi cấy trong 24 giờ sử dụng môi trường RPMI-1640 chứa 10% FBS và 1% penixilin/streptomycin trong đĩa 6 lỗ (1×10^6 tế bào/lỗ). Các tế bào đã nuôi cấy được rửa hai lần bằng PBS, và các mẫu được xử lý trong môi trường không chứa huyết thanh không có FBS trong 3 giờ (nồng độ xử lý 50 ug). Sau thời gian phản ứng, mẫu còn lại được loại bỏ bằng cách rửa hai lần bằng PBS, và các tế bào được thu gom trong ống điều chế sử dụng 0,05% trypsin-EDTA. Các tế bào sau khi thu hồi được rửa 3 lần bằng PBS, ly tâm ở 1.500 vòng/phut trong 3 phút, và sau đó, 3 ml EtOH lạnh 70% được thêm vào và để phản ứng trong 1 giờ. Sau khi rửa 3 lần bằng PBS, việc phong bế được thực hiện sử dụng BSA 3%, và việc nhuộm màu được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong 30 phút ở trạng thái râm mát sử dụng His-đầu dò FITC-được liên hợp. Sau phản ứng, dung dịch nhuộm màu được loại bỏ và rửa ba lần bằng PBS. Sau khi loại bỏ dịch nổi, 300 ul PBS được thêm vào mỗi ống FACS, và sau đó, các tế bào này được tạo lại huyền phù hoàn toàn để xác định mức độ thâm của TAT-VAMP2 scFv vào trong các tế bào sử dụng FACSCalibur và FL-1 (488 nm). Như được thể hiện trên FIG. 7, đã phát hiện ra rằng bản thân TAT-VAMP2 scFv có hoạt tính thâm vào trong tế bào tuyệt vời.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả cụ thể bằng cách tham chiếu đến các phương án cụ thể của nó, nhưng rõ ràng là phần mô tả cụ thể này chỉ là phương án ưu tiên và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở đó, như được hiểu bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực này. Nghĩa là, phạm vi thực tế của sáng chế được xác định bằng các điểm yêu cầu bảo hộ đi kèm và các tương đương của nó.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1, CDR2 chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2 và CDR3 chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 3; và

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4, CDR2 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 5, và CDR3 chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 6.

2. Kháng thể dung hợp kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó trong đó peptit TAT được biểu hiện bằng SEQ ID NO: 7 được liên kết bổ sung với kháng thể kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1.

3. Phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 hoặc kháng thể dung hợp kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 2.

4. Vector biểu hiện tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic theo điểm 3.

5. Tế bào được biến nạp bằng vector biểu hiện tái tổ hợp theo điểm 4.

6. Chế phẩm dùng để phát hiện kháng nguyên VAMP2 chứa kháng thể kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 hoặc kháng thể dung hợp kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 2, làm thành phần có hoạt tính.

7. Mỹ phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc cải thiện nếp nhăn trên da chứa kháng thể kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 hoặc kháng thể dung hợp kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 2, làm thành phần có hoạt tính.

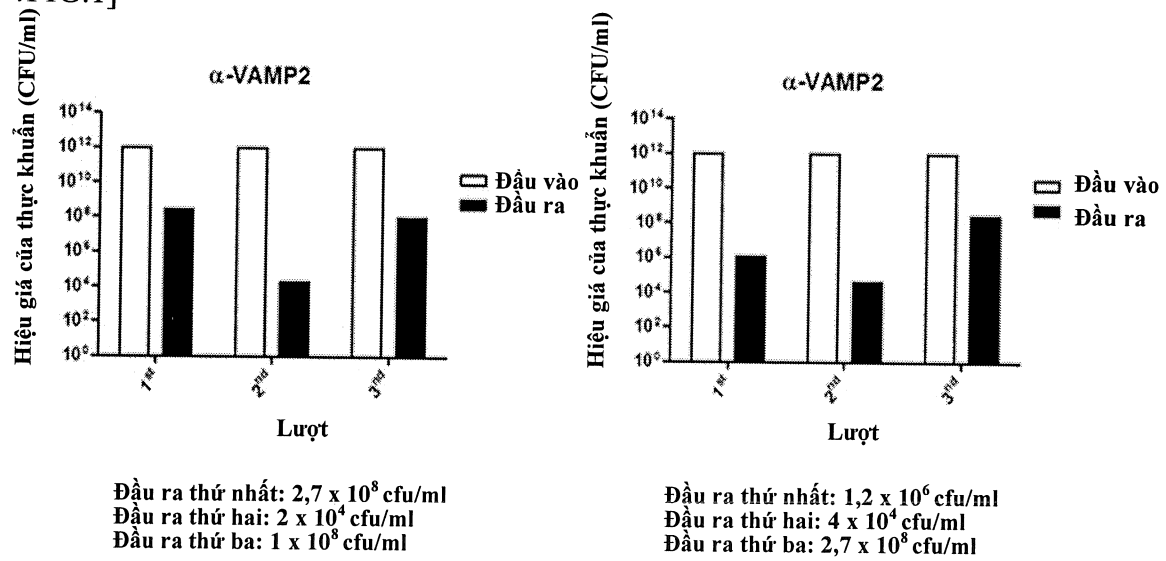
8. Mỹ phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc cải thiện nếp nhăn trên da theo điểm 7, trong đó mỹ phẩm này ức chế sự tạo thành phức hợp SNARE.

