



(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)



1-0041439

(51)^{2020.01} C07K 7/06; A61K 38/08; A61K 38/22; (13) B
A61K 38/30; A61P 3/04; A61P 3/06;
A61P 3/10; A61K 38/00; A61P 3/00

(21) 1-2021-01038

(22) 12/05/2015

(62) 1-2017-04511

(86) PCT/KR2015/004749 12/05/2015

(87) WO2016/175362 03/11/2016

(30) 10-2015-0059648 28/04/2015 KR

(45) 25/10/2024 439

(43) 25/05/2021 398

(73) CAREGEN CO., LTD. (KR)

46-38, LS-ro 91beon-gil, Dongan-gu, Anyang-si, Gyeonggi-do 431-848, Republic of Korea

(72) CHUNG, Yong Ji (KR); KIM, Eun Mi (KR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PEPTIT CÓ HOẠT TÍNH CHỐNG BÉO PHÌ HOẶC ĐÁI THÁO ĐƯỜNG VÀ
DƯỢC PHẨM CHỨA PEPTIT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến peptit có hoạt tính chống béo phì hoặc đái tháo đường và có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3; và dược phẩm chứa peptit này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến peptit có hoạt tính chống béo phì hoặc đái tháo đường.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ở Hàn Quốc, chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo ngày càng được sử dụng nhiều cùng với sự tăng trưởng kinh tế và lối sống hiện đại, và tỷ lệ mắc các bệnh chuyển hóa, như bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường, hội chứng tăng lipid, bệnh tăng huyết áp, chứng xơ cứng động mạch, và bệnh gan nhiễm mỡ cũng gia tăng do hạn chế vận động. Ngoài ra, bệnh béo phì là vấn đề liên quan đến thẩm mỹ do mọi người thường mong muốn có dáng hình thon gọn hơn cũng như liên quan đến các rối loạn khác nhau.

Các dược chất điều trị bệnh béo phì được phân loại thành các dược chất tác dụng trên hệ thần kinh trung ương để tác động đến chứng thèm ăn và các dược chất tác dụng trên đường tiêu hóa để ức chế hấp thu. Các dược chất tác dụng trên hệ thần kinh trung ương đã được bán trên thị trường dưới dạng các dược chất chống béo phì tác dụng trên serotonin (5-HT) ở hệ thần kinh, như fenfluramin, dexfenfluramin và các chất tương tự, trên hệ thần kinh noradrenalin, như ephedrin và cafein, và trên cả serotonin và hệ thần kinh noradrenalin, như sibutramin thế hệ mới, được phân loại theo cơ chế tác dụng. Ví dụ về các dược chất chống béo phì tác dụng trên đường tiêu hóa là orlistat, đã được chấp thuận để điều trị bệnh béo phì, dược chất này ức chế lipaza ở ruột để giảm hấp thu chất béo. Các dược chất hiện nay có một số nhược điểm. Ví dụ, fenfluramin và các chất tương tự đã bị thu hồi do các tác dụng phụ bao gồm gây ra bệnh tăng huyết áp phổi nguyên phát hoặc bệnh van tim, và các dược chất còn lại không thể sử dụng được cho người bệnh bị suy tim hoặc suy thận do do xuất hiện hội chứng hạ huyết áp hoặc nhiễm toan axit lactic.

Bệnh đái tháo đường là nhóm bao gồm các rối loạn chuyển hóa xuất hiện khi insulin không được bài tiết đầy đủ hoặc không thể thực hiện được chức năng bình thường (DeFronzo, 1988) và được đặc trưng bởi hội chứng tăng đường máu, tức là nồng độ đường máu cao trong khoảng thời gian kéo dài, gây ra nhiều triệu chứng và hội chứng, với sự xuất hiện của glucoza trong nước tiểu. Trong những năm gần đây, tỷ lệ mắc bệnh béo phì, đặc biệt là bệnh béo bụng đã gia tăng, dẫn đến làm tăng rất nhanh tỷ lệ mắc bệnh

đái tháo đường.

Tính đến năm 2000, số lượng người bệnh đái tháo đường ước tính là 170 triệu người trên toàn thế giới và dự kiến tăng lên 370 triệu người vào năm 2030. Tuy nhiên, báo cáo phân tích vào năm 2008 cho thấy số lượng người bệnh đái tháo đường có thể đã đạt tới 350 triệu người trên toàn thế giới (Danaei et al., 2011), với kết quả ghi nhận cao hơn đáng kể so với dự kiến. Kết quả phân tích của Harris et al., 1987 cho thấy hơn 80% người bệnh đái tháo đường type 1 bị béo phì trong khi đó chỉ dưới 10% người bệnh đái tháo đường không bị béo phì. Mối tương quan giữa bệnh đái tháo đường và bệnh béo phì thực tế là do các adipokin và axit béo tự do được bài tiết bất thường dẫn đến gây tích tụ axit béo ở các mô nhạy cảm với insulin, như tế bào beta, thận, gan, tim, v.v., dẫn đến ngộ độc lipid. Khi không được điều trị thích hợp, hội chứng tăng đường máu mạn tính có thể gây ra nhiều triệu chứng bệnh lý bao gồm bệnh võng mạc, rối loạn chức năng thận, bệnh thần kinh, và rối loạn mạch máu. Các biến chứng này rất cần được phòng ngừa bằng cách kiểm soát hiệu quả nồng độ đường máu.

Ngày nay, nồng độ đường máu được kiểm soát bằng cách cải thiện lối sống (liệu pháp dinh dưỡng, liệu pháp tập thể dục), và dược phẩm. Tuy nhiên, liệu pháp dinh dưỡng hoặc liệu pháp tập thể dục rất khó quản lý và thực hiện, với các tác dụng hạn chế. Do đó, hầu hết người bệnh đái tháo đường chủ yếu kiểm soát nồng độ đường máu bằng dược chất, như insulin, chất kích thích bài tiết insulin, chất làm tăng độ nhạy cảm insulin, và chất hạ đường máu, cũng như cải thiện lối sống.

Insulin được sản xuất bằng phương pháp tái tổ hợp được sử dụng làm dược chất để điều trị bắt buộc cho người bệnh đái tháo đường type 1 và người bệnh đái tháo đường type 2 không kiểm soát được nồng độ đường trong máu, và có ưu điểm trong kiểm soát đường máu. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp điều trị bằng insulin là gây ra nỗi sợ kim tiêm, khó thực hiện, nguy cơ hạ đường máu, và tăng cân.

Meglitinid, là nhóm chất kích thích bài tiết insulin tác dụng trong thời gian ngắn được sử dụng trước khi ăn. Ví dụ về các chất này bao gồm novonorm (repaglinid), fastic (nateglinid), và glufast (mitiglinid). Chất làm tăng độ nhạy cảm insulin có tác dụng đặc trưng là không làm tăng đường máu khi được sử dụng riêng, và ví dụ về các chất này bao gồm dược chất biguanid, như metformin, và dược chất thiazolidindion, như avanida (rosiglitazon) và actos (pioglitazon).

Gần đây, các chất chủ vận thụ thể petit tương tự glucagon-1 đã được phát triển dựa trên tác dụng của petit tương tự glucagon-1, là hormon kích thích bài tiết insulin, và bao gồm exenatit và victoza (liraglutit). Ngoài ra, các chất ức chế dipeptidyl peptidaza-4, là enzym gây bất hoạt nhanh petit tương tự glucagon -1, là được chất thế hệ mới và ví dụ về các được chất này bao gồm januvia (sitagliptin). Tuy nhiên, các được chất này được ghi nhận là có tác dụng không mong muốn, như gây độc gan, rối loạn đường tiêu hóa, rối loạn tim mạch, và gây ung thư. Một nhược điểm khác của các được chất này là chi phí điều trị hàng năm cao, là rào cản để điều trị bệnh đái tháo đường. Thực vậy, chi phí chăm sóc sức khỏe đối với bệnh tiền đái tháo đường và bệnh đái tháo đường là khoảng 200 nghìn tỉ won ở Hoa Kỳ tính đến năm 2007 (Dall et al., 2010), và chi phí chăm sóc sức khỏe đối với bệnh béo phì cũng khoảng 150 nghìn tỉ won chỉ tính riêng ở Hoa Kỳ tính đến năm 2008 (Finkelstein et al., 2009). Do đó, có nhu cầu cấp thiết để phát triển được chất có thể làm giảm hữu hiệu nồng độ glucoza máu và có thể được sử dụng để điều trị cả bệnh đái tháo đường lẫn bệnh đái tháo đường do béo phì, với ít tác dụng phụ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, các tác giả sáng chế đã tập trung nghiên cứu các cơ chế điều hòa chuyển hóa năng lượng để cải thiện phương pháp điều trị bệnh béo phì, và đã thực hiện nghiên cứu các tín hiệu gây tích tụ lipid và protein ảnh hưởng đến tích tụ lipid khi hấp thu chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo ở người, với mục tiêu là phát triển được chất có độ an toàn cao hơn (độc tính thấp hơn). Dựa trên kết quả nghiên cứu về các tín hiệu ức chế biểu hiện protein gây tích tụ chất béo và phân giải chất béo tích tụ và protein tham gia vào quá trình truyền tín hiệu, các tác giả sáng chế đã phát triển thành công peptit tăng cường phân giải lipid. Ngoài ra, peptit theo sáng chế có tác dụng điều trị rất cao đối với bệnh đái tháo đường và bệnh đái tháo đường do béo phì. Sự tích tụ chất béo gây ra bởi chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo, ức chế truyền tín hiệu insulin do tích tụ chất béo ở gan hoặc cơ, và rối loạn dung nạp insulin thu được là nguyên nhân gây bệnh đái tháo đường. Peptit và hỗn hợp peptit theo sáng chế hữu hiệu để điều trị bệnh đái tháo đường và bệnh đái tháo đường do béo phì.

