



(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)



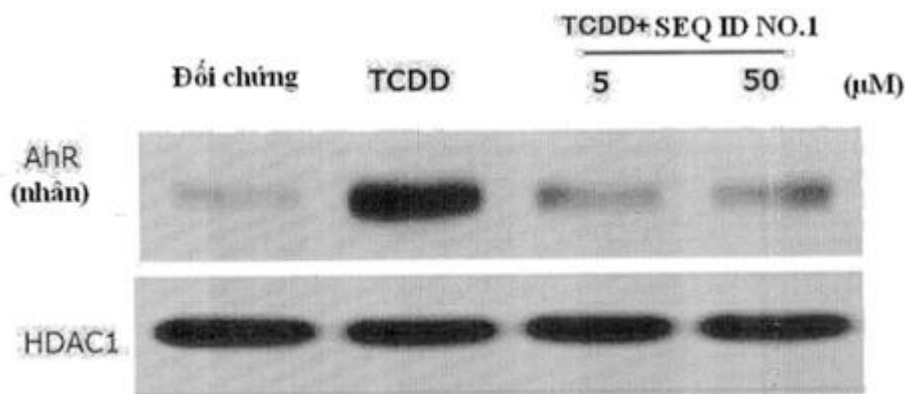
1-0040234

(51)^{2019.01} C07K 7/06; A61K 38/00; A61K 38/08; (13) B
A61Q 19/00; A61Q 19/02; A61Q 19/10;
A23L 33/18; A61K 8/64

(21) 1-2019-05971 (22) 14/02/2018
(86) PCT/KR2018/001953 14/02/2018 (87) WO2018/182172 04/10/2018
(30) 10-2017-0040514 30/03/2017 KR
(45) 25/06/2024 435 (43) 25/05/2020 386
(73) CAREGEN CO., LTD. (KR)
46-38, LS-ro 91beon-gil, Dongan-gu Anyang-si Gyeonggi-do 14119, Republic of Korea
(72) CHUNG, Yong Ji (KR); KIM, Eun Mi (KR); LEE, Eung-Ji (KR).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PEPTIT CÓ HOẠT TÍNH BẢO VỆ TẾ BÀO CHỐNG LẠI CÁC CHẤT GÂY Ô NHIỄM MÔI TRƯỜNG, DƯỢC PHẨM, THỰC PHẨM VÀ MỸ PHẨM CHỨA PEPTIT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến peptit có hoạt tính bảo vệ tế bào chống lại các chất gây ô nhiễm môi trường và dược phẩm, thực phẩm, và mỹ phẩm chứa peptit này. Peptit này cấu thành từ trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, trong đó peptit này gắn kết với dioxin hoặc hợp chất tương tự dioxin, và tùy ý trong đó đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của peptit này được cải biến. Peptit này gắn kết trực tiếp với 2,3,7,8-tetraclodibenzo-p-dioxin, được biết đến là chất độc nhất trong số các chất thuộc nhóm dioxin, và peptit này có hoạt tính ngăn ngừa 2,3,7,8-tetraclodibenzo-p-dioxin thâm nhập qua da và cơ chế hoạt hóa thụ thể aryl hydrocarbon bởi 2,3,7,8-tetraclodibenzo-p-dioxin và hydrocarbon thơm đa vòng chứa trong hạt bụi mịn. Hoạt tính bảo vệ tế bào trực tiếp này chống lại các chất gây ô nhiễm môi trường khác biệt với các phương pháp đã biết chỉ gián tiếp ngăn ngừa tiếp xúc với các chất này hoặc để giảm độc tính bằng cách tạo ra hàng rào bảo vệ.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến peptit có hoạt tính bảo vệ tế bào chống lại các chất gây ô nhiễm môi trường và dược phẩm, thực phẩm, và mỹ phẩm chứa peptit này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các chất gây ô nhiễm môi trường được phân loại là các chất gây rối loạn nội tiết, và bao gồm các hợp chất clo hữu cơ như dioxin, chất trừ sâu, phtalat, benzopyren, penta-phenol đến nonyl-phenol, bisphenol A, kim loại nặng, styren dime và styren trime, và các hợp chất tương tự. Các chất này rất ổn định về mặt hóa học và tồn tại trong môi trường trong một thời gian dài, và có thể thâm nhập vào cơ thể người thông qua chuỗi thức ăn do có mức độ tích tụ sinh học cao.

Trong số các hợp chất này, dioxin bao gồm các hợp chất clo-hydrocarbon có cấu trúc hóa học tương tự, tức là polyclo-dibenzo-*p*-dioxin (PCDD-polyclo-dibenzo-*p*-dioxin) và polyclo-dibenzofuran (PCDF-polyclo-dibenzofuran), và có 75 loại đồng phân PCDD khác nhau và 135 loại đồng phân PCDF khác nhau phụ thuộc vào số lượng của nguyên tử clo được thế.

Dioxin được phát tán hoặc tạo ra trong quá trình đốt chất thải, quá trình tẩy trắng giấy hoặc bột giấy, quá trình sản xuất sản phẩm nhựa, quá trình sản xuất chất trừ sâu clo hữu cơ, và các quá trình tương tự. Do dioxin là các tinh thể rắn không màu ở nhiệt độ phòng, ổn định về mặt nhiệt hóa học, và dễ hòa tan trong chất béo, chúng tích tụ ở các mô béo khi thâm nhập vào cơ thể sống. Tác động của hợp chất này trên cơ thể người có thể bao gồm rối loạn chức năng sinh sản, sảy thai, dị tật thai nhi, biến đổi chức năng điều hòa hormon, phát triển bệnh đái tháo đường, hệ miễn dịch bị rối loạn, gây tổn thương hệ miễn dịch, có khả năng gây bệnh ung thư, và các rối loạn tương tự.

Hạt bụi mịn cấu thành từ lưu huỳnh dioxit, nitơ oxit, chì, ozon, carbon monoxit, và thành phần tương tự. Hạt bụi mịn có đường kính hạt bằng 10µm hoặc nhỏ hơn được gọi là hạt bụi thô (PM10). Hạt bụi mịn có đường kính hạt bằng 2,5µm hoặc nhỏ hơn được gọi là hạt bụi siêu mịn (PM2.5). Hạt bụi mịn có thể có nguồn gốc từ nguồn tự nhiên như

bụi đất, muối biển, hoặc phần hoa thực vật hoặc các nguồn nhân tạo như khói được tạo ra khi nhiên liệu hóa thạch được đốt cháy, khí thải từ phương tiện xe cộ, bụi từ công trường xây dựng, nguyên liệu thô dạng bột và nguyên liệu phụ trợ trong các nhà máy, và khói từ lò đốt rác thải.

Hạt bụi mịn này có đường kính rất nhỏ bằng từ 1/7 đến 1/5 đường kính của sợi tóc người được hít sâu vào cơ thể người mà không được lọc đồng thời xuyên qua khoang mũi, khoang miệng, và ống phế quản. Hạt bụi mịn thâm nhập vào cơ thể người ở dạng trong đó nó được hấp thụ với các chất độc nêu trên có thể gây ra phản ứng viêm ở các cơ quan như đường hô hấp, phổi, hệ tim mạch, và não, do đó gây ra các bệnh về đường hô hấp và bệnh tim mạch. International Agency for Research on Cancer đã phân loại hạt bụi thành các chất gây ung thư nhóm 1 vào tháng 10 năm 2013, theo quy định của Tổ chức Y tế Thế giới.

Cả dioxin và hydrocarbon thơm đa vòng chứa trong hạt bụi mịn được biết đến là có khả năng thâm nhập vào tế bào và hoạt hóa thụ thể aryl hydrocarbon (AhR-aryl hydrocarbon receptor). Thông cơ chế hoạt hóa thụ thể aryl hydrocarbon, các gốc oxy phản ứng được gia tăng trong tế bào và phức hợp dị dime của AhR và protein vận chuyển AhR vào nhân (ARNT-AhR nuclear translocator) gắn kết với yếu tố đáp ứng ngoại sinh làm tăng biểu hiện của các chất điều hòa viêm khác nhau, yếu tố phiên mã liên quan đến tật mắt nhỏ, là yếu tố phiên mã liên quan đến tổng hợp melanin, và metalloproteinaza cấu trúc nền, là enzyme gây ra nếp nhăn, do đó gây ra bệnh viêm da, rối loạn tăng sản quá mức tế bào sắc tố (đốm và tàn nhang), nếp nhăn, và các tình trạng bệnh tương tự trên da.

Các sản phẩm chống lại các chất gây ô nhiễm môi trường đã biết sử dụng nguyên liệu thô ngăn ngừa hấp thu hạt bụi mịn vào da hoặc tăng cường hàng rào bảo vệ da bằng cách sử dụng điện tích. Tuy nhiên, các sản phẩm này chỉ có tác dụng bảo vệ gián tiếp chứ không ức chế trực tiếp cơ chế hoạt hóa thụ thể aryl hydrocarbon của các chất gây ô nhiễm môi trường như dioxin hoặc hạt bụi mịn. Nguyên liệu thô hoặc sản phẩm ức chế tác dụng bất lợi của các chất gây ô nhiễm môi trường tiếp xúc với da vẫn chưa được phát triển.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo đó, các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 gắn kết trực tiếp với 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD-2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin), được biết đến

là chất độc nhất trong số các chất thuộc nhóm dioxin, và peptit này có hoạt tính ngăn ngừa 2,3,7,8-tetraclo-dibenzo-p-dioxin thâm nhập qua da và cơ chế hoạt hóa thụ thể aryl hydrocarbon bởi 2,3,7,8-tetraclo-dibenzo-p-dioxin và hydrocarbon thơm đa vòng chứa trong hạt bụi mịn.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề cập đến peptit cấu thành từ trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, trong đó peptit này gắn kết với dioxin hoặc hợp chất tương tự dioxin, và tùy ý trong đó đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của peptit này được cải biến.

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm điều trị bệnh gây ra bởi dioxin hoặc hợp chất tương tự dioxin, chứa hoạt chất là peptit cấu thành từ trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, tùy ý trong đó đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của peptit này được cải biến.

Sáng chế cũng đề cập đến thực phẩm đối kháng dioxin hoặc hợp chất tương tự dioxin, chứa hoạt chất là peptit cấu thành từ trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, tùy ý trong đó đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của peptit này được cải biến.

Sáng chế cũng đề cập đến mỹ phẩm cải thiện tình trạng da, chứa hoạt chất là peptit nêu trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A là biểu đồ thể hiện cường độ gắn kết của peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 với TCDD, theo một phương án theo sáng chế.

Fig.1B là biểu đồ thể hiện cường độ gắn kết của peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 với TCDD, theo một phương án theo sáng chế.

Fig.1C là biểu đồ thể hiện cường độ gắn kết của peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 với TCDD, theo một phương án theo sáng chế.

Fig.2A là hình ảnh thể hiện kết quả thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế vận chuyển thụ thể aryl hydrocarbon vào nhân của peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 theo một phương án theo sáng chế.

Fig.2B là biểu đồ thể hiện kết quả thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế vận chuyển thụ thể aryl hydrocarbon vào nhân của peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 theo một phương án theo sáng chế.

Fig.2C là hình ảnh thể hiện kết quả thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế vận chuyển thụ thể aryl hydrocarbon vào nhân của peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 theo một phương án theo sáng chế.

Fig.2D là biểu đồ thể hiện kết quả thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế vận chuyển thụ thể aryl hydrocarbon vào nhân của peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 theo một phương án theo sáng chế.

Fig.2E là hình ảnh thể hiện kết quả thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế vận chuyển thụ thể aryl hydrocarbon vào nhân của peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 theo một phương án theo sáng chế.

Fig.2F là biểu đồ thể hiện kết quả thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế vận chuyển thụ thể aryl hydrocarbon vào nhân của peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 theo một phương án theo sáng chế.

Fig.3A là hình ảnh thể hiện kết quả thử nghiệm đánh giá hoạt tính chức chế vận chuyển TCDD vào tế bào của peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 theo một phương án theo sáng chế.

Fig.3B là hình ảnh thể hiện kết quả thử nghiệm đánh giá hoạt tính chức chế vận chuyển TCDD vào tế bào của peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 theo một phương án theo sáng chế.

Fig.3C là hình ảnh thể hiện kết quả thử nghiệm đánh giá hoạt tính chức chế vận chuyển TCDD vào tế bào của peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 theo một phương án theo sáng chế.

Fig.4A là đồ thị thể hiện kết quả phân tích hoạt tính làm giảm nồng độ của các gốc oxy phản ứng của peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 theo một phương án theo sáng chế trong tế bào.

Fig.4B là đồ thị thể hiện kết quả phân tích hoạt tính làm giảm nồng độ của các gốc oxy phản ứng của peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 theo một phương án theo sáng chế trong tế bào.

Fig.4C là đồ thị thể hiện kết quả phân tích hoạt tính làm giảm nồng độ của các gốc oxy phản ứng của peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 theo một phương án theo sáng chế trong tế bào.

Fig.5A là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích PCR định lượng của CYP1A1 và các hợp chất gây viêm bằng cách sử dụng peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 theo một phương án theo sáng chế.

Fig.5B là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích PCR định lượng của CYP1A1 và các hợp chất gây viêm bằng cách sử dụng peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 theo một phương án theo sáng chế.

Fig.5C là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích PCR định lượng của CYP1A1 và các hợp chất gây viêm bằng cách sử dụng peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 theo một phương án theo sáng chế.

Fig.6A là biểu đồ thể hiện kết quả thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế vận chuyển thụ thể aryl hydrocarbon vào nhân của peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 theo một phương án theo sáng chế.

Fig.6B là biểu đồ thể hiện kết quả thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế vận chuyển thụ thể aryl hydrocarbon vào nhân của peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 theo một phương án theo sáng chế.

Fig.6C là biểu đồ thể hiện kết quả thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế vận chuyển thụ thể aryl hydrocarbon vào nhân của peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 theo một phương án theo sáng chế.

Fig.7A là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích PCR định lượng của CYP1A1 và các hợp chất gây viêm bằng cách sử dụng peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 theo một phương án theo sáng chế.

Fig.7B là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích PCR định lượng của CYP1A1 và các hợp chất gây viêm bằng cách sử dụng peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 theo một phương án theo sáng chế.

Fig.7C là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích PCR định lượng của CYP1A1 và các hợp chất gây viêm bằng cách sử dụng peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 theo một phương án theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết trong phần mô tả dưới đây.

Sáng chế đề cập đến peptit có hoạt tính bảo vệ tế bào chống lại các chất gây ô nhiễm môi trường và dược phẩm, thực phẩm, và mỹ phẩm chứa peptit này. Các tác giả sáng chế đã kiểm chứng được rằng peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 gắn kết trực tiếp với 2,3,7,8-tetraclođibenzo-p-dioxin, được biết đến là chất độc nhất trong số các chất thuộc nhóm dioxin, và peptit này có hoạt tính ngăn ngừa 2,3,7,8-tetraclođibenzo-p-dioxin thâm nhập qua da và cơ chế hoạt hóa thụ thể aryl hydrocarbon bởi 2,3,7,8-tetraclođibenzo-p-dioxin và hydrocarbon thơm đa vòng chứa trong hạt bụi mịn. Hoạt tính bảo vệ tế bào trực tiếp này chống lại các chất gây ô nhiễm môi trường khác biệt với các phương pháp đã biết chỉ gián tiếp ngăn ngừa tiếp xúc với các chất này hoặc để giảm độc tính bằng cách tạo ra hàng rào bảo vệ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3.