9. Thực phẩm chức năng cải thiện sức khỏe dùng để ngăn ngừa hoặc cải thiện nếp nhăn trên da chứa kháng thể kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 hoặc kháng thể dung hợp kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 2, làm thành phần có hoạt tính.

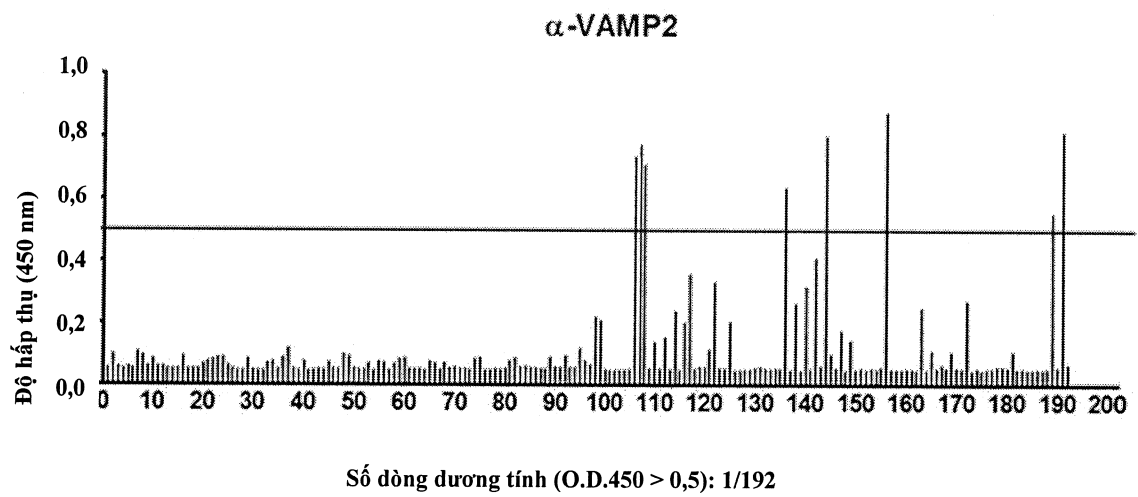
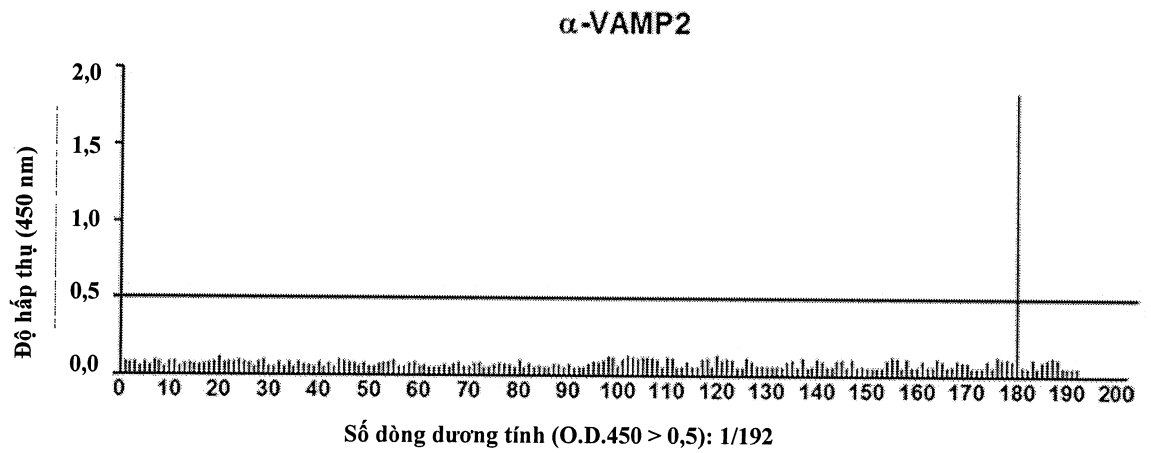
10. Dược phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị nếp nhăn trên da chứa kháng thể kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 hoặc kháng thể dung hợp kháng VAMP2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 2, làm thành phần có hoạt tính.