Các bài báo và tài liệu sáng chế được trích dẫn trong bản mô tả này. Nội dung của các bài báo và tài liệu sáng chế được trích dẫn được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn, do đó lĩnh vực kỹ thuật và nội dung của sáng chế được giải thích rõ ràng hơn.

Các tác giả sáng chế đã phát triển peptit có hoạt tính sinh học, và phát hiện thấy rằng peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.7 không chỉ có tác dụng chống béo phì bằng cách ức chế tích tụ chất béo do chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo và phân giải chất béo tích tụ, mà cũng có tác dụng điều trị bệnh đái tháo đường và bệnh đái tháo đường do béo phì, và biến chứng của bệnh đái tháo đường.

Cụ thể, sáng chế đề xuất các phương án sau:

1. Peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3.
2. Peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 và có hoạt tính chống béo phì hoặc đái tháo đường.
3. Peptit theo phương án 2, trong đó peptit này có hoạt tính ức chế tạo mỡ.
4. Peptit theo phương án 2, trong đó peptit này có hoạt tính làm giảm biểu hiện thụ thể hoạt hóa bởi phối tử kích thích tăng sinh vi thể peroxy γ , axetyl-CoA carboxylaza, hoặc protein gắn kết axit béo đặc hiệu mô mỡ 2.
5. Peptit theo phương án 2, trong đó peptit này có hoạt tính tăng cường phân giải lipit.
6. Peptit theo phương án 2, trong đó peptit này có hoạt tính làm tăng biểu hiện lipaza nhạy cảm với phospho-hormon, protein kinaza hoạt hóa bởi adenosin monophosphat $\alpha 1$, gen kích thích chuyển hóa lipit 58, hoặc triglycerit mô mỡ lipaza.
7. Peptit theo phương án 2, trong đó peptit này có hoạt tính làm giảm nồng độ đường máu.
8. Dược phẩm chứa hoạt chất là peptit theo phương án 2 để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh béo phì.
9. Dược phẩm chứa hoạt chất là peptit theo phương án 2 để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường typ II.

Các tác giả sáng chế đã phát triển peptit có hoạt tính sinh học, và phát hiện thấy rằng peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 ức chế tích tụ chất béo do chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo và phân giải chất béo tích tụ, do đó có tác dụng chống béo phì, bệnh đái tháo đường và bệnh đái tháo đường do béo phì, hoặc biến chứng của bệnh đái tháo đường.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình ảnh thể hiện lipid tích tụ sau khi điều trị bằng peptit theo sáng chế, như được phân tích bằng phương pháp nhuộm dầu red O: (A) peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, (B) peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và (C) peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5.

Fig.2 là hình ảnh thể hiện lipid tích tụ sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế, như được phân tích bằng phương pháp nhuộm dầu red O.

Fig.3 là hình ảnh thể hiện kết quả đánh giá mức độ biểu hiện của gen aP2, tham gia vào quá trình tạo mỡ, sau khi điều trị bằng peptit theo sáng chế: (A) peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, (B) peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và (C) peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5.

Fig.4 là hình ảnh thể hiện kết quả đánh giá mức độ biểu hiện của gen PPAR γ , gen ACC, và gen aP2, đóng vai trò quan trọng trong quá trình tạo mỡ, sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế ở các nồng độ khác nhau.

Fig.5 là hình ảnh thể hiện kết quả đánh giá mức độ biểu hiện của PPAR γ và phospho-HSL, đóng vai trò quan trọng trong quá trình tạo mỡ, sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế ở các nồng độ khác nhau.

Fig.6 là hình ảnh thể hiện kết quả đánh giá mức độ biểu hiện của gen AMPK- α 1 và gen CGI58, tham gia vào quá trình phân giải chất béo tích tụ, sau khi điều trị bằng peptit và hỗn hợp peptit theo sáng chế: (A) peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, (B) peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, (C) peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5, và (D) phức hợp bao gồm các peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, và SEQ ID NO.7.

Fig.7 là hình ảnh thể hiện kết quả đánh giá mức độ biểu hiện của protein ATGL tham gia vào quá trình phân giải chất béo tích tụ, sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế ở các nồng độ khác nhau.

Fig.8 là hình ảnh thể hiện kết quả đánh giá mức độ biểu hiện của protein phospho-HSL tham gia vào quá trình phân giải chất béo tích tụ, sau khi điều trị bằng peptit theo sáng chế: (A) peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, (B) peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, (C) peptit có trình tự axit amin như nêu trong

SEQ ID NO.5, và (D) phức hợp bao gồm các peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, và SEQ ID NO.7, như được đo bằng phương pháp miễn dịch thấm.

Fig.9 là biểu đồ thể hiện kết quả đo nồng độ glyxerol sản sinh sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế ở các nồng độ khác nhau.

Fig.10A là hình ảnh thể hiện các mô mỡ được phân giải trên mô hình chuột nhất béo phì thử nghiệm sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế. Fig.10B là hình ảnh thể hiện kích cỡ và số lượng mô mỡ được phân giải trên mô hình chuột nhất béo phì thử nghiệm sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế.

Fig.11 là hình ảnh thể hiện kết quả đánh giá mức độ biểu hiện của protein phospho-HSL tham gia vào quá trình phân giải chất béo tích tụ sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế, như được đo bằng phương pháp miễn dịch thấm.

Fig.12 là đồ thị thể hiện mức độ thay đổi cân nặng (g) và mức độ hấp thu dinh dưỡng của các chuột nhất béo phì sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế.

Fig.13 là hình ảnh thể hiện các chuột nhất béo phì sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế.

Fig.14 là hình ảnh thể hiện kết quả đánh giá phân bố chất béo trên mô hình chuột nhất béo phì thử nghiệm C57BL/6 do chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo, như được phân tích bằng phương pháp chụp cắt lớp.

Fig.15 là hình ảnh thể hiện tế bào mô mỡ được chiết tách từ các chuột nhất béo phì thử nghiệm C57BL/6 do chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo, sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế.

Fig.16A là hình ảnh thể hiện hình thái của các tế bào mô mỡ được chiết tách từ các chuột nhất béo phì thử nghiệm C57BL/6 do chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo, sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế. Fig.16B là hình ảnh thể hiện kích cỡ của các tế bào mô mỡ được chiết tách từ các chuột nhất béo phì thử nghiệm C57BL/6 do chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo, sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế.

Fig.17 là hình ảnh thể hiện kết quả đánh giá mức độ biểu hiện của protein phospho-HSL, tham gia vào quá trình phân giải lipid, ở tế bào mô mỡ được chiết tách từ các chuột nhất béo phì thử nghiệm C57BL/6 do chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo,

sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế.

Fig.18 là đồ thị thể hiện kết quả đánh giá nồng độ cholesterol trong các mẫu máu được lấy từ từ các chuột nhất béo phì thử nghiệm C57BL/6 do chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo, sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế.

Fig.19 là đồ thị thể hiện kết quả đánh giá nồng độ glucoza trong các mẫu máu được lấy từ từ các chuột nhất béo phì thử nghiệm C57BL/6 do chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo, sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế.