Peptit này có thể là peptit có đầu tận cùng N và/hoặc đầu tận cùng C được cải biến để chọn lọc đoạn trình tự axit amin và làm tăng hoạt tính của nó. Đầu tận cùng N và/hoặc đầu tận cùng C được cải biến này có thể cải thiện đáng kể độ ổn định của peptit theo sáng chế, ví dụ làm tăng thời gian bán thải *in vivo* của peptit.

Đầu tận cùng N có thể được cải biến bằng cách gắn kết nhóm bảo vệ được chọn từ nhóm bao gồm nhóm axetyl, nhóm fluoreonylmetoxycarbonyl, nhóm formyl, nhóm palmitoyl, nhóm myristyl, nhóm stearyl, và polyetylen glycol vào đầu tận cùng N của peptit. Nhóm bảo vệ có tác dụng bảo vệ peptit theo sáng chế khỏi bị phân cắt bởi enzym phân cắt protein trong cơ thể sống.

Đầu tận cùng C có thể được cải biến bằng cách gắn kết nhóm hydroxyl (-OH), nhóm amino (-NH₂), nhóm azit (-NHNH₂), hoặc nhóm tương tự vào đầu tận cùng C của peptit, nhưng không chỉ giới hạn ở các nhóm này.

Theo một phương án, peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 gắn kết trực tiếp với 2,3,7,8-tetraclođibenzo-p-dioxin, được biết đến là chất độc nhất trong số các chất thuộc nhóm dioxin, và peptit này có hoạt tính ngăn ngừa 2,3,7,8-tetraclođibenzo-p-dioxin thâm nhập qua da và cơ chế hoạt hóa thụ thể aryl hydrocarbon bởi 2,3,7,8-tetraclođibenzo-p-dioxin và hydrocarbon thơm đa vòng chứa trong hạt bụi mịn.

Hydrocarbon thơm đa vòng được đưa vào tế bào gắn kết với thụ thể aryl

hydrocarbon và di chuyển vào nhân tế bào, sau đó tạo thành phức hợp với protein vận chuyển AhR vào nhân gắn kết với yếu tố đáp ứng dioxin để biểu hiện các gen nằm sau. Các gen nằm sau bao gồm CYP1A1 và các yếu tố viêm khác nhau. CYP1A1 tham gia vào quá trình chuyển hóa của các tiền chất gây ung thư khác nhau như benzopyren, và các chất chuyển hóa được tạo ra từ đó phản ứng với ADN để gây đột biến. Ngoài ra, quá trình biểu hiện của các yếu tố viêm như xyclooxygenaza 2 (COX2), yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF- α), và interleukin-1 beta (IL-1 β) được gia tăng, dẫn đến phản ứng viêm khu trú trên một vùng tiếp xúc và phản ứng viêm toàn thân.

Các kết quả này cho thấy rằng peptit theo sáng chế có hoạt tính rất mạnh để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh gây ra bởi hợp chất tương tự dioxin.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến được phẩm phòng ngừa hoặc điều trị bệnh gây ra bởi hợp chất tương tự dioxin, chứa hoạt chất là ít nhất một peptit được chọn từ nhóm bao gồm peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3.

Bệnh gây ra bởi hợp chất tương tự dioxin rất phức tạp và ví dụ về bệnh này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh về da bao gồm bệnh ban clo, tình trạng giảm số lượng tinh trùng, bệnh ung thư tinh hoàn, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, tăng sản nội mạc tử cung, bệnh ung thư vú, nhiễm độc gan, suy giảm miễn dịch, máu nhiễm mỡ, tật lỗ tiểu thấp, tinh hoàn lạc chỗ, dị tật bẩm sinh, tổn thương mạch máu, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, chứng gan to, u xơ tuyến, sút cân, rụng tóc, phù miệng, phù mí mắt, và loét niêm mạc dạ dày (Carter et al., Science 188:738(1975); Fourth Annual Report on Carcinogens, NTP 85-002:170, 185(1985)).

Thuật ngữ “dioxin” thường được sử dụng trên phương tiện thông tin đại chúng để chỉ 2,3,7,8-tetraclo-dibenzo-p-dioxin (TCDD). Tuy nhiên, TCDD là hợp chất thuộc họ polyclo-dibenzo-p-dioxin (PCDD), và PCDD bao gồm 75 loại đồng phân khác nhau theo vị trí và số lượng của các nguyên tử clo. Về mặt sinh học, TCDD được biết đến là PCDD độc nhất.

Trong khi đó, các hydrocarbon thơm khác có đặc tính sinh học tương tự như TCDD, ví dụ họ polyclo-dibenzofuran (PCDF) và họ polyclo-biphenyl (PCB), đã được ghi nhận.

Do đó, thuật ngữ “dioxin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ toàn bộ các hợp

chất thuộc họ PCDD, và thuật ngữ “hợp chất tương tự dioxin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ PCDD, PCDF, và PCB mô tả nêu trên và các hợp chất có tác dụng trên tế bào tương tự như PCDD.

Dioxin, là hợp chất gây ung thư, đã được ghi nhận là gây ra các bệnh nghiêm trọng như rối loạn quá trình sinh sản và phát triển, suy giảm hệ miễn dịch, và can thiệp vào quá trình điều hòa hormon (Yang, J. H. et al., *Carcinogenesis*. 20: 13-18(1999), Lee, Y. W. et al., *Toxicol. Lett.*, 102-103:29-83(1998)).

United States Environmental Protection Agency (EPA) đã thu thập dữ liệu thống kê về tác dụng bất lợi của dioxin và hợp chất tương tự dioxin trên cơ thể người và đã ghi nhận được rằng số lượng tinh trùng giảm khoảng 50%, tần suất xuất hiện của bệnh ung thư tinh hoàn tăng khoảng 3 lần, và tần suất xuất hiện của bệnh ung thư tuyến tiền liệt tăng 2 lần hoặc cao hơn, khi so với dữ liệu thống kê 50 năm trước. Ngoài ra, tần suất xuất hiện của tăng sản nội mạc tử cung và bệnh ung thư vú gây ra bởi dioxin và hợp chất tương tự gia tăng, đã được kiểm chứng khi so với dữ liệu thống kê 50 năm trước.

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa lượng hữu hiệu dược dụng của ít nhất một peptit được chọn từ nhóm bao gồm peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3.

Ngoài ra, dược phẩm có thể còn chứa chất mang dược dụng.

Chất mang dược dụng có thể là hợp chất bất kỳ thường được sử dụng trong bào chế dược phẩm và ví dụ về chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, manitol, tinh bột, gôm acacia, canxi phosphat, alginat, gelatin, canxi silic dioxit, xenluloza vi tinh thể, polyvinyl pyrrolidon, xenluloza, nước, xi-rô, metylxenluloza, metylhydroxy benzoat, propylhydroxy benzoat, talc, magie stearat, và dầu khoáng. Chất mang dược dụng và dược phẩm thích hợp được mô tả chi tiết trong Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995).

Dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa, nhưng không chỉ giới hạn ở, tá dược trơn, chất làm ẩm, chất làm ngọt, chất thơm, chất nhũ hóa, chất gây thẩm ổn định, và chất bảo quản ngoài các hoạt chất.

Dược phẩm có thể được sử dụng qua đường miệng hoặc đường ngoài tiêu hóa, tốt hơn nữa, đường ngoài tiêu hóa. Khi được sử dụng qua đường ngoài tiêu hóa, đường tiêm

bắp, đường tiêm tĩnh mạch, đường tiêm dưới da, đường tiêm màng bụng, đường khu trú, đường qua da, và tương tự có thể được sử dụng, nhưng không chỉ giới hạn ở các đường đưa thuốc này.

Liều lượng của dược phẩm có thể nằm trong khoảng từ 0,0001 μ g/ngày đến 1000 μ g/ngày, nằm trong khoảng từ 0,001 μ g/ngày đến 1000 μ g/ngày, nằm trong khoảng từ 0,01 μ g/ngày đến 1000 μ g/ngày, nằm trong khoảng từ 0,1 μ g/ngày đến 1000 μ g/ngày, hoặc nằm trong khoảng từ 1,0 μ g/ngày đến 1000 μ g/ngày, nhưng không chỉ giới hạn ở các khoảng liều lượng này, và có thể được kê đơn khác nhau phụ thuộc vào các yếu tố như phương pháp bào chế, phương pháp sử dụng, độ tuổi, cân nặng, giới tính, và tình trạng bệnh lý của đối tượng bị bệnh, thực phẩm, thời gian sử dụng, đường đưa thuốc, tốc độ thải trừ, và độ miễn cảm phản ứng.

Dược phẩm có thể được bào chế thành dạng bào chế đơn vị hoặc dạng bào chế đa liều sử dụng chất mang dược dụng và/hoặc tá dược bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng dung dịch trong dầu hoặc môi trường chứa nước, hỗn dịch, nhũ tương, chiết xuất, bột, cốm, viên nén, hoặc viên nang, và có thể còn chứa chất phân tán hoặc chất ổn định.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thực phẩm đối kháng hợp chất tương tự dioxin chứa hoạt chất là ít nhất một peptit được chọn từ nhóm bao gồm peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thực phẩm làm giảm và/hoặc cải thiện bệnh gây ra bởi hợp chất tương tự dioxin chứa hoạt chất là ít nhất một peptit được chọn từ nhóm bao gồm peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3.

Bệnh gây ra bởi hợp chất tương tự dioxin may bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tình trạng giảm số lượng tinh trùng, bệnh ung thư tinh hoàn, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, tăng sản nội mạc tử cung, bệnh ung thư vú, nhiễm độc gan, suy giảm miễn dịch, máu nhiễm mỡ, tật lỗ tiểu thấp, tinh hoàn lạc chỗ, dị tật bẩm sinh, tổn thương mạch máu, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, chứng gan to, u xơ tuyến, sút cân, rụng tóc, phù miệng, phù mí mắt, và loét niêm mạc dạ dày.

Thực phẩm theo sáng chế có thể là các thực phẩm, đồ uống, chất phụ gia thực phẩm khác nhau, và tương tự.

Lượng của hoạt chất là peptit theo sáng chế, được chứa trong thực phẩm này, không bị giới hạn cụ thể và có thể được điều chỉnh thích hợp theo loại thực phẩm, mục đích sử dụng của thực phẩm này, và tương tự, ví dụ nằm trong khoảng từ 0,01% khối lượng đến 15% khối lượng tính trên tổng khối lượng của thực phẩm hoặc nằm trong khoảng từ 0,02 g đến 10g, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,3g đến 1g, tính trên 100mL của đồ uống chức năng.

Khi thực phẩm là đồ uống, các thành phần dạng lỏng không bị giới hạn cụ thể miễn là peptit được chứa dưới dạng thành phần thiết yếu ở tỷ lệ xác định. Đồ uống này có thể còn chứa các thành phần bổ sung như các chất thơm hoặc các cacbonhydrat tự nhiên khác nhau.

Ví dụ về các cacbonhydrat tự nhiên bao gồm chất làm ngọt thông thường, ví dụ monosacarit như glucoza và fructoza, disacarit như maltoza và sucroza, và polysacarit như dextrin và xyclodextrin, và rượu đường như xylitol, sorbitol, và erythritol.

Ngoài các hợp chất mô tả nêu trên, chất thơm tự nhiên (ví dụ, thaumatin và chiết xuất cỏ ngọt stevia, ví dụ rebaudiosit A và glycyrrhizin) và chất thơm tổng hợp (ví dụ, saccharin và aspartam) có thể được sử dụng hữu hiệu làm chất thơm. Lượng của các cacbonhydrat tự nhiên có thể nằm trong khoảng từ 1 g đến 20g, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 5g đến 12g, tính trên 100mL đồ uống theo sáng chế.

Thực phẩm theo sáng chế có thể còn chứa chất dinh dưỡng, vitamin, khoáng chất, chất thơm như chất thơm tổng hợp và chất thơm tự nhiên, chất màu, và chất độn (pho mát, sô cô la, v.v.), axit pectic và muối của nó, axit alginic và muối của nó, axit hữu cơ, chất làm đặc bảo vệ dạng keo, chất điều chỉnh độ pH, chất ổn định, chất bảo quản, glycerin, rượu, và chất tạo ga được sử dụng trong đồ uống có ga.

Thực phẩm theo sáng chế có thể còn chứa thịt quả để chế biến nước ép trái cây tự nhiên, đồ uống nước ép trái cây, và đồ uống từ rau xanh. Các thành phần này có thể được sử dụng riêng hoặc kết hợp. Lượng của các chất phụ gia này không quan trọng, nhưng có thể nằm trong khoảng từ 0 đến 20 phần khối lượng tính trên 100 phần khối lượng của thực phẩm theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến mỹ phẩm cải thiện tình trạng da chứa hoạt chất là ít nhất một peptit được chọn từ nhóm bao gồm peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3.

Mỹ phẩm theo sáng chế có thể chứa (a) lượng hữu hiệu của peptit theo sáng chế mô tả nêu trên, và/hoặc (b) chất mang chấp nhận dùng trong mỹ phẩm, nhưng không chỉ giới hạn ở các thành phần này.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu về mặt mỹ phẩm” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ lượng đủ để đạt được tác dụng mong muốn của mỹ phẩm theo sáng chế để cải thiện tình trạng da.

Mỹ phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành chế phẩm bất kỳ thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Ví dụ, mỹ phẩm có thể được bào chế thành, dung dịch, hỗn dịch, nhũ tương, bột nhão, gel, kem, thuốc xức, thuốc bột, xà phòng, chế phẩm tẩy trang chứa chất hoạt động bề mặt, dầu, kem nền dạng bột, kem nền dạng nhũ tương, kem nền dạng sáp, và thuốc xịt, nhưng không chỉ giới hạn ở các chế phẩm này. Cụ thể hơn, mỹ phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành thuốc xức làm mềm, thuốc xức nuôi dưỡng, kem nuôi dưỡng, kem mát-xa, nước hoa, kem xoa mát, kem tẩy trang, chế phẩm tẩy trang dạng bột, kem tẩy trang, thuốc đắp, thuốc xịt, hoặc thuốc bột.

Khi mỹ phẩm theo sáng chế được bào chế thành bột nhão, kem, hoặc gel, chất mang có thể là dầu động vật, plant dầu, sáp, parafin, tinh bột, tragacanth, dẫn xuất xenluloza, polyetylen glycol, silicon, bentonit, silic dioxit, talc, kẽm oxit, hoặc tương tự.

Khi mỹ phẩm theo sáng chế được bào chế thành thuốc bột hoặc thuốc xịt, chất mang có thể là lactoza, talc, silic dioxit, nhôm hydroxit, canxi silic dioxit, hoặc polyamit dạng bột. Đặc biệt là, khi mỹ phẩm theo sáng chế được bào chế ở dạng thuốc xịt, chất đẩy như cloflohydrocarbon, propan/butan, hoặc dimetyl ete có thể cũng được sử dụng.

Khi mỹ phẩm theo sáng chế được bào chế thành dung dịch or nhũ tương, chất mang có thể là dung môi, chất hòa tan, hoặc chất nhũ hóa, như nước, etanol, isopropanol, etyl carbonat, etyl acetat, benzyl rượu, benzyl benzoat, propylen glycol, 1,3-butylglycol dầu, glycerol aliphatic este, polyetylen glycol, hoặc este axit béo của sorbitan.

Khi mỹ phẩm theo sáng chế được bào chế thành hỗn dịch, chất mang có thể là tá dược pha loãng dạng lỏng như nước, etanol, hoặc propylen glycol, chất gây thẩm ổn định

như rượu etoxy-isostearic, polyoxyetylen sorbitol este, và polyoxyetylen sorbitan este, xenluloza vi tinh thể, nhôm metahydroxit, bentonit, agar, và tragacanth.