1/5

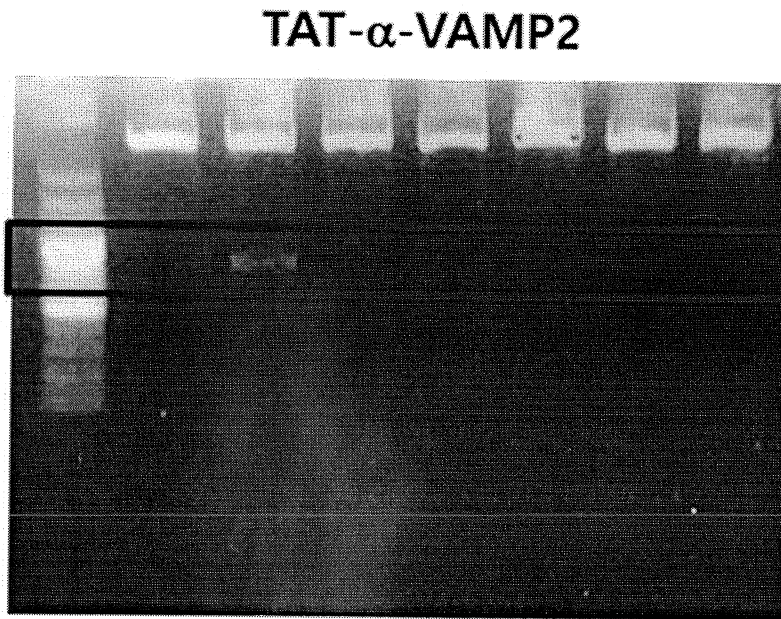
[FIG.1]



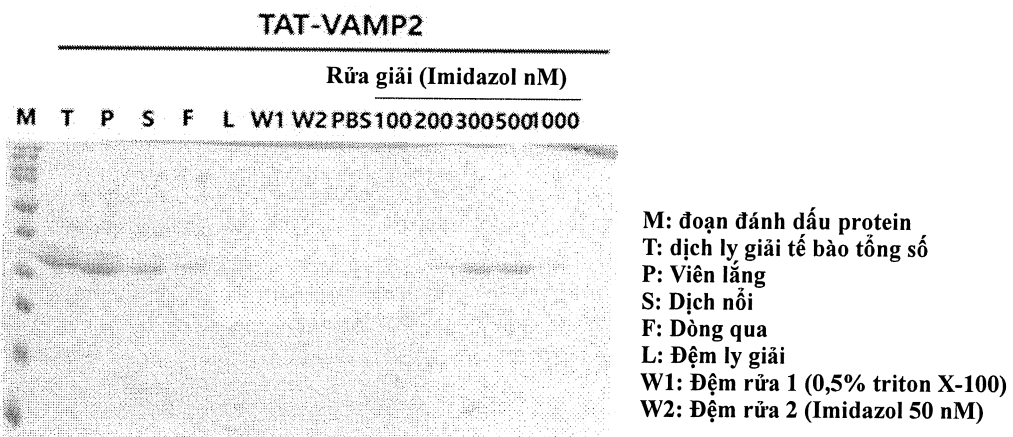
[FIG. 2]



[FIG. 3]

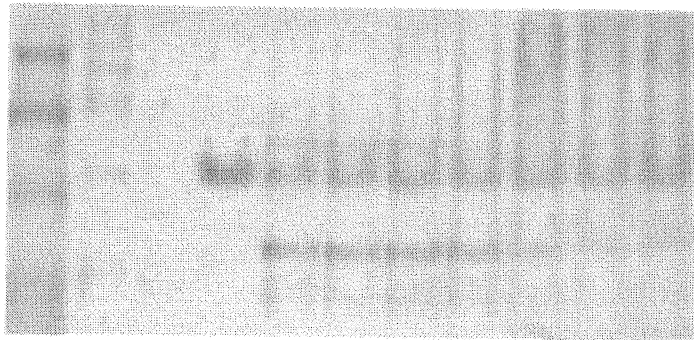


[FIG. 4]