Fig.20 là đồ thị thể hiện mức độ thay đổi nồng độ đường máu trên mô hình chuột nhất DB/DB béo phì sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế.

Fig.21 là đồ thị thể hiện mức độ thay đổi nồng độ cholesterol máu trên mô hình chuột nhất DB/DB béo phì sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế.

Fig.22 là đồ thị thể hiện mức độ thay đổi nồng độ đường máu trên mô hình chuột nhất DB/DB béo phì sau khi điều trị bằng peptit theo sáng chế: (A) peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, (B) peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và (C) peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5.

Fig.23 là hình ảnh thể hiện kết quả đánh giá mức độ biểu hiện của yếu tố tăng trưởng tương tự insulin-1 (IGF-1) và insulin sau khi điều trị bằng peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7.

Fig.24 là đồ thị thể hiện mức độ thay đổi nồng độ đường máu trên mô hình chuột nhất DB/DB béo phì sau khi điều trị bằng peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7.

Fig.25A-Fig.25D là đồ thị thể hiện mức độ thay đổi nồng độ đường máu ở người bệnh đái tháo đường có nồng độ glucoza máu cao sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “peptit” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phân tử mạch thẳng chứa các gốc axit amin được liên kết bằng các liên kết peptit. Peptit theo sáng chế có thể được điều chế bằng các phương pháp tổng hợp hóa học đã biết trong lĩnh vực này, đặc biệt là phương pháp tổng hợp pha rắn (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963);

Stewart, et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)) hoặc phương pháp tổng hợp pha lỏng (Patent Mỹ số 5,516,891).

Để chọn lọc các vùng trình tự axit amin và tăng hoạt tính, peptit theo sáng chế có thể được cải biến ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của nó. Khi được cải biến như vậy, thì peptit theo sáng chế có thời gian bán thải được kéo dài sau khi sử dụng *in vivo*.

Hơn nữa, các đầu tận cùng C của peptit theo sáng chế có thể được cải biến bằng nhóm hydroxy (-OH), nhóm amin (-NH₂), nhóm azit (-NHNH₂); v.v, trong khi đó các đầu tận cùng N có thể được ghép cặp với gốc bảo vệ được chọn từ nhóm bao gồm axetyl, florenyl, metoxy, carbonyl, formyl, palmitoyl, myristyl, stearyl, và polyetylen glycol (PEG).

Khi được cải biến axit amin như nêu trên, thì độ ổn định của peptit theo sáng chế có thể tăng đáng kể. Thuật ngữ “độ ổn định” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ độ ổn định *in vivo* và độ ổn định bảo quản (ví dụ độ ổn định khi bảo quản ở nhiệt độ phòng). Gốc bảo vệ có tác dụng bảo vệ peptit theo sáng chế không bị tấn công bởi proteinaza *in vivo*.

Theo một phương án, peptit theo sáng chế có hoạt tính ức chế tích tụ chất béo do chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo và phân giải chất béo tích tụ, làm giảm biểu hiện các chất chỉ thị tạo mỡ bao gồm thụ thể hoạt hóa bởi phối tử kích thích tăng sinh vi thể peroxy γ , axetyl-CoA carboxylaza, và protein gắn kết axit béo đặc hiệu mô mỡ 2, làm tăng biểu hiện các yếu tố phân giải lipid bao gồm lipaza nhạy cảm với phospho-hormon, protein kinaza hoạt hóa bởi adenosin monophosphat $\alpha 1$, gen kích thích chuyển hóa lipid 58, và triglycerit mô mỡ lipaza, giảm kích cỡ tế bào tạo mỡ, và giảm nồng độ cholesterol máu. Các kết quả này cho thấy rằng peptit theo sáng chế có hiệu quả điều trị bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường, và bệnh đái tháo đường do béo phì rất cao.

Không chỉ các peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.7, mà cả phức hợp của chúng cũng có hoạt tính chống béo phì và đái tháo đường rất cao.

Theo sáng chế, các peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.5, và SEQ ID NO.7 lần lượt tương ứng với các peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4, và SEQ ID NO.6, chỉ khác là gốc xystein được

thể bằng gốc serin. Các cặp peptit tương ứng có hoạt tính chống béo phì hoặc đái tháo đường gần như tương đương.

Theo một phương án, hỗn hợp peptit có hoạt tính chống béo phì hoặc đái tháo đường bao gồm peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1; peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc SEQ ID NO.3; và peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6 hoặc SEQ ID NO.7.

Theo một phương án khác, hỗn hợp peptit theo sáng chế bao gồm peptit có các trình tự axit amin tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, và SEQ ID NO.7.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hoạt chất là peptit hoặc hỗn hợp peptit theo sáng chế để bào chế hoặc điều trị bệnh béo phì.

Do có hoạt tính phân giải lipid và ức chế tạo mỡ rất cao, nên peptit hoặc hỗn hợp peptit theo sáng chế có thể hữu ích để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh béo phì.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hoạt chất là peptit hoặc hỗn hợp peptit theo sáng chế để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường.

Do có hoạt tính làm giảm hiệu quả nồng độ đường máu tăng trên mô hình động vật bị bệnh đái tháo đường, nên peptit hoặc hỗn hợp peptit theo sáng chế có thể được sử dụng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường.

Theo một số phương án, dược phẩm theo sáng chế chứa: (a) lượng hữu hiệu của peptit hoặc hỗn hợp peptit theo sáng chế; và chất mang dược dụng.

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

Chất mang dược dụng chứa trong dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm, như không chỉ giới hạn ở lactoza, đextroza, sucroza, sorbitol, manitol, tinh bột, gôm acacia, canxi carbonat, alginat, gelatin, canxi silicat, xenluloza vi tinh thể, polyvinyl pyrrolidon, xenluloza, nước, xirô, metyl xenluloza, metyl hydroxybenzoat, propyl hydroxybenzoat, talc, magie stearat, và dầu khoáng. Ngoài các thành phần này, dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa tá dược trơn, chất làm ẩm, chất làm ngọt, chất thơm, chất nhũ hóa, chất gây thẩm ổn định, và chất bảo quản. Chất mang dược dụng và tá dược thích hợp để sử dụng được mô tả trong tài liệu *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995).

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng theo đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa. Để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, đường tiêm bắp, tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, tiêm màng bụng, đường khu trú, hoặc qua da có thể được sử dụng.

Liều dược phẩm theo sáng chế có thể thay đổi phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm dạng bào chế, cách thức sử dụng, độ tuổi, cân nặng, giới tính, tình trạng sức khỏe, chế độ dinh dưỡng của đối tượng bị bệnh, thời gian sử dụng, đường đưa thuốc, tốc độ thải trừ, khả năng nhạy cảm, v.v. Ví dụ, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng ở liều hàng ngày nằm trong khoảng từ 0,0001 μ g đến 1000 μ g.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng liều đơn hoặc bao gói đa liều sử dụng chất mang dược dụng và/hoặc tá dược theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Công thức bào chế của dược phẩm có thể là dung dịch, hỗn dịch hoặc nhũ tương chứa dược phẩm trong môi trường nước hoặc dầu, hoặc chiết xuất, bột, cốm, viên nén hoặc viên nang chứa dược phẩm, và có thể còn chứa chất phân tán hoặc chất ổn định.

Các ưu điểm và dấu hiệu của sáng chế được thể hiện dưới đây:

(i) peptit và hỗn hợp peptit theo sáng chế không chỉ có tác dụng chống béo phì bằng cách ức chế tích tụ chất béo và phân giải chất béo tích tụ, mà cũng có tác dụng điều trị bệnh đái tháo đường bằng cách làm giảm hữu hiệu nồng độ đường máu.

(ii) peptit và hỗn hợp peptit theo sáng chế làm giảm biểu hiện các chất chỉ thị tạo mỡ bao gồm thụ thể hoạt hóa bởi phối tử kích thích tăng sinh vi thể peroxyl γ , axetyl-CoA carboxylaza, và protein gắn kết axit béo đặc hiệu mô mỡ 2, làm tăng biểu hiện các yếu tố phân giải lipid bao gồm lipaza nhạy cảm với phospho-hormon, protein kinaza hoạt hóa bởi adenosin monophosphat α 1, gen kích thích chuyển hóa lipid 58, và triglyxerit mô mỡ lipaza, do đó làm giảm kích cỡ tế bào tạo mỡ và nồng độ cholesterol máu.

(iii) peptit và hỗn hợp peptit theo sáng chế có hoạt tính và độ an toàn rất cao, do đó có thể được sử dụng hữu ích để bào chế dược phẩm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ dưới đây. Các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế. Do đó, phạm vi cơ bản của sáng chế sẽ được thể hiện trong bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo và các biến thể tương đương của nó.