Khi mỹ phẩm theo sáng chế được bào chế thành chế phẩm tẩy trang chứa chất hoạt động bề mặt, chất mang có thể là rượu sulfat béo, rượu ete sulfat béo, sulfosuccinic monoeste, isethionat, dẫn xuất imidazolin, metyl taurat, sarcosinat, axit béo amit ete sulfat, alkyl amidobetain, rượu béo, glycerit axit béo, dietanolamit axit béo, dầu thực vật, dẫn xuất lanolin, hoặc este axit béo etoxyl-glycerol.

Ngoài hoạt chất là peptit và chất mang, mỹ phẩm theo sáng chế có thể còn chứa các thành phần khác thường được sử dụng trong mỹ phẩm. Ví dụ, mỹ phẩm theo sáng chế có thể còn chứa chất hỗ trợ thông thường như chất chống oxy hóa, chất ổn định, chất hòa tan, vitamin, chất màu, và chất thơm.

Thuật ngữ “cải thiện tình trạng da” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quá trình điều trị, làm giảm, và cải thiện tình trạng tổn thương da gây ra bởi yếu tố nội sinh hoặc ngoại sinh, và tác động của yếu tố này, ví dụ tác dụng làm giảm hoặc cải thiện tình trạng viêm xuất hiện trên da, nhưng không chỉ giới hạn ở tác dụng này.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh gây ra bởi hợp chất tương tự dioxin.

Phương pháp này có thể bao gồm cho được phẩm chứa hoạt chất là ít nhất một peptit được chọn từ nhóm bao gồm peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3, tiếp xúc với đối tượng bị bệnh. Được phẩm là như mô tả nêu trên.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh gây ra bởi hợp chất tương tự dioxin. Peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 là như mô tả nêu trên.

Thuật ngữ “peptit” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phân tử mạch thẳng cấu thành từ các gốc axit amin được liên kết thông qua liên kết peptit. Peptit theo sáng chế có thể được điều chế bằng phương pháp tổng hợp hóa học đã biết bất kỳ, đặc biệt là phương pháp tổng hợp pha rắn (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptit Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)) hoặc

phương pháp tổng hợp pha lỏng (Patent Mỹ số 5,516,891).

Thuật ngữ “độ ổn định” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ cả độ ổn định *in vivo* lẫn độ ổn định bảo quản (ví dụ, độ ổn định bảo quản ở nhiệt độ phòng).

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu được dụng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ lượng đủ để đạt được tác dụng hoặc hoạt tính của peptit.

Sáng chế đề cập đến peptit có hoạt tính bảo vệ tế bào chống lại các chất gây ô nhiễm môi trường và dược phẩm, thực phẩm, và mỹ phẩm chứa peptit này. Các tác giả sáng chế đã kiểm chứng được rằng peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 gắn kết trực tiếp với 2,3,7,8-tetraclođibenzo-p-dioxin, được biết đến là chất độc nhất trong số các chất thuộc nhóm dioxin, và peptit này có hoạt tính ngăn ngừa 2,3,7,8-tetraclođibenzo-p-dioxin thâm nhập qua da và cơ chế hoạt hóa thụ thể aryl hydrocarbon bởi 2,3,7,8-tetraclođibenzo-p-dioxin và hydrocarbon thơm đa vòng chứa trong hạt bụi mịn. Hoạt tính bảo vệ tế bào trực tiếp này chống lại các chất gây ô nhiễm môi trường khác biệt với các phương pháp đã biết chỉ gián tiếp ngăn ngừa tiếp xúc với các chất này hoặc để giảm độc tính bằng cách tạo ra hàng rào bảo vệ.

Sáng chế đề cập đến peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ sau. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế sáng chế.

Ví dụ điều chế. Tổng hợp danh mục trình tự

Nhựa clotrityl clorua (70g, nhựa CTC, Nova biochem Cat No. 01-64-0021) được bổ sung vào thiết bị phản ứng và metylen clorua (490mL, MC) được bổ sung vào, sau đó khuấy trong 3 phút. Sau đó, sau khi dung dịch phản ứng được loại bỏ, dimetyl formamit (490mL, DMF) được bổ sung vào, hỗn hợp thu được được khuấy trong 3 phút, và dung môi được loại bỏ. Dung dịch diclometan (700mL) được bổ sung vào thiết bị phản ứng, sau đó Fmoc-Tyr(tBu)-OH (200mmol, Bachem, Swiss) và diisopropyl etylamin (400mmol, DIEA) được bổ sung vào. Hỗn hợp thu được được hòa tan bằng cách khuấy và duy trì trong 1 giờ kết hợp khuấy. Sau khi hỗn hợp thu được được rửa, metanol và DIEA (2:1) được hòa tan trong diclometan (DCM) và duy trì trong 10 phút, sau đó hỗn

hợp thu được được rửa bằng lượng dư của DCM/DMF (1:1). Sau đó, sau khi dung dịch phản ứng được loại bỏ, dimethyl formamit (490mL, DMF) được bổ sung vào, và hỗn hợp thu được được khuấy trong 3 phút, sau đó dung môi được loại bỏ. Dung dịch khử bảo vệ (700mL, 20% piperidin/DMF) được bổ sung vào thiết bị phản ứng và khuấy 10 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó dung dịch phản ứng được loại bỏ. Sau khi lượng tương đương của dung dịch khử bảo vệ được bổ sung vào và duy trì trong 10 phút, dung dịch phản ứng được loại bỏ và hỗn hợp thu được được rửa hai lần bằng DMF, một lần bằng MC, và một lần bằng DMF, mỗi lần 3 phút để thu được nhựa Tyr(tBu)-CTL resin.

Dung dịch DMF (700mL) được bổ sung vào thiết bị phản ứng mới, và Fmoc-Arg(Pbf)-OH (200mmol, Bachem, Swiss), HoBt (200mmol), và HBTu (200mmol) được bổ sung vào và hòa tan bằng cách khuấy. DIEA (400mmol) được bổ sung hai lần vào thiết bị phản ứng và hỗn hợp thu được được khuấy trong ít nhất 5 phút để hòa tan hoàn toàn các chất rắn. Dung dịch chứa hỗn hợp axit amin đã được hòa tan được bổ sung vào thiết bị phản ứng chứa nhựa đã được khử bảo vệ và duy trì trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng kết hợp khuấy. Sau khi dung dịch phản ứng được loại bỏ, hỗn hợp thu được được khuấy với dung dịch DMF ba lần, mỗi lần 5 phút, sau đó dung dịch DMF được loại bỏ. Lượng nhỏ của nhựa phản ứng được lấy ra và mức độ phản ứng được kiểm tra bằng phép thử Kaiser (phép thử nihydri). Phản ứng khử bảo vệ được thực hiện hai lần theo cách thức tương tự bằng cách sử dụng dung dịch khử bảo vệ để thu được nhựa Arg(Pbf)-Tyr(tBu)-CTL. Nhựa này được rửa sạch bằng DMF và MC và sau đó kiểm tra bằng phép thử Kaiser một lần nữa, sau đó bằng thử nghiệm gắn kết axit amin như mô tả nêu trên. Theo trình tự axit amin được chọn, các phản ứng chuỗi được thực hiện theo trình tự Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Trp-OH, và Fmoc-Lys(Boc)-OH. Sau khi nhóm bảo vệ Fmoc được cho phản ứng với dung dịch khử bảo vệ hai lần, mỗi lần 10 phút, dung dịch khử bảo vệ được loại bỏ bằng cách rửa. Nhựa peptidyl được rửa bằng DMF, MC, và metanol ba lần đối với mỗi dung môi, và làm khô trong điều kiện phun từ từ khí nitơ, sau đó làm khô hoàn toàn trong khí P₂O₅ trong điều kiện chân không. Sau đó, dung dịch rời chuyển (1900mL) [81,5% axit trifloaxetic, 5,0% nước cất, 5,0% thioanisol, 5,0% phenol, 2,5% etandithiol (EDT), và 1,0% triisopropylsilan (TIS)] được bổ sung vào, và hỗn hợp phản ứng được duy trì ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ kết hợp lắc. Nhựa thu được được lọc, rửa bằng lượng nhỏ của dung dịch TFA, và trộn với dịch cái. Ete lạnh được bổ sung vào dịch cái (2090mL) để gây kết tủa, và hỗn hợp phản ứng được ly tâm để

thu được các kết tủa, sau đó rửa hai lần bằng ete lạnh. Sau khi loại bỏ dịch cái, hỗn hợp thu được được làm khô hoàn toàn trong điều kiện khí nitơ để thu được peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 trước khi tinh chế (70,8g, hiệu suất: 97,0%). Peptit này có khối lượng phân tử bằng 822,9 (trị số lý thuyết: 822,9) khi được phân tích bằng thiết bị phân tích khối lượng phân tử.

Các peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.3 được tổng hợp theo phương pháp tương tự như phương pháp nêu trên.

Bảng 1

SEQ ID NO.	Danh mục trình tự	Trị số phân tích (thiết bị khối phổ)	
		Trị số thu được	Trị số lý thuyết
1	KWGGGRY	822,9	822,9
2	ILGRWCG	803,9	803,9
3	DVENTS	663,6	663,6

Ví dụ 1. Thử nghiệm gắn kết *in vitro*

Mỗi peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, và SEQ ID NO.3 được trộn với dung dịch đệm phủ (20mM natri phosphat, độ pH bằng 9,6) ở nồng độ bằng 1,8mM được cấy trải trên đĩa để thực hiện thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) và ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau đó, peptit được rửa bằng dung dịch đệm muối phosphat chứa Tween-20 (PBST) và phong bế bằng 3% albumin huyết thanh bò (BSA) trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa bằng PBST, 2,3,7,8-tetraclobenzo-p-dioxin (2µM) được bổ sung vào mỗi giếng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Sau đó, sau khi rửa bằng PBST, quá trình xử lý bằng kháng thể kháng TCDD được tiếp hợp với fluorescein isothioxyanat (FITC) được thực hiện ở tỷ lệ của kháng thể:PBST=1:100 và hỗn hợp thu được được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, sau khi rửa bằng PBST, độ hấp thụ ở bước sóng kích thích 488nm/bước sóng phát xạ 520nm được đo bằng thiết bị đo huỳnh quang, và các kết quả được thể hiện trên Fig.1A-Fig.1C, và Bảng 2.

Bảng 2

SEQ ID NO.	Đối chứng	50 µM	500 µM	1000 µM	2000 µM
1	100%	193%	360%	394%	575%
2	100%	128%	264%	358%	405%
3	100%	159%	253%	400%	420%

Như được thể hiện trên Fig.1A-Fig.1C, và Bảng 2, các tác giả sáng chế đã kiểm chứng được rằng peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ

ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 gắn kết trực tiếp với 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.

Ví dụ 2. Thử nghiệm vận chuyển thụ thể aryl hydrocarbon vào nhân

Các tế bào HaCaT (tế bào sừng của người) được tạo mầm trên đĩa 6 giếng ở mật độ bằng 3×10^5 tế bào/giếng và nuôi cấy qua đêm. Sau đó, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (10nM) và peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 (50 μ M) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Sau 30 phút phản ứng, các tế bào được xử lý trong 1 giờ và thu gom để thu nhận các protein nhân và bào tương được phân tách với nhau. Phương pháp thẩm tách Western được thực hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng thụ thể aryl hydrocarbon (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.) để xác định mức độ hoạt hóa thụ thể aryl hydrocarbon được vận chuyển vào tế bào, và các kết quả được thể hiện trên Fig.2A-Fig.2F và Bảng 3.

Bảng 3

SEQ ID NO.	Đối chứng	TCDD	TCDD + Peptit	
			5 μ M	50 μ M
1	1 lần	5,8 lần	1,9 lần	1,9 lần
2	1 lần	5,7 lần	2,5 lần	0,9 lần
3	1 lần	5,9 lần	3 lần	1,5 lần

Như được thể hiện trên Fig.2A-Fig.2F và Bảng 3, các tác giả sáng chế đã kiểm chứng được rằng peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 có hoạt tính ức chế quá trình vận chuyển thụ thể aryl hydrocarbon vào nhân bởi 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.

Ví dụ 3. Thử nghiệm vận chuyển TCDD vào tế bào

Các tế bào HaCaT (tế bào sừng của người) được tạo mầm trên đĩa 6 giếng ở mật độ bằng 3×10^5 tế bào/giếng và nuôi cấy qua đêm. Sau đó, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (50nM) và peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 (50 μ M) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Sau 30 phút phản ứng, các tế bào được xử lý trong 5 phút và cố định bằng paraformaldehyt 4% trong 30 phút. Sau đó, sau khi rửa ba lần, các tế bào được cho phản ứng với Triton X-100 0,5% trong 15 phút và rửa ba lần. Sau đó, các tế bào được phong bế bằng 3% BSA trong 1 giờ và cho phản ứng với kháng thể sơ cấp kháng TCD được tiếp hợp với fluorescein isothioxyanat (FITC) (1:100) ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Các tế bào được nhuộm màu và gắn kết với 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) và quan sát bằng kính hiển vi huỳnh

quang. Các kết quả được thể hiện trên Fig.3A-Fig.3C. Như được thể hiện trên Fig.3A-3C, peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 có hoạt tính ức chế quá trình vận chuyển 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin vào tế bào.

Ví dụ 4. Phân tích các gốc oxy phản ứng trong tế bào

Các tế bào HaCaT (tế bào sừng của người) được tạo mầm trên đĩa 6 giếng ở mật độ bằng 3×10^5 tế bào/giếng và nuôi cấy qua đêm. Sau đó, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (10nM) và peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 (50 μ M) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Sau 30 phút phản ứng, các tế bào được xử lý trong 24 giờ và tiếp tục được cho phản ứng với DCFH-DA trong 30 phút. Sau đó, các tế bào được thu gom và phân tích bằng phương pháp FACS để đánh giá mức độ thay đổi của các trị số FL1 trung bình, và các kết quả được thể hiện trên Fig.4A-Fig.4C. Như được thể hiện trên Fig.4A-Fig.4C, peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 có tác dụng làm giảm nồng độ của các gốc oxy phản ứng được gia tăng bởi 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin trong tế bào.

Ví dụ 5. Phân tích PCR định lượng CYP1A1 và các hợp chất gây viêm

Các tế bào HaCaT (tế bào sừng của người) được tạo mầm trên đĩa 6 giếng ở mật độ bằng 3×10^5 tế bào/giếng và nuôi cấy qua đêm. Sau đó, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (10nM) và peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 (50 μ M) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Sau 30 phút phản ứng, các tế bào được xử lý trong 6 giờ hoặc 24 giờ và thu gom để phân tách ARN. Sau khi định lượng ARN, ADN bổ sung được tổng hợp bằng cách sử dụng kit tổng hợp ADN bổ sung (Intron, Korea). Sau đó, phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) được thực hiện bằng cách sử dụng kit PCR PreMix (Intron, Korea) và đoạn mồi đặc hiệu đối với mỗi hợp chất bao gồm CYP1A1, TNF- α , IL-6, IL-1 β , và COX-2 được thể hiện trên Bảng 4. Sau đó, bằng cách điện di hỗn hợp thu được trên gel agarosa 5%, mức độ biểu hiện của ARN thông tin mã hóa các yếu tố sinh trưởng này được so sánh trong các điều kiện xử lý các mẫu tương ứng, và các kết quả được thể hiện trên Fig.5A-Fig.5C.