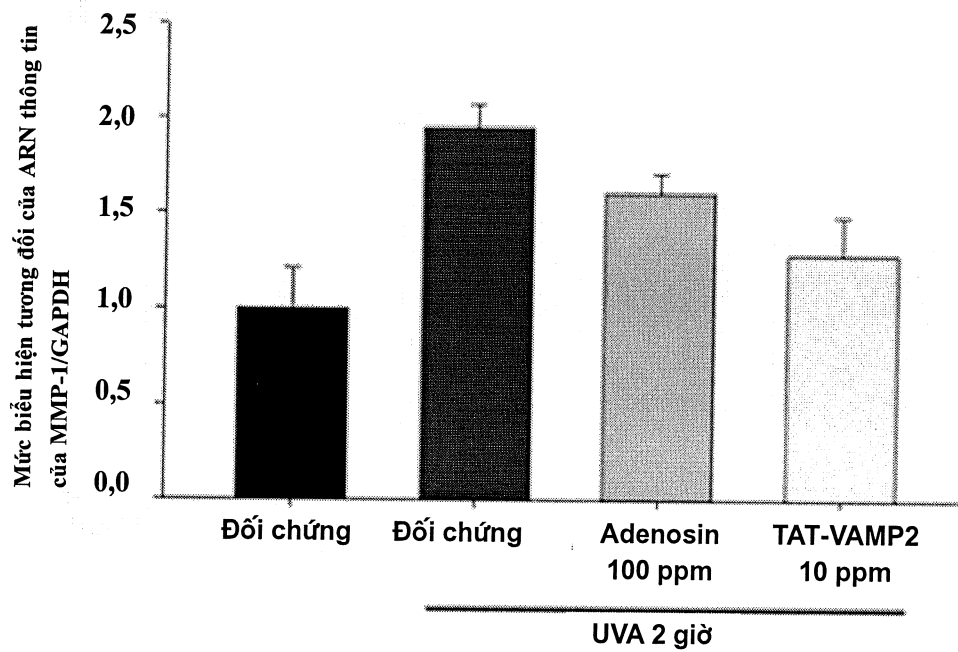


[FIG. 5]

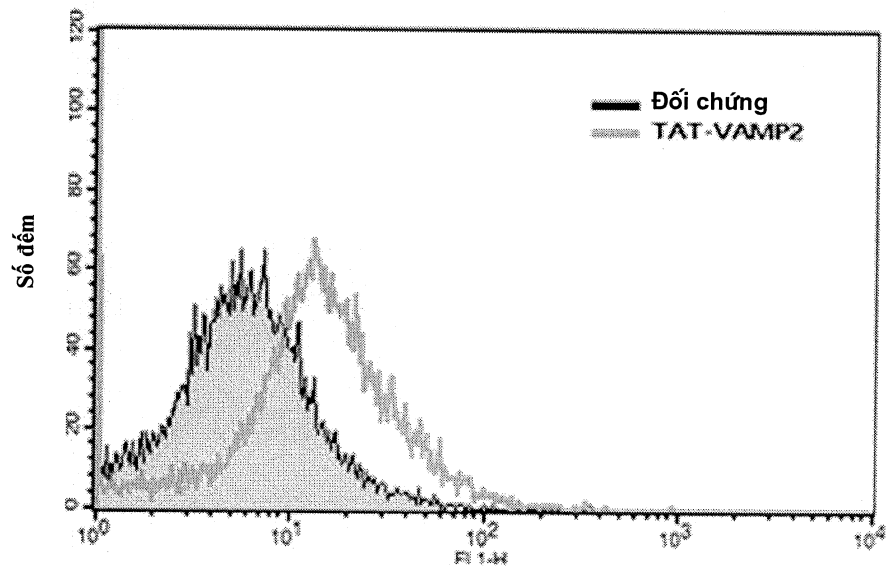
Snap25 (1 ug)	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Syntaxin 1A (1 ug)	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Vamp2 (1 ug)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Vamp2 kháng TAT (ug)				0	0,5	1	2	5	10	20

[FIG. 6]



[FIG. 7]



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> HAUUL BIO
 <120> KHÁNG THỂ KHÁNG VAMP2 DÙNG ĐỂ ỨC CHẾ PHỨC HỢP SNARE VÀ VIỆC SỬ DỤNG
 <130> OP-2019-0047PCT-VN
 <150> KR 10-2018-0098309
 <151> 2018-08-23
 <150> KR 10-2019-0066179
 <151> 2019-06-04
 <160> 8
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> CDR1 chuỗi nhẹ
 <400> 1
 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Asn Val Thr
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> CDR2 chuỗi nhẹ
 <400> 2
 Ser Asp Ser His
 1
 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> CDR3 chuỗi nhẹ

<400> 3
 Gly Ser Trp Asp Tyr Ser Leu Ser Ala
 1 5

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR1 chuỗi nặng

<400> 4
 Asn Tyr Ser Met Ser
 1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR2 chuỗi nặng

<400> 5
 Ala Ile Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ile
 1 5

<210> 6
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR3 chuỗi nặng

<400> 6
 Lys Tyr Arg Ser Ser Lys His Thr Pro Leu Pro Ser Tyr Ser Asn Ala
 1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> TAT peptit

<400> 7

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

<210> 8

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> TAT peptit

<400> 8

tatggccgca aaaaacgccg ccagcgccgc cgc
 33