Ví dụ điều chế 1: Điều chế peptit

Trong thiết bị phản ứng, nhựa clotrityl clorua (700mg, nhựa CTL, Nova biochem Cat No. 01-64-0021) được bổ sung với metylen clorua (10mL, MC) và khuấy trong 3 phút. Sau khi loại bỏ dung môi, dimethyl formamit (10mL, DMF) được bổ sung vào. Dung dịch thu được được khuấy một lần nữa trong 3 phút, sau đó dung môi được loại bỏ. Bổ sung dung dịch điclometan (10mL) vào bình phản ứng này, tiếp theo bổ sung Fmoc-Asn(Trt)-OH (200mmol, Bachem, Swiss) và diisopropyl etylamin (400mmol, DIEA). Các chất phản ứng được hòa tan kỹ và phản ứng kết hợp khuấy trong 1 giờ., sau đó, dung dịch thu được được rửa, và phản ứng với dung dịch chứa metanol và DIEA (2:1) trong DCM (điclometan) trong 10 phút. Sau khi rửa bằng lượng dư DCM/DMF (1:1), dung môi được loại bỏ., sau đó, dimethyl formamit (10mL, DMF) được bổ sung vào, tiếp theo khuấy trong 3 phút. Sau khi loại bỏ dung môi, dung dịch khử bảo vệ (10mL, 20% piperidin/DMF) được bổ sung vào thiết bị phản ứng này. Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 10 phút để loại bỏ dung môi. Dung dịch khử bảo vệ được bổ sung vào (10mL), sau đó loại bỏ sau 10 phút phản ứng. Hỗn hợp thu được được rửa hai lần bằng DMF, một lần bằng MC, và một lần bằng DMG trong 3 phút mỗi lần rửa để thu được nhựa Asn-CTL. Trong một thiết bị phản ứng khác, Fmoc-Arg(Pbf)-OH (200mmol, Bachem, Swiss), HoBt (200mmol), và Bop (200mmol) được bổ sung vào dung dịch DMF (10mL) và hòa tan kỹ bằng cách khuấy. DIEA (400mmol) được bổ sung vào thiết bị phản ứng này) trong hai phần, tiếp theo khuấy trong ít nhất 5 phút để hòa tan hoàn toàn chất rắn này. Dung dịch hỗn hợp axit amin đã hòa tan được nạp vào bình phản ứng này, trong đó nhựa đã khử bảo vệ đã được bổ sung vào, tiếp theo khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng để phản ứng. Sau khi dịch phản ứng được loại bỏ, quá trình khuấy được thực hiện 3 lần, mỗi lần 3 phút, cùng với, sau đó dung dịch DMF được loại bỏ. Lượng nhỏ các nhựa phản ứng được lấy mẫu và sử dụng trong thử nghiệm Kaiser (thử nghiệm ninhydrin) để đánh giá mức độ phản ứng. Phản ứng khử bảo vệ tương tự được thực hiện hai lần với dung dịch khử bảo vệ để thu được nhựa Arg-Asn-CTL. Các nhựa được rửa đầy đủ bằng DMF và MC trước khi thực hiện tiếp thử nghiệm Kaiser. Các thử nghiệm gắn axit amin sau được thực hiện theo cùng cách thức như mô tả nêu trên. Theo các trình tự axit amin được chọn, các phản ứng lần lượt được thực hiện với Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, và Fmoc-Leu-OH. Nhóm bảo vệ Fmoc được loại bỏ bằng cách phản ứng hai lần với dung dịch khử bảo vệ trong 10 phút mỗi phản ứng, sau đó rửa kỹ. Anhydrit

axetic, DIEA, và HoBt được bổ sung vào và được axetyl hóa trong 1 giờ. Các nhựa peptidyl thu được được rửa bằng DMF, MC, và metanol ba lần mỗi dung môi. Các nhựa này được làm khô từ từ bằng khí nitơ, sau đó làm khô hoàn toàn ở điều kiện chân không trong khí P₂O₅. Các nhựa này được phản ứng trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng với dung dịch dời chuyển (30mL, axit trifloaxetic 81,5%, nước cất 5%, thioanisol 5%, phenol 5%, EDT 2,5%, và TIS 1%) kết hợp khuấy kỹ. Các nhựa này được lọc và rửa bằng dung dịch TFA (thể tích nhỏ), sau đó dịch lọc được kết hợp với dịch cái. Sau khi chưng cất ở điều kiện áp suất giảm để giảm tổng thể tích xuống hai lần, ete lạnh (50mL) được sử dụng để gây kết tủa, sau đó, các chất kết tủa tạo thành được thu nhận bằng cách ly tâm và rửa hai lần bằng ete lạnh. Sau khi loại bỏ dịch cái, phần còn lại được làm khô đầy đủ bằng khí nitơ để thu được peptit chưa tinh chế có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 (NH₂-Leu-Lys-Thr-Arg-Asn-COOH, 0,85g, hiệu suất: 92%). Quá trình tổng hợp tương tự được thực hiện để thu được peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3 (NH₂-Lys-Gly-Ala-Cys(Ser)-Thr-Gly-Trp-Met-Ala-COOH, 0,78g, hiệu suất: 82%), peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4 và SEQ ID NO.5 (NH₂-Ala-Cys(Ser)Thr-Leu-Pro-His-Pro-Trp-Phe-Cys(Ser)-COOH, 0,92g, hiệu suất: 85%), và peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6 và SEQ ID NO.7 (NH₂-Cys(Ser)-Asp-Leu-Arg-Arg-Leu-Glu-Met-Tyr-Cys(Ser)-COOH, 0,76g, hiệu suất: 88%). Các peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4, và SEQ ID NO.6 có khối lượng phân tử tương ứng là 630,7 (tính toán lý thuyết: 630,7), 924,5 (tính toán lý thuyết: 924,1), 1236 (tính toán lý thuyết: 1236,5), và 1301,5 (tính toán lý thuyết: 1301,5, như được đo bằng phương pháp khối phổ).

Bảng 1

Peptit	Trình tự axit amin	Phân tích khối phổ	
		Đo được	Tính toán
SEQ ID NO.1		630,7	630,7
SEQ ID NO.2	KGACTGWMA	924,5	924,1 (908,0)
SEQ ID NO.3	KGASTGWMA		
SEQ ID NO.4	ACYLPHPWFC	1236	1236,5 (1269,4)
SEQ ID NO.5	ASYLPHPWFS		
SEQ ID NO.6	CDLRRLEMYC	1301,5	1301,5
SEQ ID NO.7	SDLRRLEMYS		

Đồng thời, peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, và SEQ ID NO.7 được trộn ở lượng tương đương để thu được hỗn hợp peptit để

đánh giá hiệu lực.

Ví dụ 1: Đánh giá hoạt tính ức chế tạo mỡ

1-1. Đánh giá hoạt tính ức chế tích tụ lipid bằng cách sử dụng nguyên bào mỡ (Phương pháp nhuộm dầu red O)

Các nguyên bào mỡ 3T3-L1 được sinh trưởng đến độ hợp lưu, sau đó ủ trong hai ngày với các nồng độ khác nhau của các peptit trên môi trường biệt hóa chứa 10 μ g/mL insulin, 0,1 μ M dexametason, và 0,5 μ M IBMX. Môi trường được thay hai ngày một lần bằng môi trường chứa 10 μ g/mL insulin. Sau khi cảm ứng biệt hóa trong 10 ngày, sự hình thành giọt mỡ trong tế bào được đánh giá bằng phương pháp nhuộm dầu red O. Các tế bào mỡ 3T3-L1 thu được được rửa bằng PBS, cố định bằng formalin 3,7% trong 1 giờ, và rửa bằng isopropanol 60%. Các tế bào thu được được nhuộm bằng dầu red O ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Sau khi loại bỏ dầu red O, các tế bào được rửa ba lần bằng nước cất, và quan sát trên kính hiển vi tương phản pha. Để phân tích định lượng, các chất béo được chiết tách từ các tế bào bằng cách sử dụng isopropanol 100%, và các tế bào được chuyển vào các đĩa 96 giếng ở thể tích bằng 200 μ L/giếng và đo mật độ quang ở bước sóng 500nm bằng cách sử dụng thiết bị đọc ELISA.

Dữ liệu thử nghiệm cho thấy quá trình xử lý bằng các peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, và SEQ ID NO.5 đã làm giảm mức độ tích tụ chất béo trong tế bào, như được đánh giá bằng phương pháp nhuộm dầu red O (Fig.1A-Fig.1C).