Bảng 4

SEQ ID NO.	Đoạn mồi	Trình tự (5'-3')
4	CYP1A1_F	GGATCTTTCTCTGTACCCTGG
5	CYP1A1_R	AGCATGTCCTTCAGCCCAGA
6	TNF- α _F	CGTCAGCCGATTRTGCTATCT
7	TNF- α _R	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG
8	IL-6_F	AAAGAGGCACTGCCAGAAAA
9	IL-6_R	ATCTGAGGTGCCCATGCTAC
10	IL-1 β _F	TTCGACACATGGGATAACGA
11	IL-1 β _R	TCTTTCAACACGCAGGACAG
12	COX-2_F	ATCATTCACCAGGCAAATTGC
13	COX-2_R	GGCTTCAGCATAAAGCGTTTG

Như được thể hiện trên Fig.5A-Fig.5C, peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 có hoạt tính ức chế biểu hiện CYP1A1 và các yếu tố viêm khác nhau gây ra bởi 2,3,7,8-tetraclobenzo-p-dioxin.

Ví dụ 6. Thử nghiệm vận chuyển thụ thể aryl hydrocarbon nhân

Các tế bào HaCaT (tế bào sừng của người) được tạo mầm trên đĩa 6 giếng ở mật độ bằng 3×10^5 tế bào/giếng và nuôi cấy qua đêm. Hạt bụi ở khu đô thị (10nM, PM, Sigma Aldrich, USA) và peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 (50 μ M) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Sau 30 phút phản ứng, các tế bào được xử lý trong 1 giờ và thu gom để thu nhận các protein nhân và bào tương được phân tách với nhau. Sau đó, phương pháp thấm tách Western được thực hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng thụ thể aryl hydrocarbon (Santa Cruz Biotechnology, USA) để xác định mức độ hoạt hóa thụ thể aryl hydrocarbon được vận chuyển vào tế bào, và các kết quả được thể hiện trên Fig.6A-Fig.6C. Như được thể hiện trên Fig.6A-Fig.6C, peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 có hoạt tính ức chế quá trình vận chuyển thụ thể aryl hydrocarbon vào nhân bởi hạt bụi.

Ví dụ 7. Phân tích PCR định lượng CYP1A1 và các hợp chất gây viêm

Các tế bào HaCaT (tế bào sừng của người) được tạo mầm trên đĩa 6 giếng ở mật độ bằng 3×10^5 tế bào/giếng và nuôi cấy qua đêm. Sau đó, Hạt bụi ở khu đô thị (10nM, PM) và peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 (50 μ M) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Sau 30 phút phản ứng, các tế bào được xử lý trong 6 giờ hoặc 24 giờ và thu gom để phân tách ARN. Sau khi định lượng ARN, ADN bổ sung được tổng hợp bằng cách sử dụng kit tổng hợp ADN bổ sung

(Intron, Korea). Sau đó, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng kit PCR PreMix (Intron, Korea) và đoạn mồi đặc hiệu đối với mỗi hợp chất bao gồm CYP1A1, TNF- α , IL-6, IL-1 β , và COX-2 được thể hiện trên Bảng 5. Sau đó, bằng cách điện di hỗn hợp thu được trên gel agarosa 5%, mức độ biểu hiện của ARN thông tin mã hóa các yếu tố sinh trưởng này được so sánh trong các điều kiện xử lý các mẫu tương ứng, và các kết quả được thể hiện trên Fig.7A-Fig.7C.

Bảng 5

SEQ ID NO.	Đoạn mồi	Trình tự (5'-3')
4	CYP1A1_F	GGATCTTTCTCTGTACCCTGG
5	CYP1A1_R	AGCATGTCCTTCAGCCCAGA
6	TNF- α _F	CGTCAGCCGATTGTGCTATCT
7	TNF- α _R	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG
8	IL-6_F	AAAGAGGCACTGCCAGAAAA
9	IL-6_R	ATCTGAGGTGCCCATGCTAC
10	IL-1 β _F	TTCGACACATGGGATAACGA
11	IL-1 β _R	TCTTTCAACACGCAGGACAG
12	COX-2_F	ATCATTACACAGGCAAATTGC
13	COX-2_R	GGCTTCAGCATAAAGCGTTTG

Như được thể hiện trên Fig.7A-Fig.7C, peptit chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, hoặc SEQ ID NO.3 có hoạt tính ức chế biểu hiện CYP1A1 và các yếu tố viêm khác nhau gây ra by particulate matter.

Khả năng ứng dụng công nghiệp

Sáng chế đề cập đến peptit có hoạt tính bảo vệ tế bào chống lại các chất gây ô nhiễm môi trường và dược phẩm, thực phẩm, và mỹ phẩm chứa peptit này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Peptit cấu thành từ trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, trong đó peptit này gắn kết với dioxin hoặc hợp chất tương tự dioxin, và tùy ý trong đó đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của peptit này được cải biến.
2. Peptit theo điểm 1, trong đó peptit này chứa gốc cải biến ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C.
3. Peptit theo điểm 2, trong đó peptit này chứa gốc cải biến ở đầu tận cùng N là nhóm bảo vệ được chọn từ nhóm bao gồm nhóm axetyl, nhóm fluorenylmethoxycarbonyl, nhóm formyl, nhóm palmitoyl, nhóm myristyl, nhóm stearyl, và polyetylen glycol (PEG).
4. Peptit theo điểm 2, trong đó peptit này chứa gốc cải biến ở đầu tận cùng C được chọn từ nhóm bao gồm nhóm amino ($-NH_2$) và nhóm azit ($-NHNH_2$).
5. Peptit theo điểm 1, trong đó hợp chất tương tự dioxin được chọn từ nhóm bao gồm polyclo-dibenzo-p-dioxin (PCDD), polyclo-dibenzofuran (PDCF), và polyclo-biphenyl (PCB).
6. Dược phẩm điều trị bệnh gây ra bởi dioxin hoặc hợp chất tương tự dioxin, chứa hoạt chất là peptit cấu thành từ trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, tùy ý trong đó đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của peptit này được cải biến.
7. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó hợp chất tương tự dioxin được chọn từ nhóm bao gồm polyclo-dibenzo-p-dioxin (PCDD), polyclo-dibenzofuran (PDCF), và polyclo-biphenyl (PCB).
8. Dược phẩm theo điểm 7, trong đó polyclo-dibenzo-p-dioxin là 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).
9. Dược phẩm điều trị bệnh gây ra bởi dioxin hoặc hợp chất tương tự dioxin, chứa hoạt chất là peptit cấu thành từ trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, tùy ý trong đó đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của peptit này được cải biến, trong đó bệnh gây ra bởi dioxin hoặc hợp chất tương tự dioxin được chọn từ nhóm bao gồm bệnh về da, tình trạng giảm số lượng tinh trùng, bệnh ung thư tinh hoàn, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, tăng sản nội mạc tử cung, bệnh ung thư vú, nhiễm độc gan, suy giảm miễn dịch, máu nhiễm mỡ, tật lỗ tiểu thấp, tinh hoàn lạc chỗ, dị tật bẩm sinh, tình trạng tổn thương mạch, bệnh ung

thư biểu mô tế bào gan, chứng gan to, u xơ tuyến, sút cân, rụng tóc, phù miệng, phù mí mắt, và loét niêm mạc dạ dày.

10. Dược phẩm điều trị bệnh gây ra bởi dioxin hoặc hợp chất tương tự dioxin, chứa hoạt chất là peptit cấu thành từ trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, tùy ý trong đó đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của peptit này được cải biến, trong đó bệnh gây ra bởi dioxin hoặc hợp chất tương tự dioxin là bệnh về da, mà là bệnh ban clo.

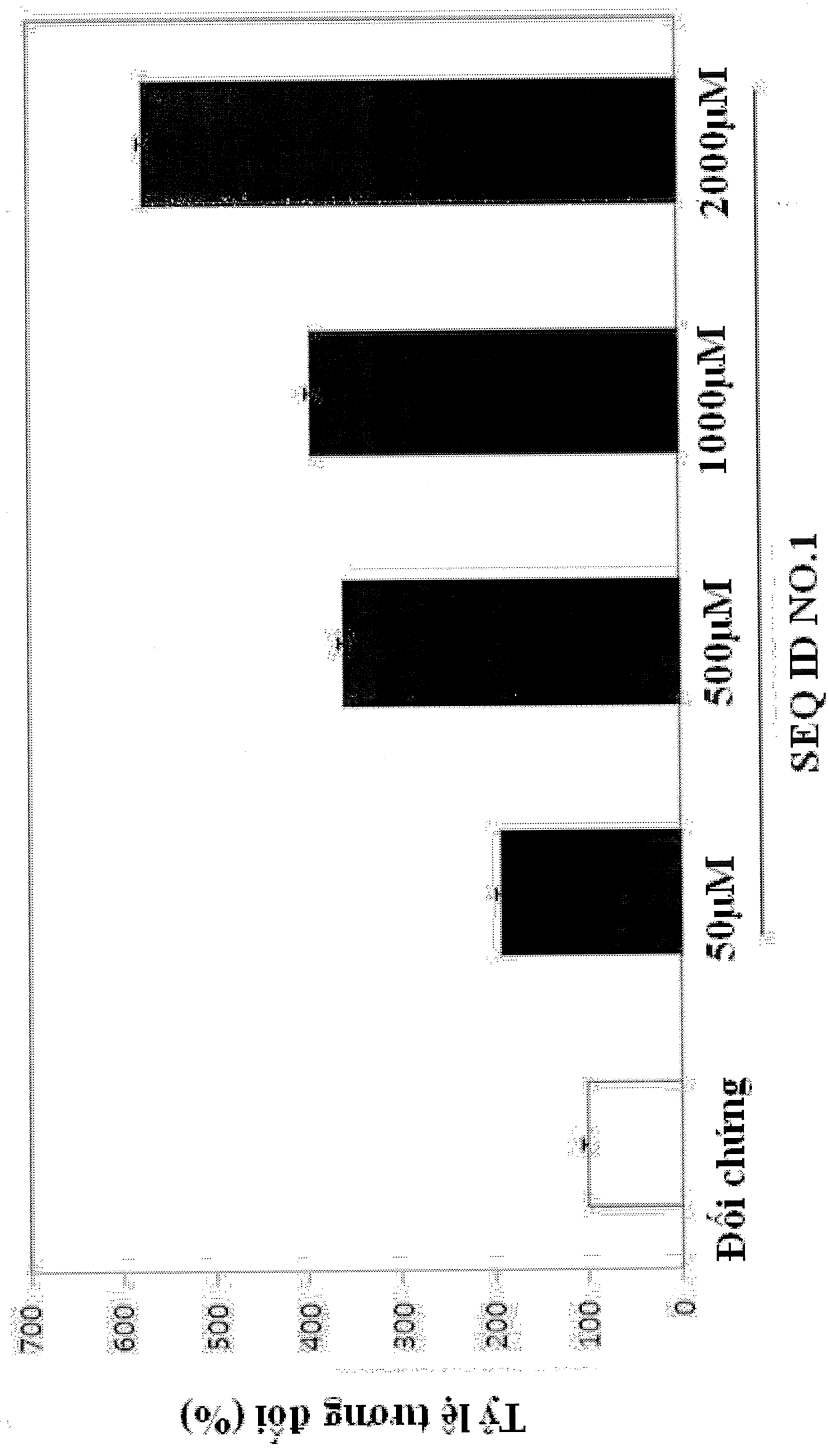
11. Thực phẩm đối kháng dioxin hoặc hợp chất tương tự dioxin, chứa hoạt chất là peptit cấu thành từ trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, tùy ý trong đó đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của peptit này được cải biến.

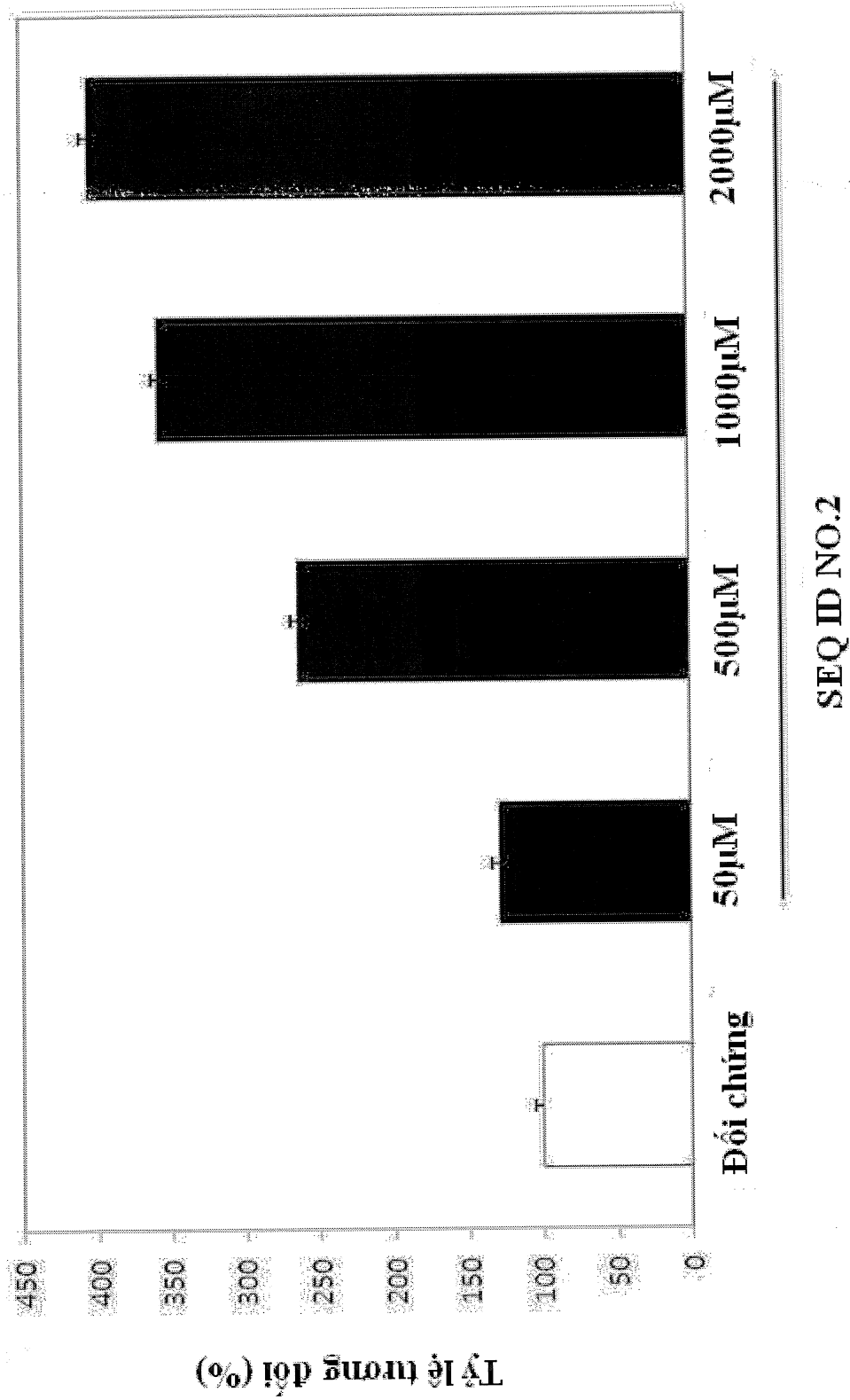
12. Mỹ phẩm cải thiện tình trạng da, chứa hoạt chất là peptit theo điểm 1.