Mức độ tích tụ lipid trong tế bào cũng giảm khi phức hợp bao gồm các peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, và SEQ ID NO.7 được sử dụng ở cùng nồng độ (Fig.2).

1-2. Đánh giá hoạt tính ức chế biểu hiện gen tham gia vào quá trình tạo mỡ

Các nguyên bào mỡ 3T3-L1 được tạo mầm ở mật độ bằng 3x10⁵ tế bào/giếng vào các đĩa 6 giếng. Sau 24 giờ nuôi cấy, các tế bào được ủ với các nồng độ xác định trước (0,1, 1, và 10 μ g/mL) của các peptit trong 14 ngày ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ., sau đó, các tế bào được thu nhận và xử lý với dung dịch chiết tách ARN (Easy Blue, Intron) để thu được ARN và tổng hợp ADN bổ sung từ ARN này bằng cách sử dụng hỗn hợp cơ chất RT (Intron). Phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc

hiệu cho các gen chỉ thị kháng nguyên (PPAR γ , ACC, và aP2), và hỗn hợp cơ chất PCR (Intron).

Các trình tự đoạn mồi đặc hiệu cho các gen chỉ thị kháng nguyên tạo mỡ để thực hiện phản ứng PCR là như sau: PPAR γ đoạn mồi xuôi, 5'-TTTTC AAGGGTGCCAGTTTC-3' và PPAR γ đoạn mồi ngược, 5'-AATCCTTGGCCCTCTGAGAT-3' (nhiệt độ lai, 60°C); ACC đoạn mồi xuôi, 5'-ACCTTACTGCCATCCCATGTGCTA-3' và ACC đoạn mồi ngược, 5'-GTGCCTGATGATCGCACGAACAAA-3' (nhiệt độ lai, 60°C); aP2 đoạn mồi xuôi, 5'-CATCAGCGTAAATGGGGATT-3' và aP2 đoạn mồi ngược, 5'-ACACATTCCACCACCAGCTT-3' (nhiệt độ lai, 60°C).

Mỗi sản phẩm PCR được nạp ở thể tích bằng 5 μ L lên gel agarosa 1%, và chạy điện di, tiếp theo xác định các băng trên Gel-Doc.

Mức độ biểu hiện của gen chỉ thị tạo mỡ aP2 đã được giảm ở các nguyên bào mỡ 3T3-L1 của chuột nhắt được ủ với peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, hoặc SEQ ID NO.5 trong 3 ngày (Fig.3A-Fig3C).

Mức độ biểu hiện của các chất chỉ thị tạo mỡ bao gồm thụ thể hoạt hóa bởi phối tử kích thích tăng sinh vi thể peroxy γ , axetyl-CoA carboxylaza, và protein gắn kết axit béo đặc hiệu mô mỡ 2 cũng đã được giảm ở các nguyên bào mỡ 3T3-L1 của chuột nhắt được ủ trong 3 này với phức hợp bao gồm các peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, và SEQ ID NO.7 ở các nồng độ bằng 0,1 μ g/mL, 1 μ g/mL, và 10 μ g/mL; tương tự như các tế bào đối chứng dương được xử lý với 100ng/mL TNF α (Fig.4).

1-3. Đánh giá mức độ biểu hiện của protein gây phân giải lipid và tạo mỡ bằng cách sử dụng nguyên bào mỡ

Các nguyên bào mỡ 3T3-L1 được tạo mầm ở mật độ bằng 3x10⁵ tế bào/giếng vào các đĩa 6 giếng. Sau 24 giờ nuôi cấy, các tế bào được ủ trong 14 ngày với các nồng độ xác định trước (0,1, 1, và 10 μ g/mL) của hỗn hợp peptit ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ. Dịch phân giải tế bào thu được bằng quá trình xử lý bằng dung dịch đệm phân giải tế bào được sử dụng để định lượng protein, tiếp theo thực hiện phân tích thẩm tách Western với kháng thể kháng PPAR γ (Santa Cruz Biotechnology, USA), là kháng thể kháng chất chỉ

thị tạo mỡ, và kháng thể kháng pHSL (Santa Cruz Biotechnology, USA), là kháng thể kháng chất chỉ thị phân giải lipid.

Khi xử lý bằng hỗn hợp peptit ở các nồng độ xác định, mức độ biểu hiện của gen chỉ thị tạo mỡ PPAR γ ở các tế bào đã được giảm theo cơ chế phụ thuộc liều trong khi đó toàn bộ mức độ biểu hiện của gen chỉ thị phân giải lipid pHSL đã tăng (Fig.5).

Ví dụ 2: Đánh giá hoạt tính phân giải lipid

2-1. Mức độ biểu hiện tăng của các gen tham gia vào quá trình phân giải lipid

Các nguyên bào mỡ 3T3-L1 được tạo mầm ở mật độ bằng 3×10^5 tế bào/giếng vào các đĩa 6 giếng. Sau 24 giờ nuôi cấy, các tế bào được ủ trong 14 ngày với các nồng độ xác định trước (0,1, 1, và 10 μ g/mL) của các peptit ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ (mẫu đối chứng dương: 100ng/mL TNF α (SIGMA)). Các tế bào được thu nhận và xử lý với dung dịch chiết tách ARN (Easy Blue, Intron) để thu được ARN và tổng hợp ADN bổ sung từ ARN này bằng cách sử dụng hỗn hợp cơ chất RT (Intron). Phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu cho các gen chỉ thị (AMPK- α 1 và CGI58), và hỗn hợp cơ chất PCR (Intron).

Các trình tự đoạn mồi đặc hiệu cho các gen chỉ thị phân giải lipid PCR là như sau: AMPK- α 1 đoạn mồi xuôi, 5'-TGACCGGACATAAAGTGGCTGTGA-3' và AMPK- α 1 đoạn mồi ngược, 5'-TGATGATGTGAGGGTGCCTGAACA-3' (nhiệt độ lai, 60°C); CGI58 đoạn mồi xuôi, 5'-TGTGCAGGACTCTTACTTGGCAGT-3' và CGI58 đoạn mồi ngược, 5'-GTTTCTTTGGGCAGACCGGTTTCT-3' (nhiệt độ lai, 60°C).

Mỗi sản phẩm PCR được nạp ở thể tích bằng 5 μ L lên gel agarosa 1%, và chạy điện di, tiếp theo xác định các băng trên Gel-Doc.

Mức độ biểu hiện của các gen chỉ thị phân giải lipid AMPK- α 1 và CGI-58 đều đã tăng ở toàn bộ các nguyên bào mỡ (3T3-L1) được ủ với các peptit (Fig.6A-Fig.6C). Ngoài ra, quá trình xử lý bằng hỗn hợp peptit cũng đã làm tăng biểu hiện AMPK- α 1 và CGI-58 theo cơ chế phụ thuộc liều và đến mức độ cao hơn mẫu đối chứng dương TNF α (100ng/mL, Fig.6D).

2-2. Đánh giá mức độ biểu hiện của protein phân giải lipid bằng cách sử dụng nguyên bào mỡ

Các nguyên bào mỡ 3T3-L1 được tạo mầm ở mật độ bằng 3×10^5 tế bào/giếng vào

các đĩa 6 giếng. Sau 24 giờ nuôi cấy, các tế bào được ủ trong 14 ngày với các nồng độ xác định trước (0,1, 1, và 10 μ g/mL) của hỗn hợp peptit ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ (mẫu đối chứng dương: 100ng/mL TNF α (SIGMA)). Dịch phân giải tế bào thu được bằng quá trình xử lý bằng dung dịch đệm phân giải tế bào được sử dụng để định lượng protein, tiếp theo thực hiện phân tích thẩm tách Western với kháng thể kháng ATGL (Santa Cruz Biotechnology, USA), là kháng thể kháng chất chỉ thị phân giải lipid.

Mức độ biểu hiện của chất chỉ thị phân giải lipid ATGL đã tăng khi xử lý bằng hỗn hợp peptit (Fig.7).

2-3. Đánh giá mức độ biểu hiện của protein phân giải lipid trên kính hiển vi huỳnh quang bằng cách sử dụng nguyên bào mỡ

Các nguyên bào mỡ 3T3-L1 được tạo mầm ở mật độ bằng 3x10⁵ tế bào/giếng vào các đĩa 6 giếng. Sau 24 giờ nuôi cấy, các tế bào được ủ trong 14 ngày với các peptit riêng biệt hoặc hỗn hợp peptit (1 μ g/mL) ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ (mẫu đối chứng dương: 100ng/mL TNF α (SIGMA))., sau đó, các tế bào được cố định bằng etanol 70%, sau đó thấm miễn dịch bằng kháng thể kháng phospho-HSL (Santa Cruz Biotechnology, USA) để đánh giá mức độ biểu hiện của chất chỉ thị phân giải lipid phospho-HSL trong tế bào.