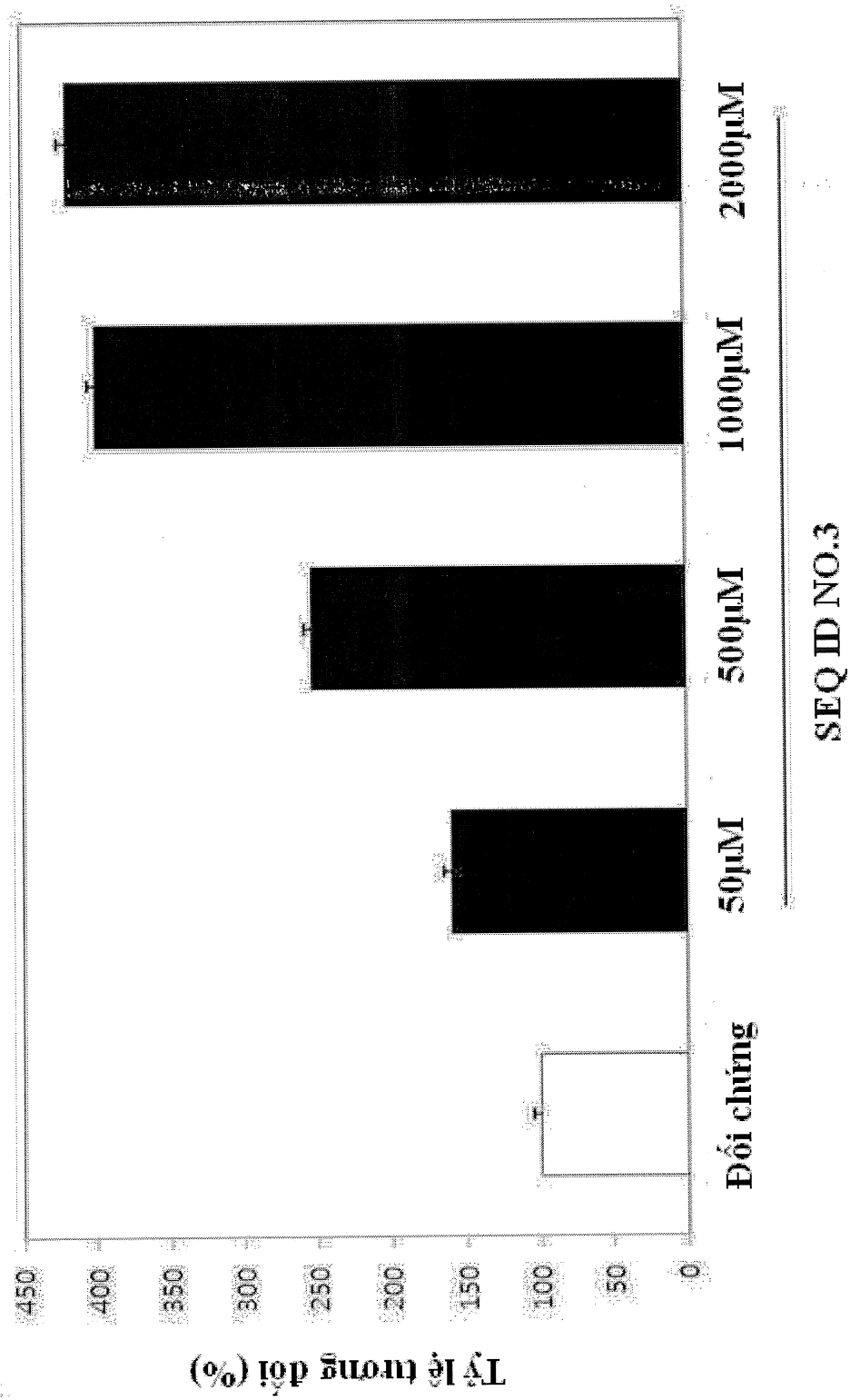
DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CAREGEN CO., LTD.
 <120> PEPTIT CÓ HOẠT TÍNH BẢO VỆ TẾ BÀO CHỐNG LẠI CÁC CHẤT Ô NHIÊM MÔI TRƯỜNG, DƯỢC PHẨM,
 THỰC PHẨM VÀ MỸ PHẨM CHỨA PEPTIT NÀY
 <130> PX058608US
 <150> KR 10-2017-0040514
 <151> 2017-03-30
 <160> 13
 <170> KoPatentIn 3,0
 <210> 1
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 1
 Lys Trp Gly Gly Gly Arg Tyr
 1 5
 <210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 2
 Ile Leu Gly Arg Trp Cys Gly
 1 5
 <210> 3
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 3
 Asp Val Glu Asn Thr Ser
 1 5
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> CYP1A1_F
 <400> 4
 ggatctttct ctgtaccctg g 21
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> CYP1A1_R
 <400> 5
 agcatgtcct tcagcccaga 20
 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> TNF- α _F
 <400> 6
 cgtcagccga ttrtgctatc t 21
 <210> 7
 <211> 20

<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	TNF- α _R	
<400>	7	
cggactccgc	aaagtctaag	20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	IL-6_F	
<400>	8	
aaagaggcac	tgccagaaaa	20
<210>	9	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	IL-6_R	
<400>	9	
atctgaggtg	cccatgctac	20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	IL-1 β _F	
<400>	10	
ttcgacacat	gggataacga	20
<210>	11	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	IL-1 β _R	
<400>	11	
tctttcaaca	cgaggacag	20
<210>	12	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	COX-2_F	
<400>	12	
atcattcacc	aggcaaattg c	21
<210>	13	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	COX-2_R	
<400>	13	
ggcttcagca	taaagcgttt g	21

**Fig.1A**

**Fig.1B**



SEQ ID NO.3

Fig.1C

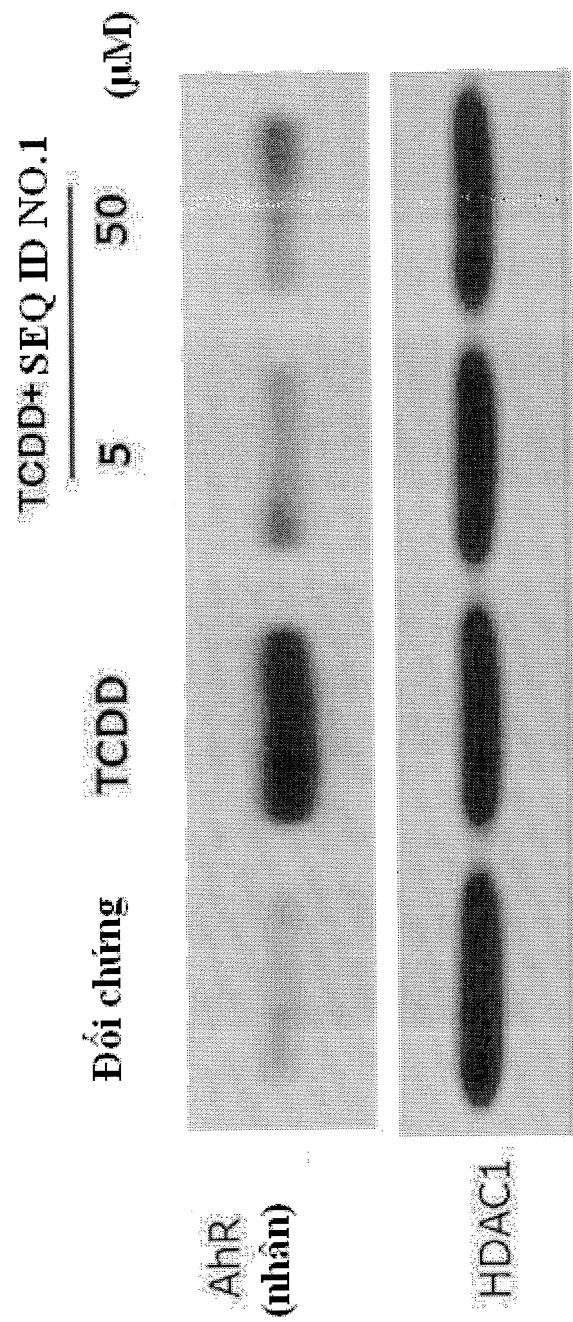
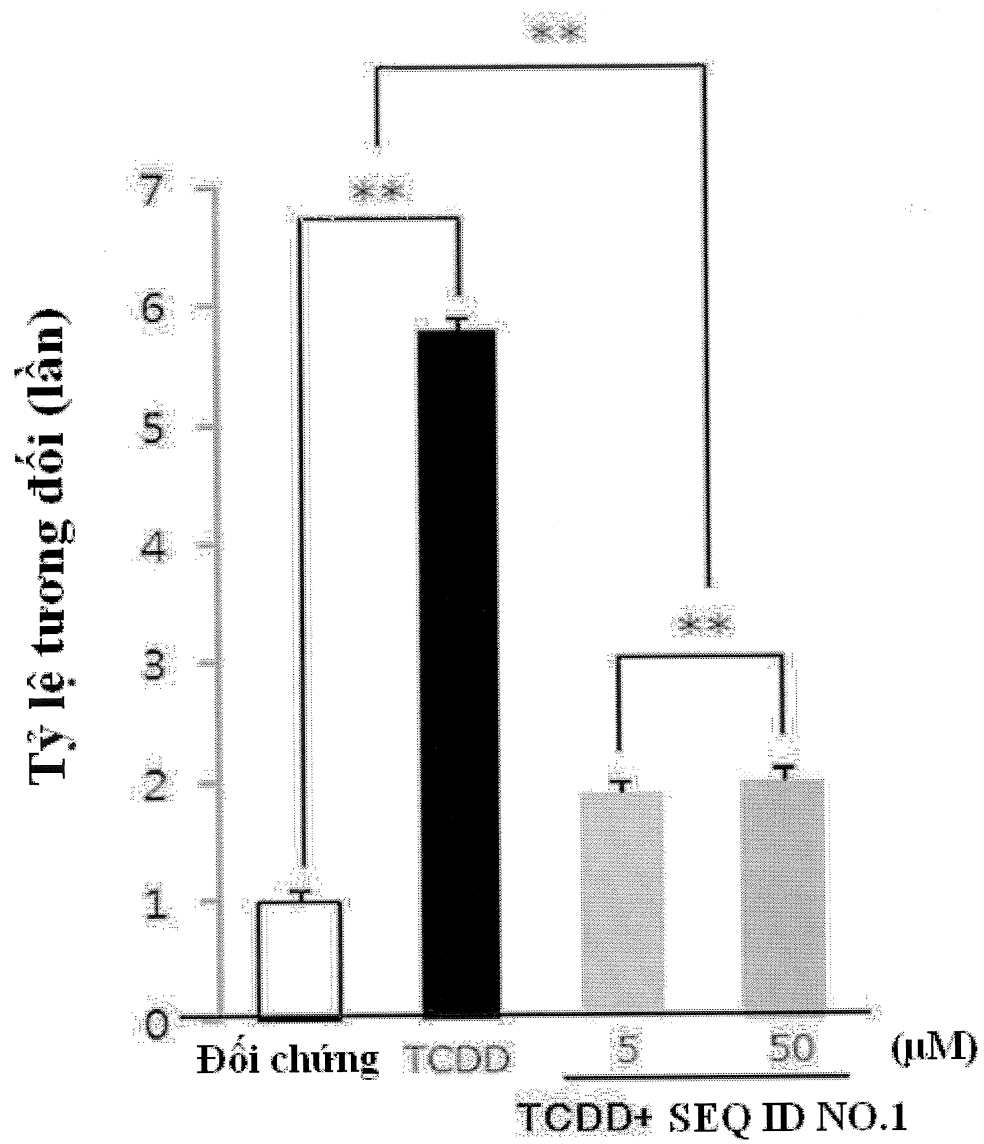


Fig.2A

**Fig.2B**

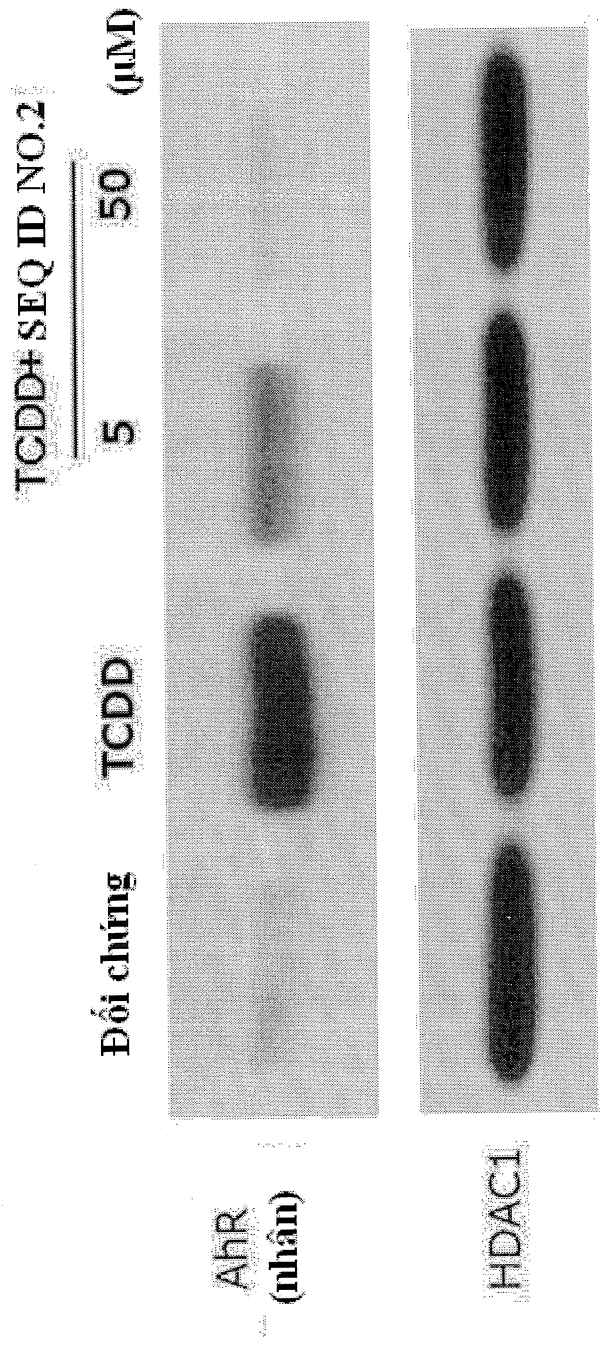
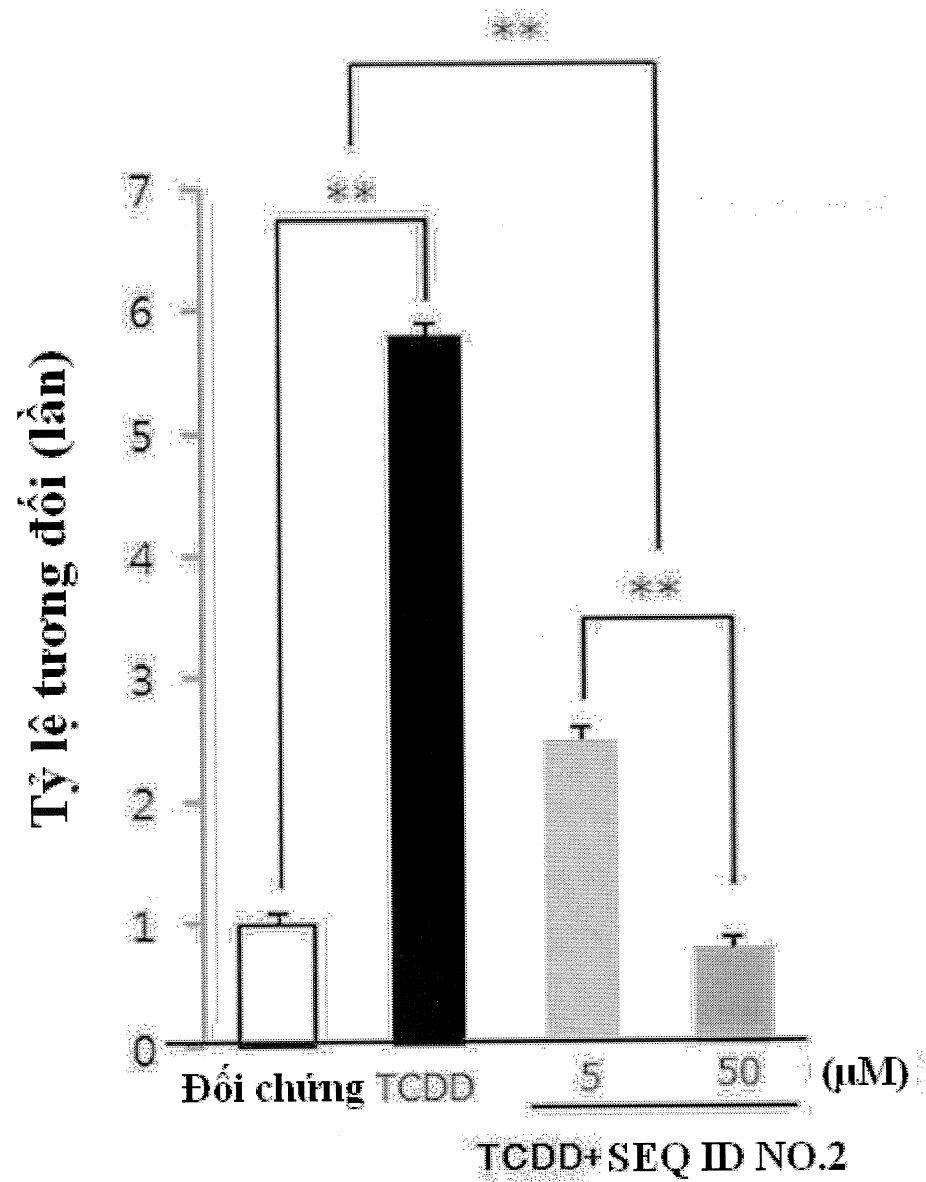