Dữ liệu thử nghiệm cho thấy các peptit riêng biệt (Fig.8A-Fig.8C) và hỗn hợp peptit (Fig.8D) đều làm tăng biểu hiện chất chỉ thị phân giải lipid phospho-HSL.

2-4. Định lượng glyxerol sản sinh trong quá trình phân giải lipid

Sau khi được chiết tách từ bụng của các chuột nhắt béo phì, các mô mỡ được đặt vào các đĩa 24 giếng ở nồng độ bằng 100mg/giếng và nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy (11mL dung dịch đệm Krebs-Ringer chứa 25mM HEPES, 5,5mM glucoza, và 2% (khối lượng/thể tích) albumin huyết thanh bò). Cụ thể, các mô được ủ trong 48 giờ với 0,1 μ g/mL, 1 μ g/mL, và 10 μ g/mL hỗn hợp peptit trong khi đó TNF α (100ng/mL) được sử dụng làm mẫu đối chứng dương. Glyxerol sản sinh trong quá trình phân giải lipid được định lượng.

Dữ liệu thử nghiệm cho thấy lượng glyxerol sản sinh trong quá trình phân giải lipid khi xử lý bằng hỗn hợp peptit đã tăng theo cơ chế phụ thuộc liều và lớn hơn lượng sản sinh khi xử lý bằng mẫu đối chứng dương TNF α (Fig.9).

2-5. Tác dụng phân giải mô mỡ được chiết tách từ chuột nhắt béo phì

Các mô mỡ được phân loại thành mỡ trắng và mỡ nâu căn cứ theo màu sắc và mỡ dưới da, mỡ bụng, mỡ màng treo ruột (mỡ nội tạng), và mỡ mô mào tinh hoàn. Sau khi giải phẫu cơ thể, thủ thuật cắt bỏ các mô mỡ được thực hiện trên các mô. Các mỡ trắng được phân lập, đặt vào các đĩa 24 giếng ở nồng độ bằng 100mg/giếng, sau đó ủ trong 72 giờ với các nồng độ của hỗn hợp peptit trong môi trường nuôi cấy (11mL dung dịch đệm Krebs-Ringer chứa 25mM HEPES, 5,5mM glucoza, và 2% (khối lượng/thể tích) albumin huyết thanh bò). Các mỡ này được cắt thành các lát, sau đó nhuộm màu bằng hematoxylin và eosin. Kích cỡ tế bào mỡ được quan sát và đánh giá bằng kính hiển vi (TS100 Nikon) ở độ phóng đại 100 lần.

So với mẫu đối chứng, kích cỡ của các tế bào mô mỡ được xử lý với các nồng độ khác nhau của các peptit đã giảm (Fig.10A). Ngoài ra, khi xử lý bằng hỗn hợp peptit, các mô mỡ có các khoang màng tế bào riêng biệt đã được quan sát thấy ở kích thước tế bào, như được đo bằng chương trình (Fig.10B).

2-6. Đánh giá mức độ biểu hiện của chất chỉ thị phân giải lipid ở mô mỡ

Mô mỡ được chiết tách từ bụng của các chuột nhắt béo phì được đặt vào các đĩa 24 giếng ở nồng độ bằng 100mg/giếng và ủ trong 48 giờ với hỗn hợp peptit và TNF α (100ng/mL) được sử dụng làm mẫu đối chứng dương. Chất chỉ thị phân giải lipid phospho-HSL được đánh dấu (chất phát huỳnh quang màu xanh) được phát hiện.

Quá trình xử lý bằng hỗn hợp peptit cũng đã làm tăng mức độ biểu hiện của chất chỉ thị phân giải lipid phospho-HSL trong các mô mỡ (Fig.11).

Ví dụ 3: Hoạt tính phân giải lipid và ức chế tạo mỡ trên mô hình chuột béo phì

Hoạt tính ức chế tạo mỡ và giảm cân trên chuột nhắt được cho ăn chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo

Các chuột nhắt được gây béo phì bằng cách cho ăn chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo, được sử dụng trong các thử nghiệm chống béo phì trong đó TNF α 5 μ g/mL được sử dụng làm mẫu đối chứng dương. Để đối chứng, chế độ dinh dưỡng thông thường, không phải là chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo, được cho ăn. Trong thử nghiệm này, chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo được cho ăn trong 12 tuần đồng thời hỗn hợp peptit hoặc mẫu đối chứng dương được sử dụng. Trong quá trình thử nghiệm, cân

nặng được theo dõi.

TNF α và các dược chất chống béo phì được tiêm màng bụng vào 3-4 giờ chiều hàng tuần trong 12 tuần. Cân nặng và khẩu phần ăn được xác định ngay trước khi bắt đầu tiêm, sau đó xác định thường xuyên một tuần một lần. Các mẫu máu được lấy từ tĩnh mạch đuôi sau khi tiêm các dược chất thử nghiệm và đo nồng độ đường máu, bằng cách sử dụng Accu-Check Active (Roche) và phân tích nồng độ cholesterol, bằng cách sử dụng kit định lượng cholesterol (BioVision). Các mô mỡ được phân loại thành mỡ trắng và mỡ nâu căn cứ theo màu sắc và mỡ dưới da, mỡ bụng, mỡ màng treo ruột (mỡ nội tạng), và mỡ mô mỡ tinh hoàn. Sau khi thực hiện thủ thuật cắt mô mỡ, các mỡ thu được từ các mô được quan sát. Để phân tích mô học, các mỡ được cố định bằng dung dịch đệm formalin trung tính 10%, nhúng trong khối parafin, cắt thành các lát có kích cỡ 5 μ m, và nhuộm màu bằng hematoxylin và eosin. Để phân tích quá trình phosphoryl hóa chất chỉ thị phân giải lipid HSL, phản ứng nhuộm huỳnh quang được thực hiện bằng kháng thể kháng pHSL. Mẫu mô được điều chế, gắn lên màng gắn kết gel glycerin, và đặt bằng kính che. Các mô được quan sát bằng kính hiển vi (Nikon, TS100), được trang bị máy chụp ảnh kỹ thuật số.

Trong 12 tuần từ giai đoạn ban đầu đến giai đoạn cuối cùng của thử nghiệm, cân nặng của các chuột nhắt thử nghiệm đã tăng từ 20,9g lên 28,74g khi được cho ăn chế độ dinh dưỡng thông thường và từ 20,99g lên 49,5g khi được cho ăn chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo. Ở các chuột nhắt được cho ăn chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo và tiêm hỗn hợp peptit, cân nặng chỉ tăng đến 36,76g sau 12 tuần từ cân nặng ban đầu bằng 21,1g, cho thấy giảm đáng kể tăng cân (174,2%), so với các chuột đối chứng được cho ăn chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo (235,8%) (Bảng 2 và Fig.12).

Bảng 2: Cân nặng của chuột nhắt béo phì sau khi điều trị bằng hỗn hợp peptit.

	Chế độ dinh dưỡng thông thường (đối chứng)	Chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo (đối chứng)	Chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo và đối chứng dương	Chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo và phức hợp protein
Cân nặng (g)				
tuần 0	20,09	20,99	22,41	21,1
tuần 1	20,75	22,32	23	21,26
tuần 2	21,99	25,25	26,12	23,72
tuần 3	18,23	27,35	27,45	24,36
tuần 4	23,26	30,2	30,51	25,29
tuần 5	23,16	32,76	32,76	28,65
tuần 6	23,28	36,78	33,49	28,79

tuần 7	24,71	38,31	35,14	30,37
tuần 8	25,84	40,12	37,15	31,53
tuần 9	25,59	42,14	38,97	32,59
tuần 10	28,13	43,02	40,39	33,78
tuần 11	27,9	45,7	41,35	35,33
tuần 12	28,74	49,5	43,91	36,76
Cân nặng (%)				
	Chế độ dinh dưỡng thông thường (đối chứng)	Chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo (đối chứng)	Chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo và đối chứng dương	Chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo và phức hợp protein
tuần 0	100	100	100	100
tuần 1	103,3	106,3	102,6	100,8
tuần 2	109,5	120,3	116,6	112,4
tuần 3	90,7	130,3	122,5	115,5
tuần 4	115,8	143,9	136,1	119,9
tuần 5	115,3	156,1	146,2	135,8
tuần 6	115,9	175,2	149,4	136,4
tuần 7	123,0	182,5	156,8	143,9
tuần 8	128,6	191,1	165,8	149,4
tuần 9	127,4	200,8	173,9	154,5
tuần 10	140,0	205,0	180,2	160,1
tuần 11	138,9	217,7	184,5	167,4
tuần 12	143,1	235,8	195,9	174,2

Ngoài ra, sau khi kết thúc 12 tuần thử nghiệm, các chuột nhắt được điều trị bằng hỗn hợp peptit, vẫn duy trì kích cỡ cơ thể tương tự như các chuột nhắt thông thường (chế độ dinh dưỡng thông thường), nhưng khác với các chuột nhắt được cho ăn chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo, như được phân tích bằng các hình ảnh (Fig.13).