Fig.2C

**Fig.2D**

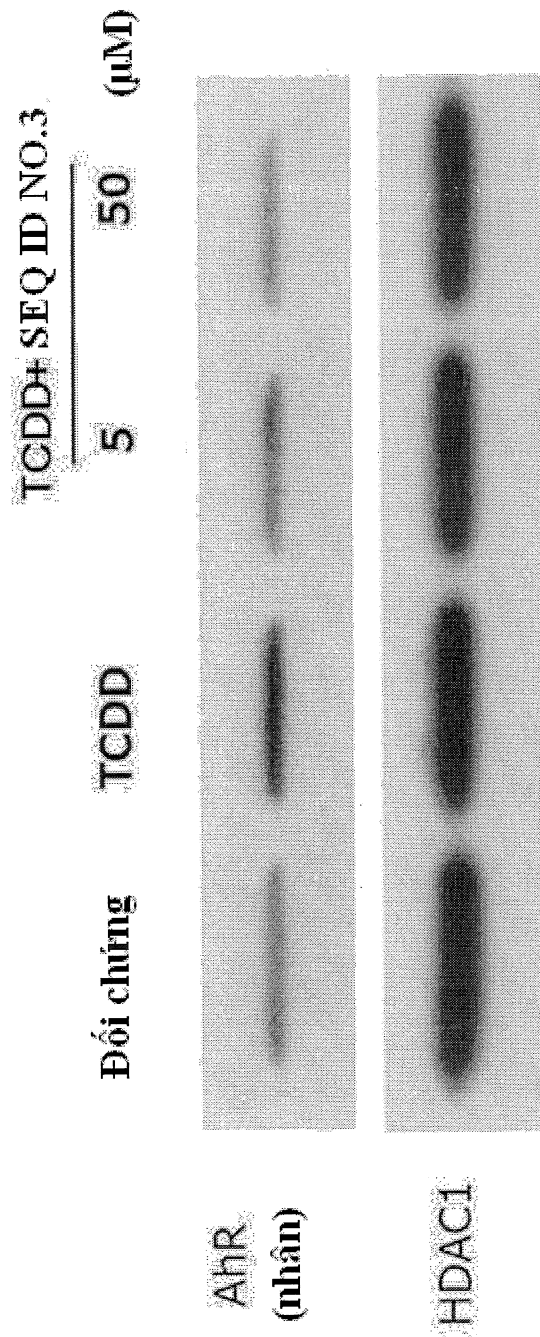
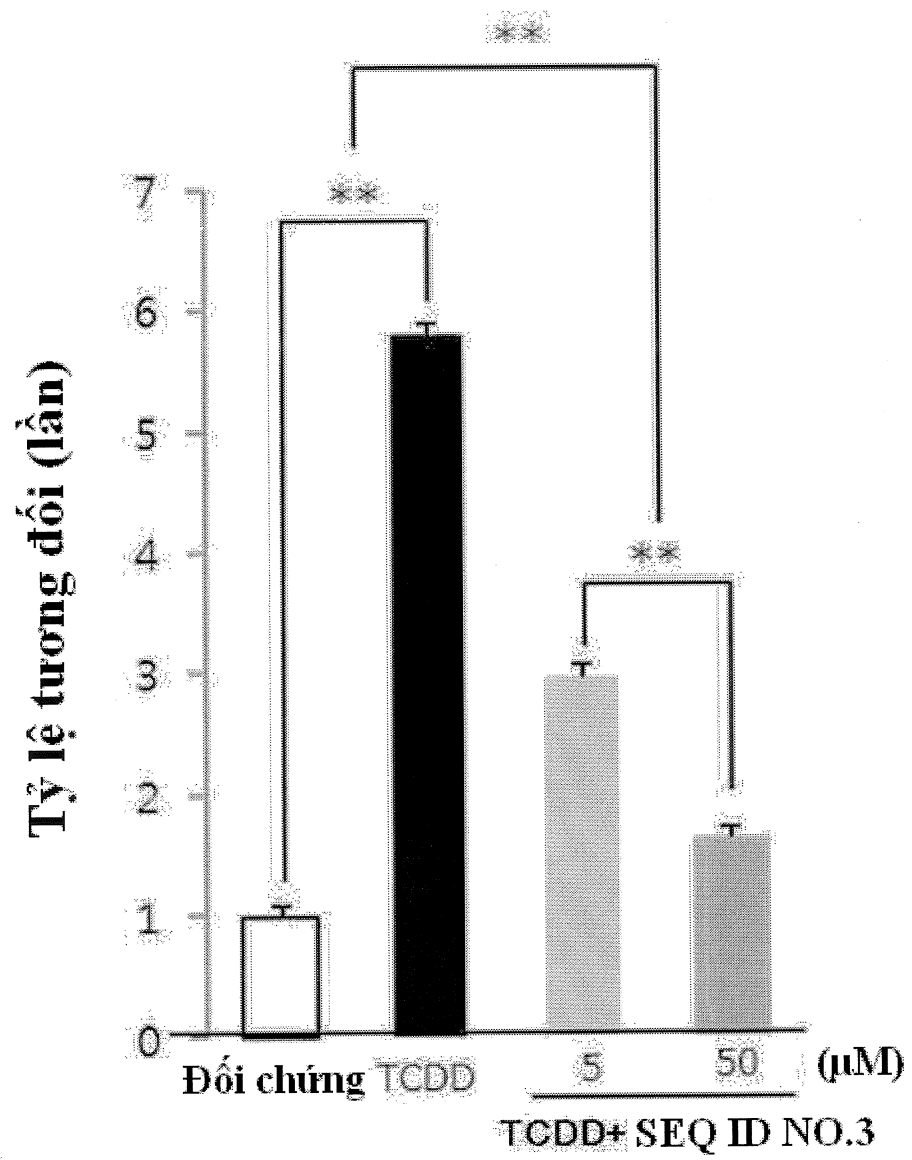
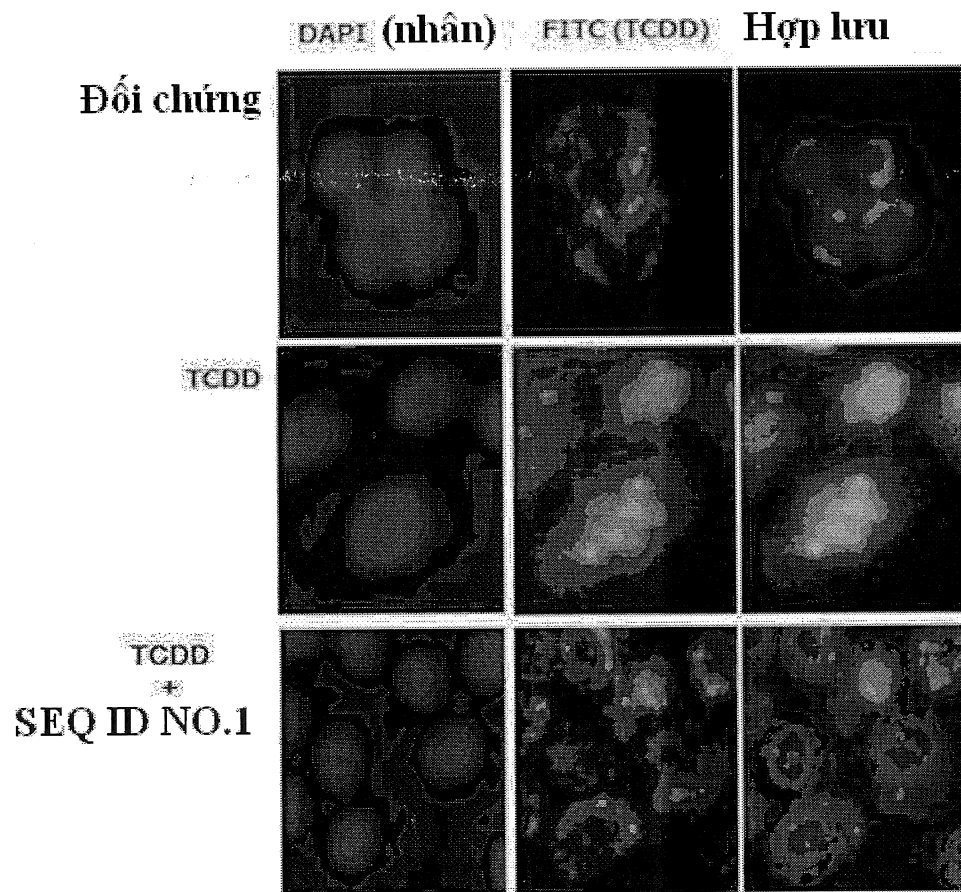
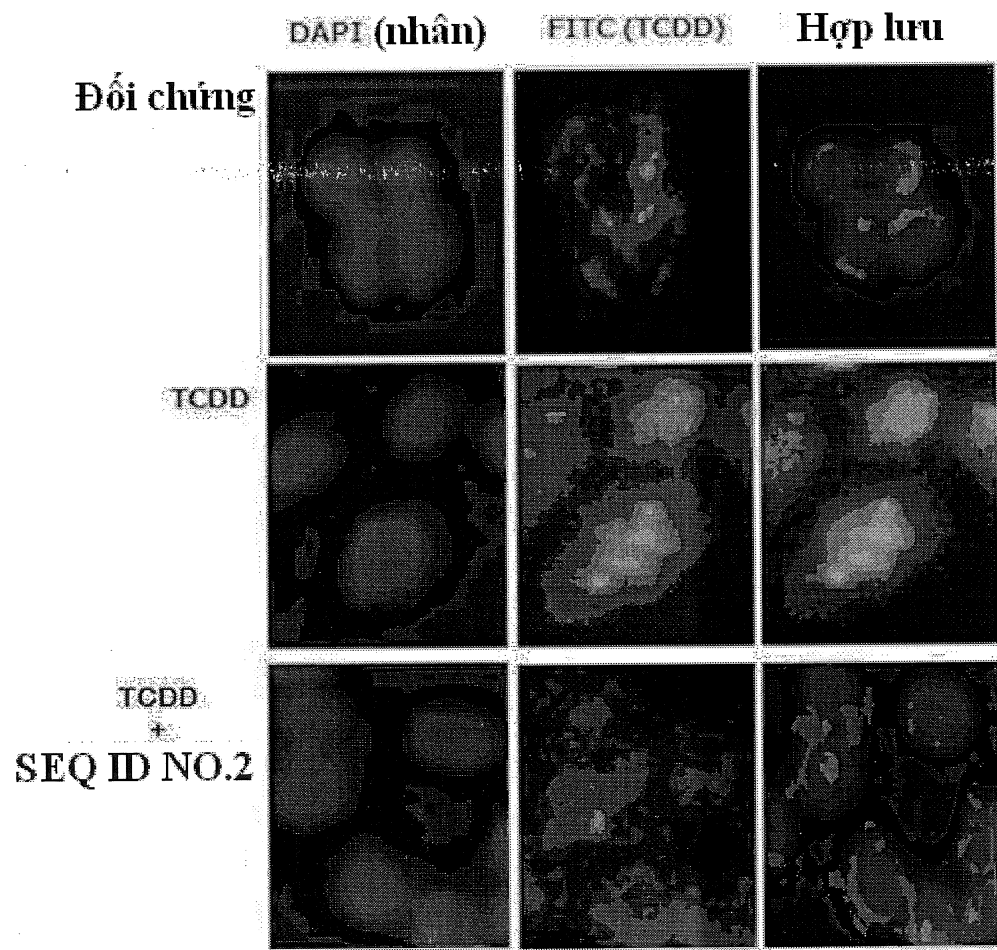
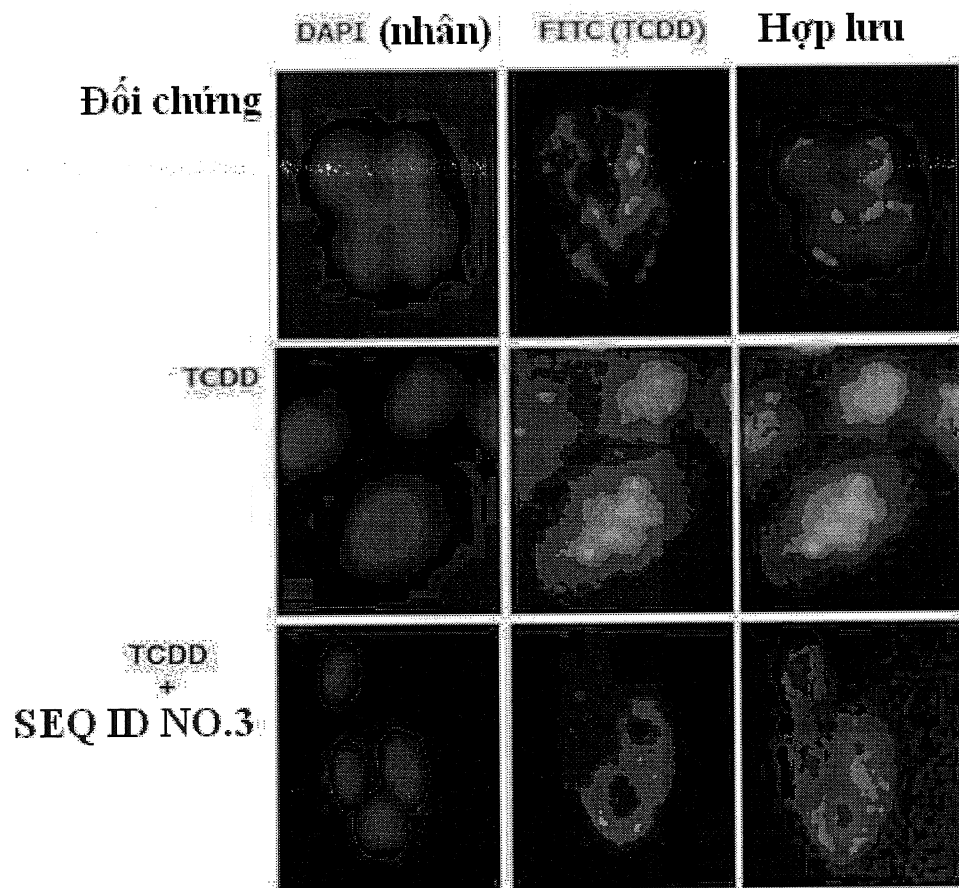