Sau 12 tuần thử nghiệm, các chuột nhắt được chụp cắt lớp để xác định phân bố chất béo trong cơ thể. Kết quả chụp cắt lớp cho thấy các chất béo (màu vàng) trong cơ thể, chất béo được phân bố trên toàn cơ thể đã tăng đáng kể ở các chuột nhắt được cho ăn chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo, so với các chuột đối chứng được cho ăn chế độ dinh dưỡng thông thường đồng thời mức độ đã giảm đáng kể đối với các chất béo được phân bố trên toàn cơ thể được quan sát ở nhóm được điều trị bằng hỗn hợp peptit và cho ăn chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo (Fig.14).

Các chuột nhắt đã được chụp cắt lớp được giải phẫu để chiết tách các mô mỡ được phân bố trên toàn cơ thể. Thể tích của các mô mỡ được so sánh. Kết quả phân tích cho thấy thể tích chất béo được chiết tách từ các chuột nhắt được cho ăn chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo cao hơn thể tích chất béo được chiết tách từ các chuột nhắt được cho ăn chế độ dinh dưỡng thông thường, và thể tích chất béo ở các chuột nhắt được điều trị bằng hỗn hợp peptit và cho ăn chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo đã giảm đáng kể

(Fig.15).

Các chất béo được phân lập, và nhuộm màu bằng hematoxylin và eosin để xác định kích cỡ chất béo. Kích cỡ của các chất béo được quan sát ở các chuột nhắt được điều trị bằng bằng cả chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo lẫn hỗn hợp peptit nhỏ hơn kích cỡ chất béo ở các chuột đối chứng được cho ăn chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo (Fig.16A). Phân tích kích cỡ chất béo bằng chương trình cho thấy, khi kích cỡ chất béo của các chuột đối chứng được cho ăn chế độ dinh dưỡng thông thường được giả định bằng 100%, kích cỡ chất béo đã tăng lên 127% ở nhóm được cho ăn chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo, nhưng đã làm giảm xuống 97% ở nhóm được điều trị bằng hỗn hợp peptit và cho ăn chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo (Fig.16b).

Các chất béo được phân lập và đánh giá mức độ biểu hiện chất chỉ thị phân giải lipit phospho-HSL trong các mô mỡ. Các chuột nhắt được điều trị bằng bằng cả chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo lẫn hỗn hợp peptit được quan sát là có mức độ biểu hiện tăng của phospho-HSL (Fig.17).

Nồng độ cholesterol máu ở các chuột nhắt sau thử nghiệm được xác định. Kết quả phân tích cho thấy nồng độ cholesterol máu bằng 2,52 μ g/mL ở các chuột nhắt được cho ăn chế độ dinh dưỡng thông thường, 3,5 μ g/mL ở các chuột nhắt được cho ăn chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo, và 2,86 μ g/mL ở các chuột nhắt được điều trị bằng bằng cả chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo lẫn hỗn hợp peptit, cho thấy rằng hỗn hợp peptit đã làm giảm nồng độ cholesterol tăng với bệnh béo phì (Fig.18).

Nồng độ đường máu sau khi kết thúc thử nghiệm bằng 174mg/dL ở các chuột nhắt được cho ăn chế độ dinh dưỡng thông thường, và tăng lên 235mg/dL ở các chuột nhắt được cho ăn chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo. Tuy nhiên, nồng độ đường máu bằng 183mg/dL ở các chuột nhắt được điều trị bằng bằng cả chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo lẫn hỗn hợp peptit, tức là giảm đáng kể (Fig.19).

Ví dụ 4: Kiểm soát đường máu

Tác dụng kiểm soát đường máu

Trong thử nghiệm này, chuột nhắt C57BL/6 (chuột nhắt bình thường) (do Samtako Inc. cung cấp) chuột nhắt C57BLKS/JLepr giống cái (chuột nhắt bị bệnh đái tháo đường, chuột nhắt DB/DB) (do Central Lab. Animal Inc. cung cấp) được sử dụng, cùng với hỗn

hợp peptit là được chất chống béo phì và/hoặc đái tháo đường, và sitagliptin được sử dụng làm mẫu được chất đối chứng dương. Trong phương án này, hỗn hợp peptit chống béo phì và/hoặc đái tháo đường được đánh giá về hiệu lực chống đái tháo đường cấp tính (sử dụng liều đơn) trên mô hình chuột nhất bình thường và mô hình chuột nhất bị đái tháo đường tiềm tàng, bằng cách sử dụng thử nghiệm dung nạp glucoza, là phương pháp chẩn đoán bệnh đái tháo đường. Các chuột nhất được nuôi trong chuồng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22°C đến 24°C và độ ẩm tương đối nằm trong khoảng từ 30% đến 50%, với 4 chuột/chuồng. Các chuột nhất này được chiếu sáng với cường độ nằm trong khoảng từ 150 đến 300 từ 8 giờ sáng đến 8 giờ tối với chu trình 12 giờ chiếu sáng/12 trong bóng tối. Các chuột nhất này được cho ăn đầy đủ chế độ dinh dưỡng thông thường (18% protein, được sản xuất ở 2018, Harlan Laboratories Inc, USA). Để bắt đầu thử nghiệm, các chuột nhất bị để đói trong 4 giờ hoặc lâu hơn trước khi thử nghiệm dung nạp insulin và trong 12 giờ trước khi thực hiện thử nghiệm dung nạp glucoza. Hỗn hợp peptit theo sáng chế được sử dụng theo đường miệng bằng bơm tiêm dùng một lần giờ trước khi thực hiện thử nghiệm dung nạp glucoza. Để thực hiện thử nghiệm dung nạp glucoza, các chuột nhất cho ăn đầy đủ chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo ở thời điểm 0 giờ sau khi bắt đầu thử nghiệm. Sau 40 phút ăn đầy đủ chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo, các mẫu máu để xác định nồng độ glucoza máu được lấy từ tĩnh mạch đuôi ở các khoảng thời gian 0, 30, 60, 90, 120, và 180 phút. Nồng độ glucoza máu được xác định bằng máy đo đường máu Accu-Chek active (Roche). Sitagliptin, được sử dụng làm được chất điều trị bệnh đái tháo đường, được chọn lọc làm mẫu được chất đối chứng dương, và sử dụng ở liều bằng 100mg/kg. Phức hợp protein được chọn lọc làm được chất chống béo phì và/hoặc đái tháo đường được sử dụng ở liều bằng 100mg/kg cho các nhóm chuột thử nghiệm (n = 4).

Kết quả phân tích cho thấy hỗn hợp peptit có tác dụng làm giảm nồng độ đường máu trong đó nồng độ đường máu đã tăng khi sử dụng chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo đã được giảm khi điều trị bằng hỗn hợp peptit. Ở các chuột nhất bị đái tháo đường, nồng độ đường máu cao đã được giảm bởi hỗn hợp peptit (Fig.20A và Fig.20B). Hơn nữa, nồng độ cholesterol máu thấp hơn được phát hiện ở nhóm được điều trị bằng bằng cả chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo lẫn hỗn hợp peptit so với các chuột nhất đối chứng được cho ăn chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo (Fig.21).

Ngoài ra, sau khi nhịn đói trong 16 giờ, các chuột nhất bị đái tháo đường DB/DB được cho ăn trong 30 phút, sau đó sử dụng các peptit. Nồng độ đường máu được xác định

theo thời gian.

Nồng độ đường máu ở các nhau được điều trị tương ứng bằng các peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, và SEQ ID NO.5 đã giảm theo cơ chế phụ thuộc thời gian (Fig.22A-Fig.22C).