Fig.2E

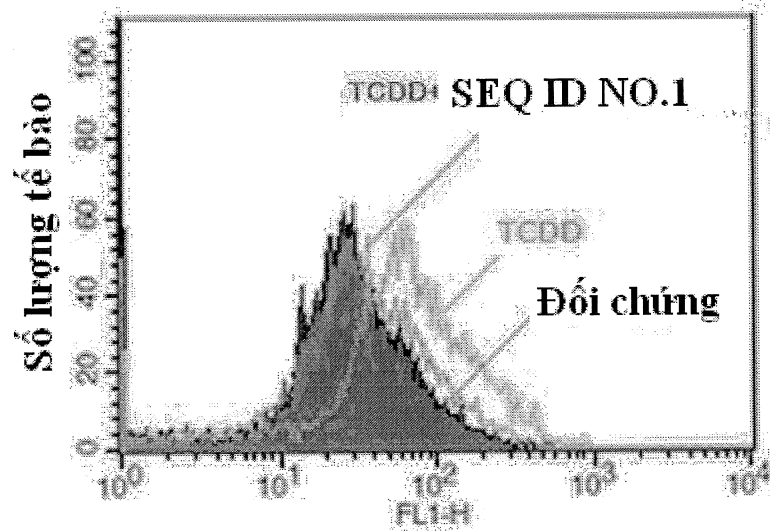
**Fig.2F**

**Fig.3A**

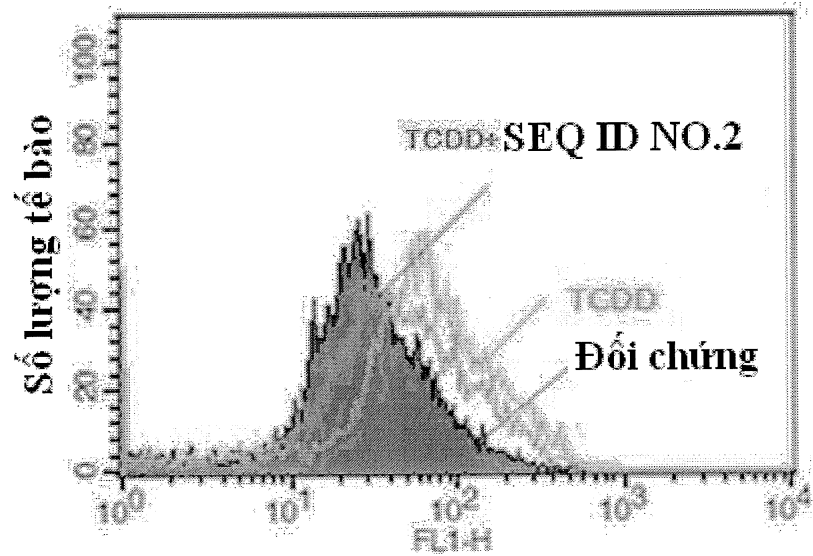
**Fig.3B**

**Fig.3C**

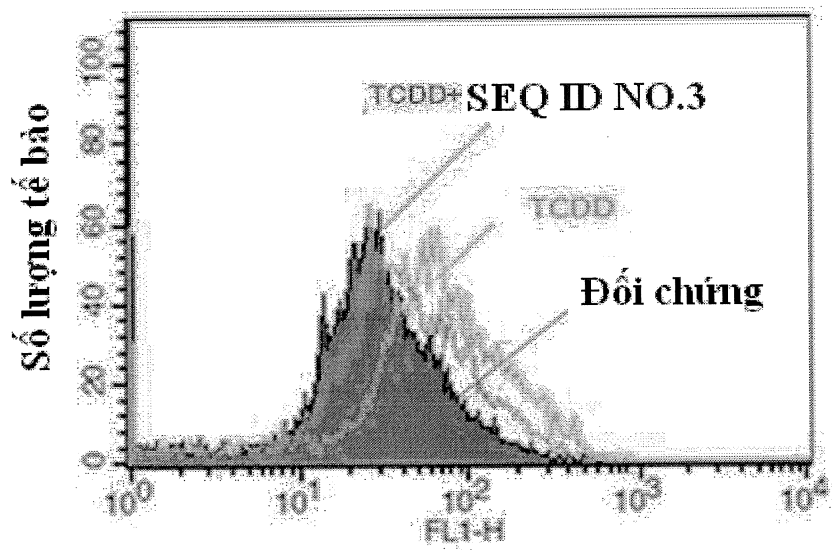
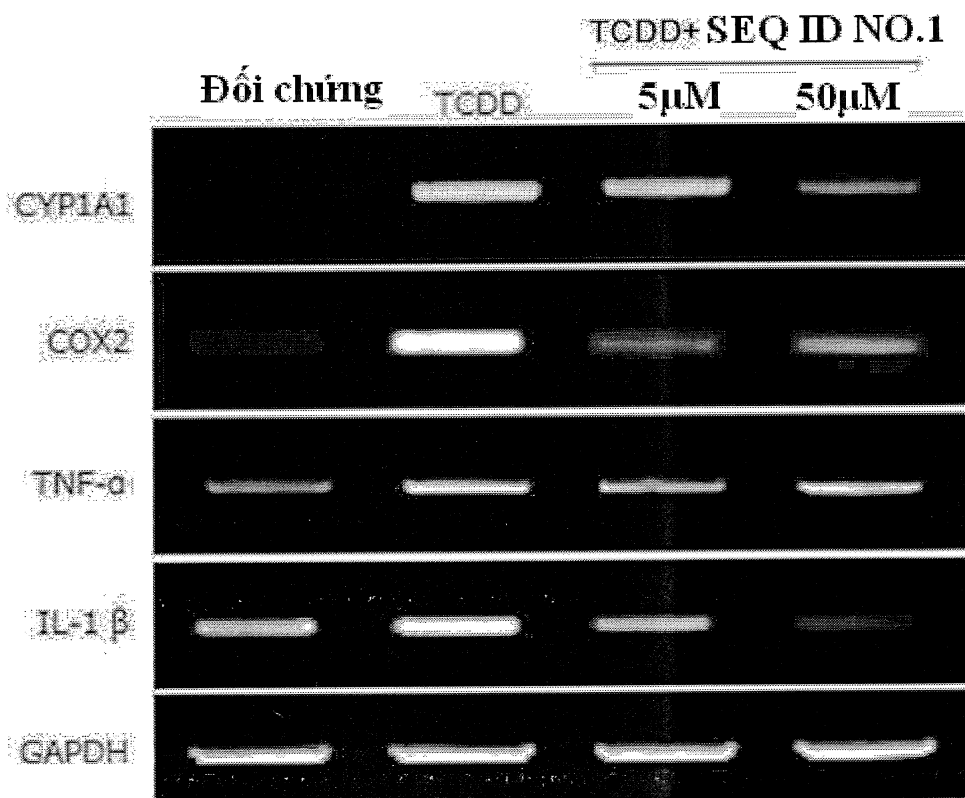
SEQ ID NO.1

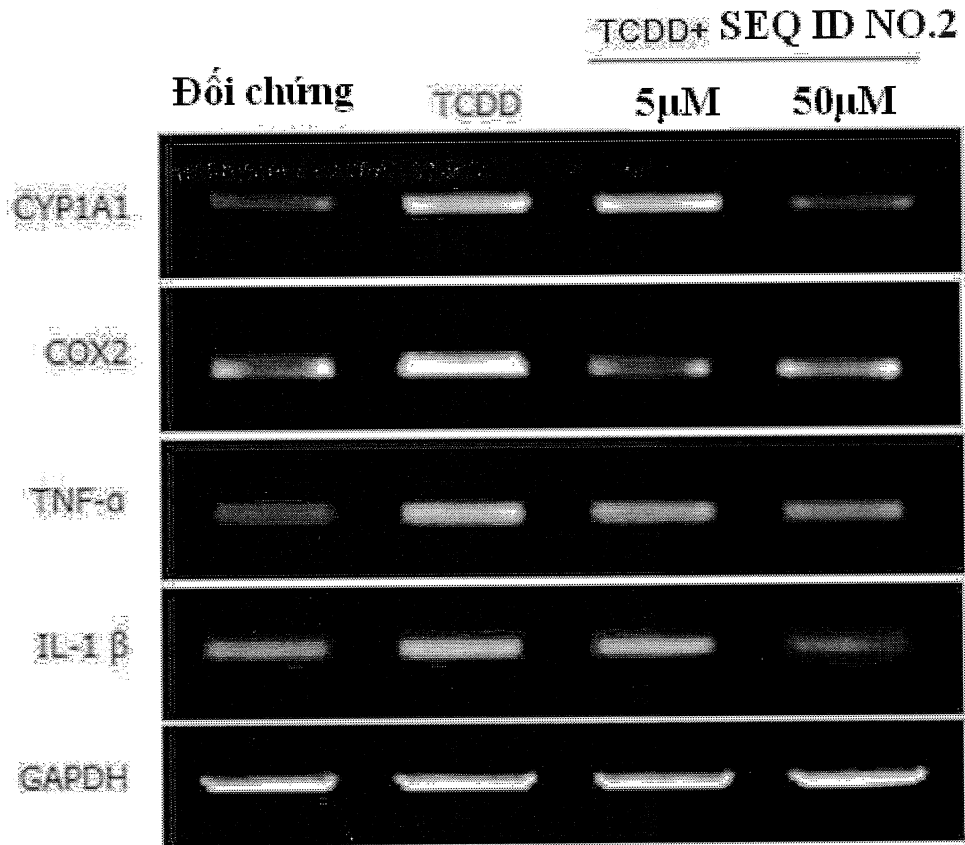
**Fig.4A**

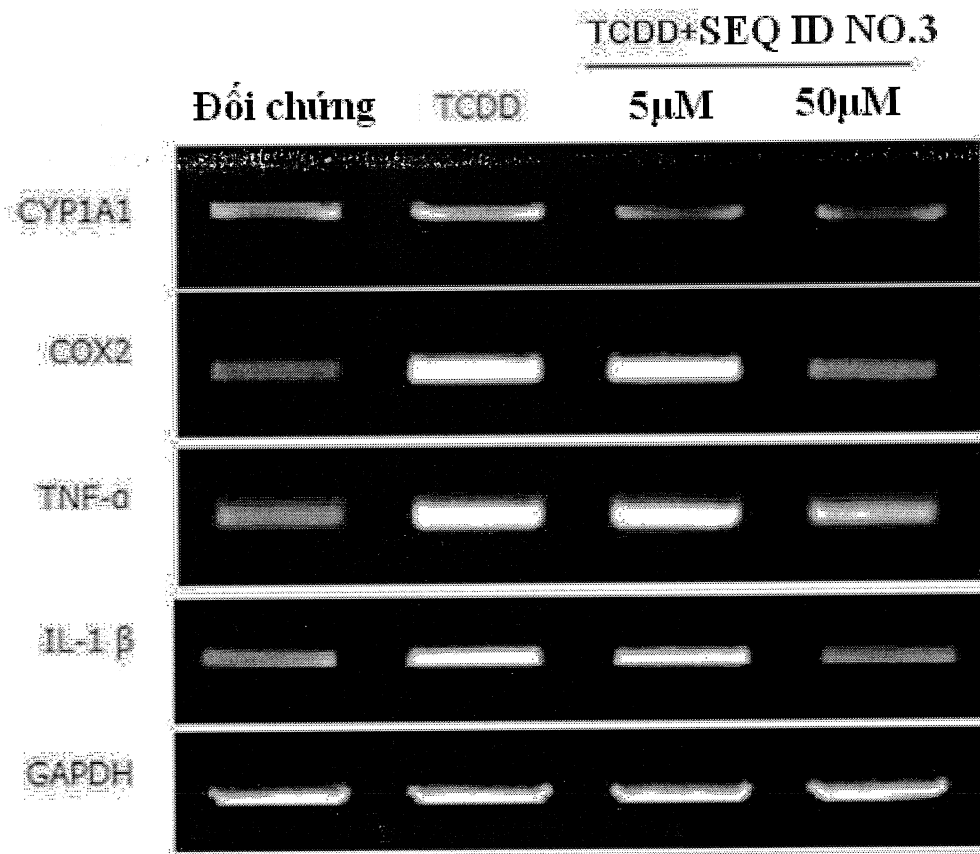
SEQ ID NO.2

**Fig.4B**

SEQ ID NO.3

**Fig.4C****Fig.5A**

**Fig.5B**

**Fig.5C**

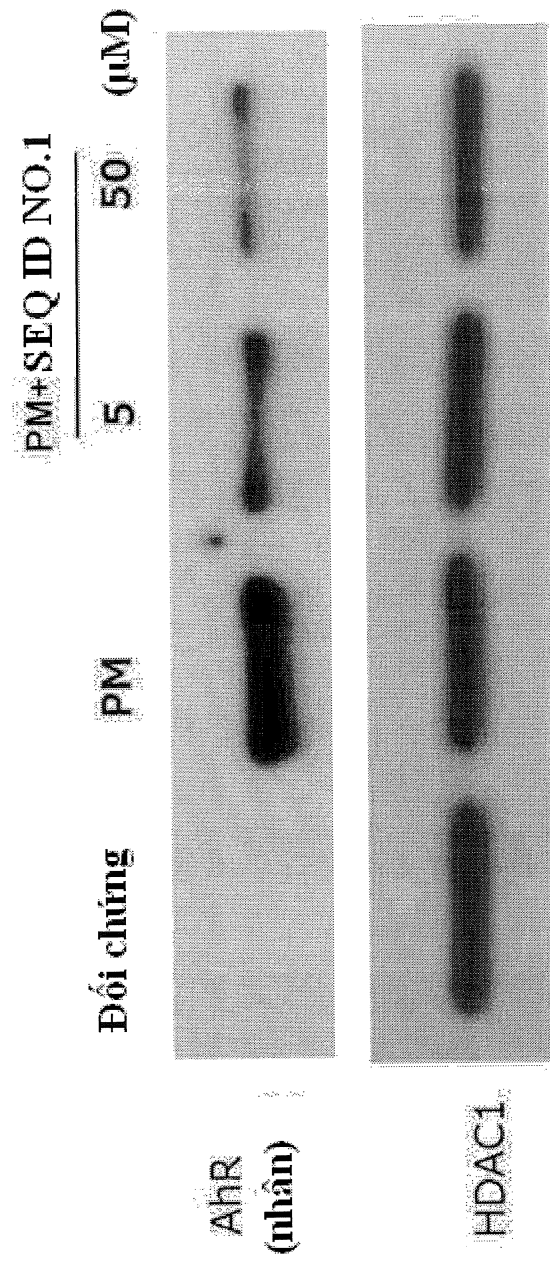
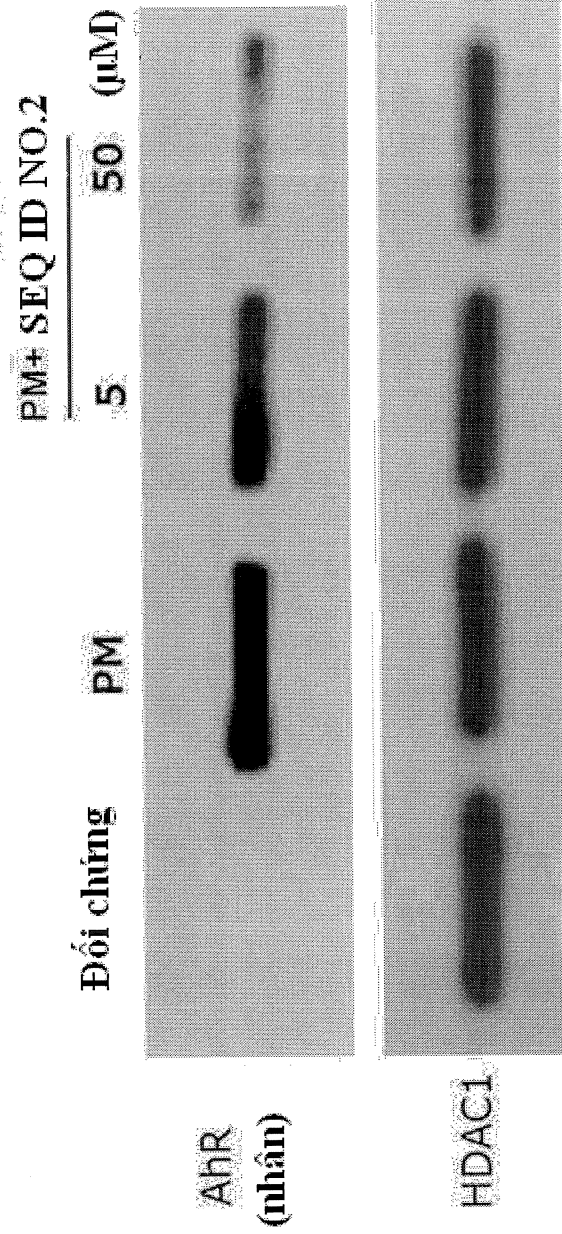
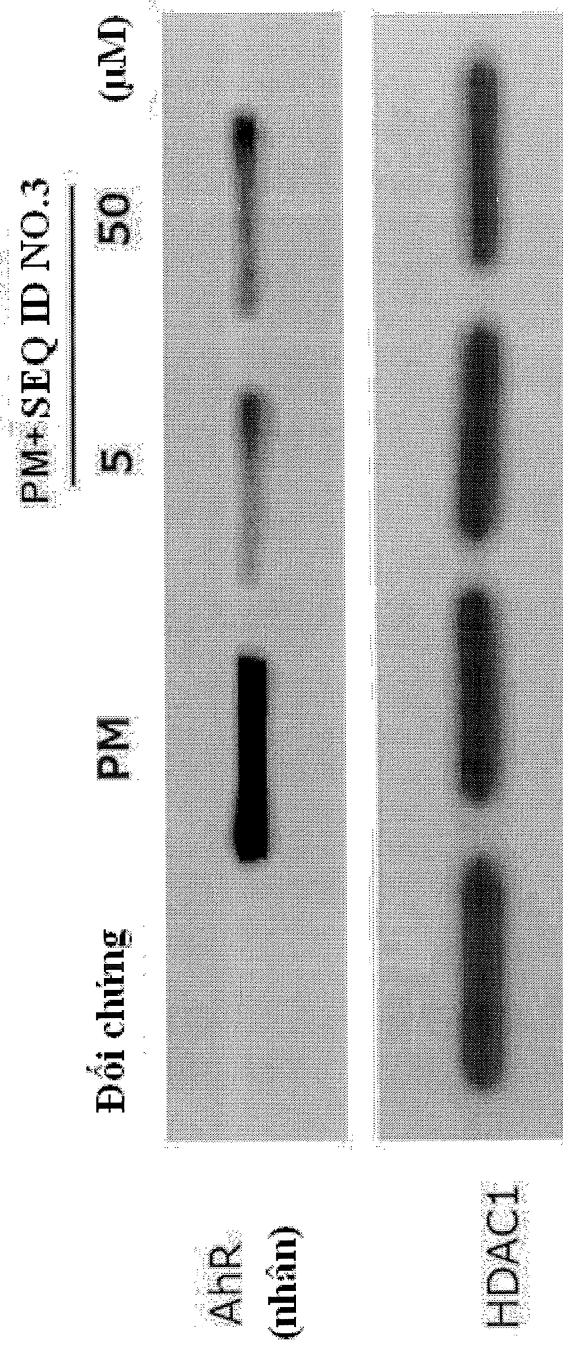
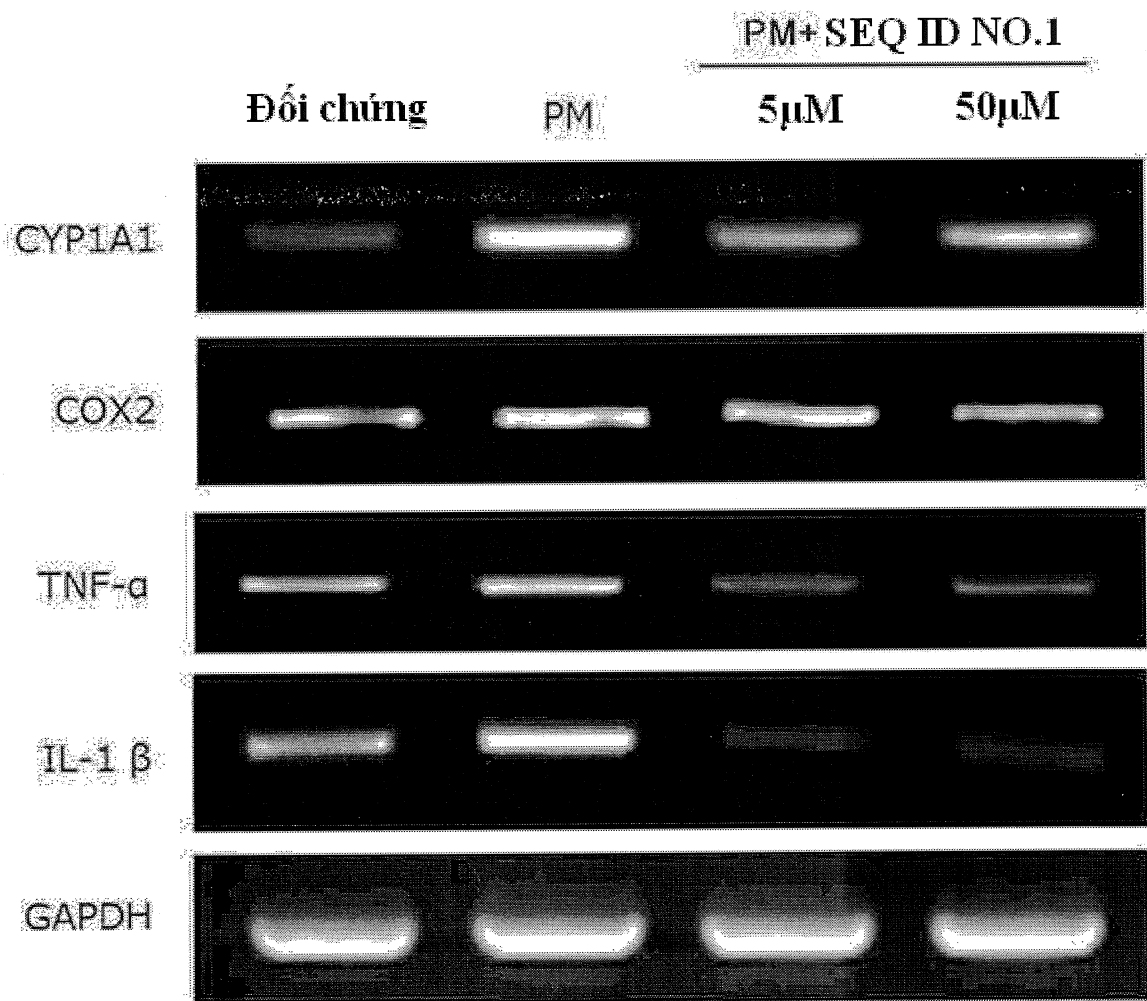
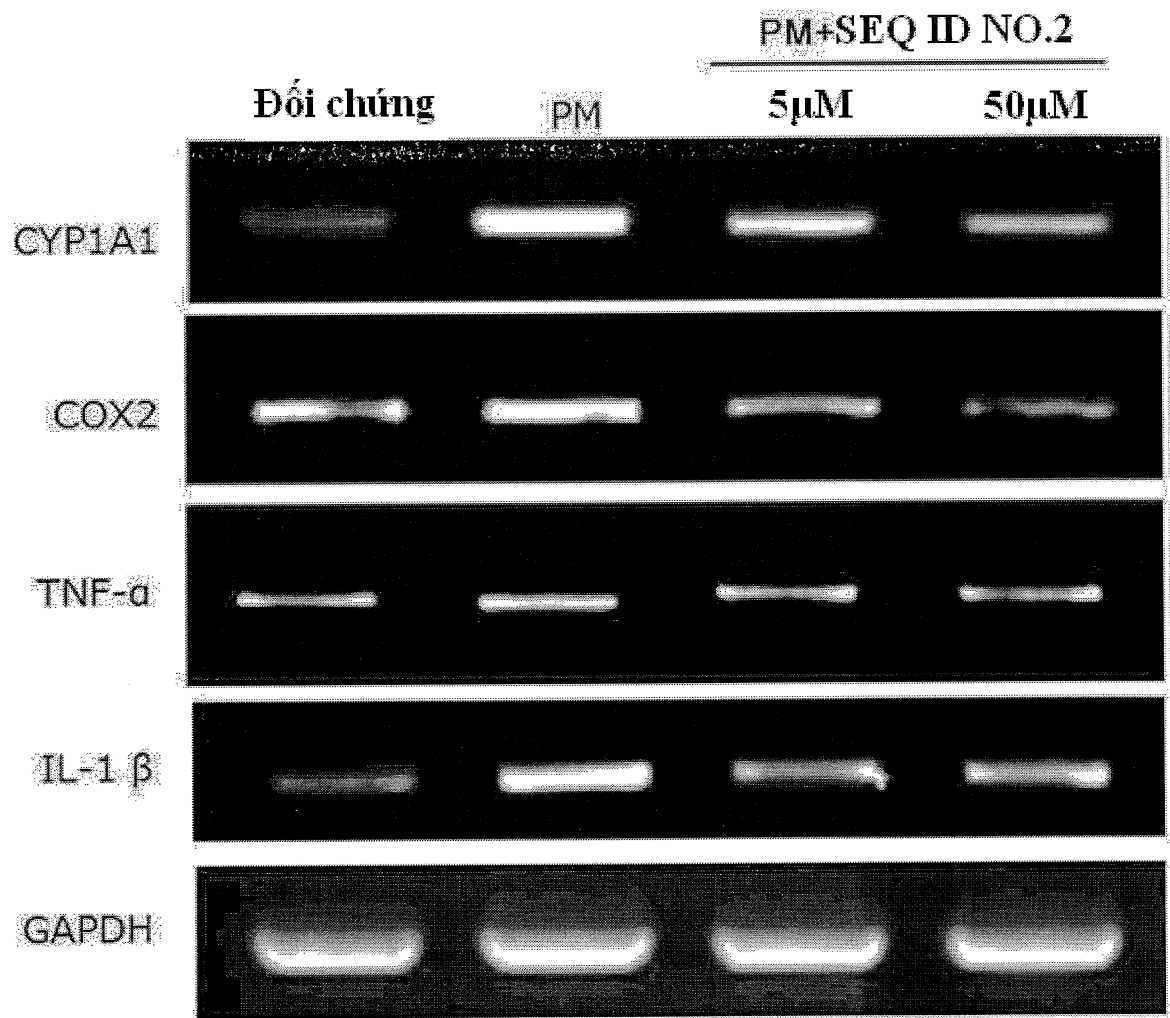


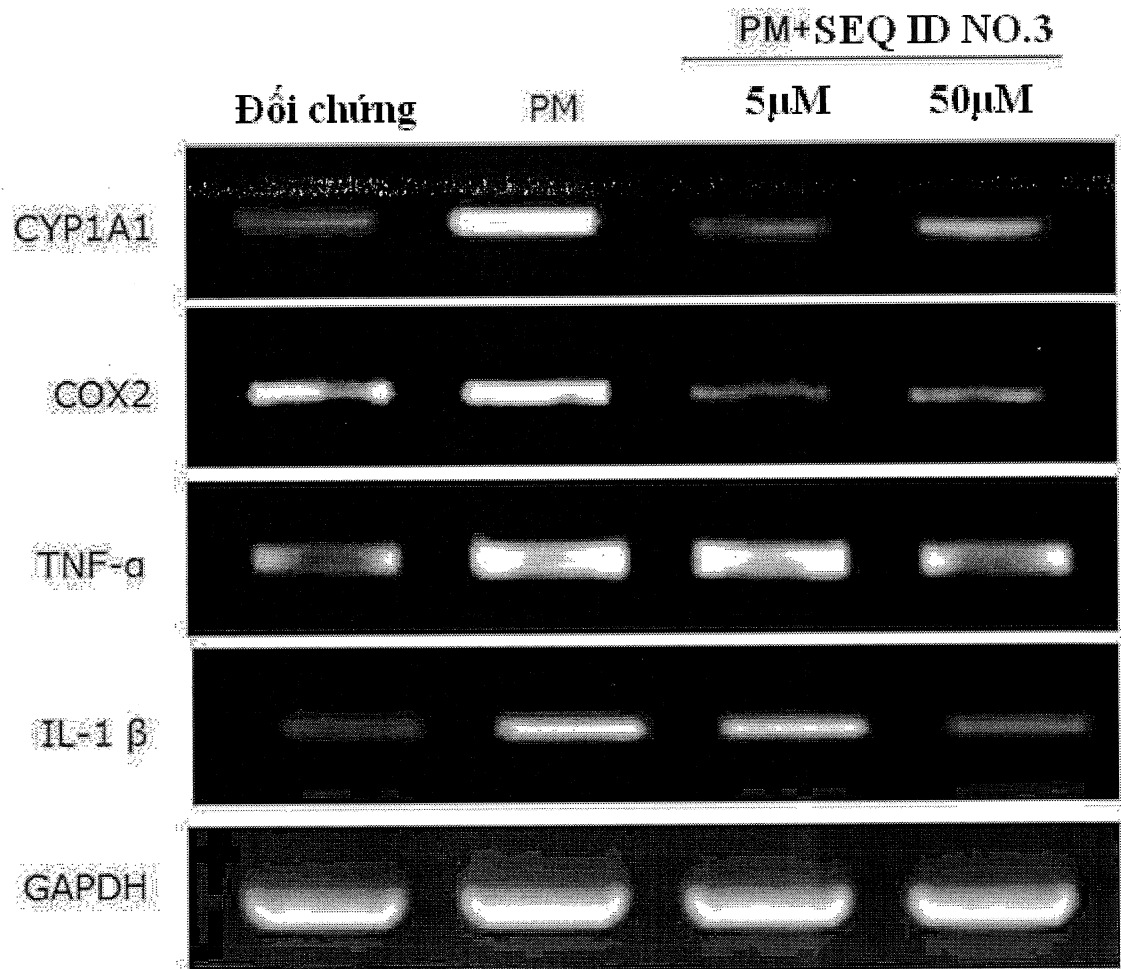
Fig.6A

**Fig.6B**

**Fig.6C**

**Fig.7A**

**Fig.7B**

**Fig.7C**