Ví dụ 5: Tác dụng tăng cường biểu hiện insulin và yếu tố tăng trưởng tương tự insulin

Các nguyên bào mỡ 3T3-L1 được tạo mầm ở mật độ bằng 3×10^5 tế bào/giếng vào các đĩa 6 giếng và sinh trưởng trong 24 giờ. Sau đó, các tế bào được ủ với các nồng độ khác nhau (10ng - 1μg/mL) của các peptit trong 14 ngày ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ. Các protein được chiết tách từ dịch phân giải tế bào which được thu nhận bằng cách xử lý với dung dịch đệm phân giải tế bào, định lượng, và phân tích thẩm tách Western bằng cách sử dụng kháng thể kháng IGF-1, là kháng thể kháng chất chỉ thị phân giải lipid, và kháng thể kháng insulin (Santa Cruz Biotechnology, USA).

Dữ liệu phân tích cho thấy peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7 đã làm tăng mức độ biểu hiện của IGF-1 và insulin theo cơ chế phụ thuộc liều (Fig.23).

Phương án 6: Tác dụng giảm nồng độ đường máu trên thử nghiệm lâm sàng

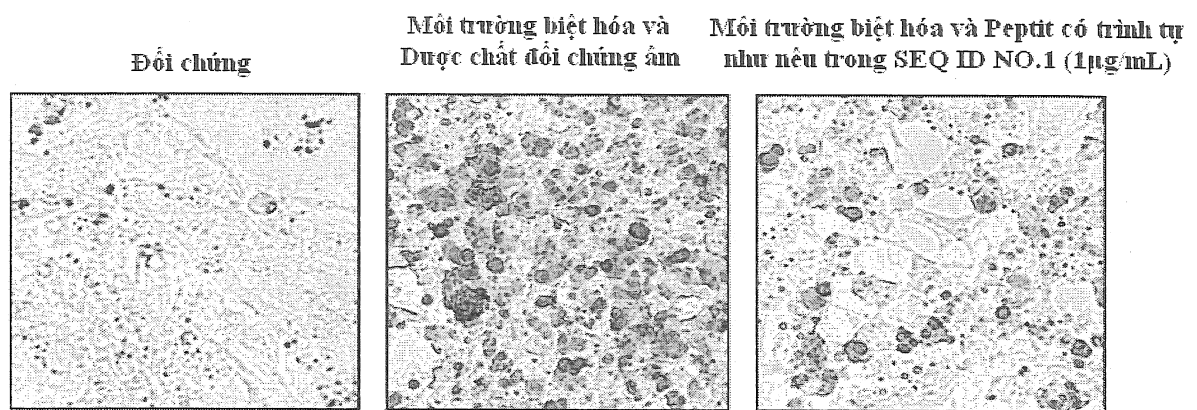
Tác dụng giảm nồng độ đường máu của hỗn hợp peptit theo sáng chế.

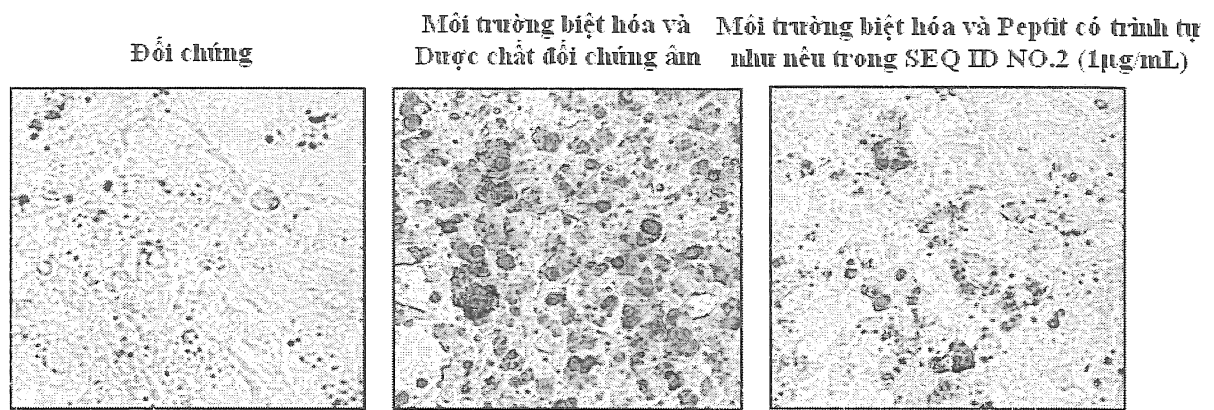
Thử nghiệm lâm sàng được thực hiện trên các người bệnh ở độ tuổi từ 45 đến 65 có nồng độ glucoza máu khi đói bằng 170mg/dL hoặc cao hơn. Các người bệnh này được cho sử dụng chế phẩm hỗn hợp peptit theo sáng chế 30 phút sau khi ăn. Các mẫu máu được lấy nồng độ glucoza máu 30, 60, 90, 120, 150, và 180 phút từ các người bệnh này, và nồng độ glucoza máu được đo bằng máy đo đường máu Accu-Chek active (Roche). Kết quả phân tích cho thấy nồng độ đường máu ở toàn bộ các người bệnh thử nghiệm đã giảm khi được điều trị bằng chế phẩm hỗn hợp peptit theo sáng chế (Fig.25A-Fig.25D).

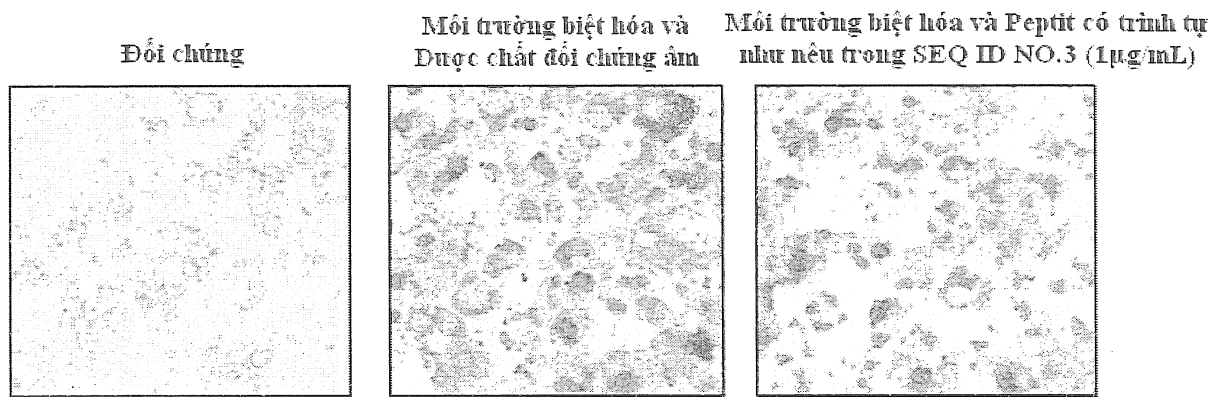
Mặc dù sáng chế đã được mô tả chi tiết thông qua các phương án cụ thể nêu trên, tuy nhiên phạm vi của sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án này. Do đó, phạm vi chủ yếu của sáng chế sẽ được thể hiện bởi bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo và các biến thể tương đương của nó.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3.
2. Peptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 và có hoạt tính chống béo phì hoặc đái tháo đường.
3. Peptit theo điểm 2, trong đó peptit này có hoạt tính ức chế tạo mỡ.
4. Peptit theo điểm 2, trong đó peptit này có hoạt tính làm giảm biểu hiện thụ thể hoạt hóa bởi phối tử kích thích tăng sinh vi thể peroxy γ , axetyl-CoA carboxylaza, hoặc protein gắn kết axit béo đặc hiệu mô mỡ 2.
5. Peptit theo điểm 2, trong đó peptit này có hoạt tính tăng cường phân giải lipid.
6. Peptit theo điểm 2, trong đó peptit này có hoạt tính làm tăng biểu hiện lipaza nhạy cảm với phospho-hormon, protein kinaza hoạt hóa bởi adenosin monophosphat $\alpha 1$, gen kích thích chuyển hóa lipid 58, hoặc triglycerit mô mỡ lipaza.
7. Peptit theo điểm 2, trong đó peptit này có hoạt tính làm giảm nồng độ đường máu.
8. Dược phẩm chứa hoạt chất là peptit theo điểm 2 để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh béo phì.
9. Dược phẩm chứa hoạt chất là peptit theo điểm 2 để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường typ II.

**Fig.1A**

**Fig.1B**

**Fig.1C**

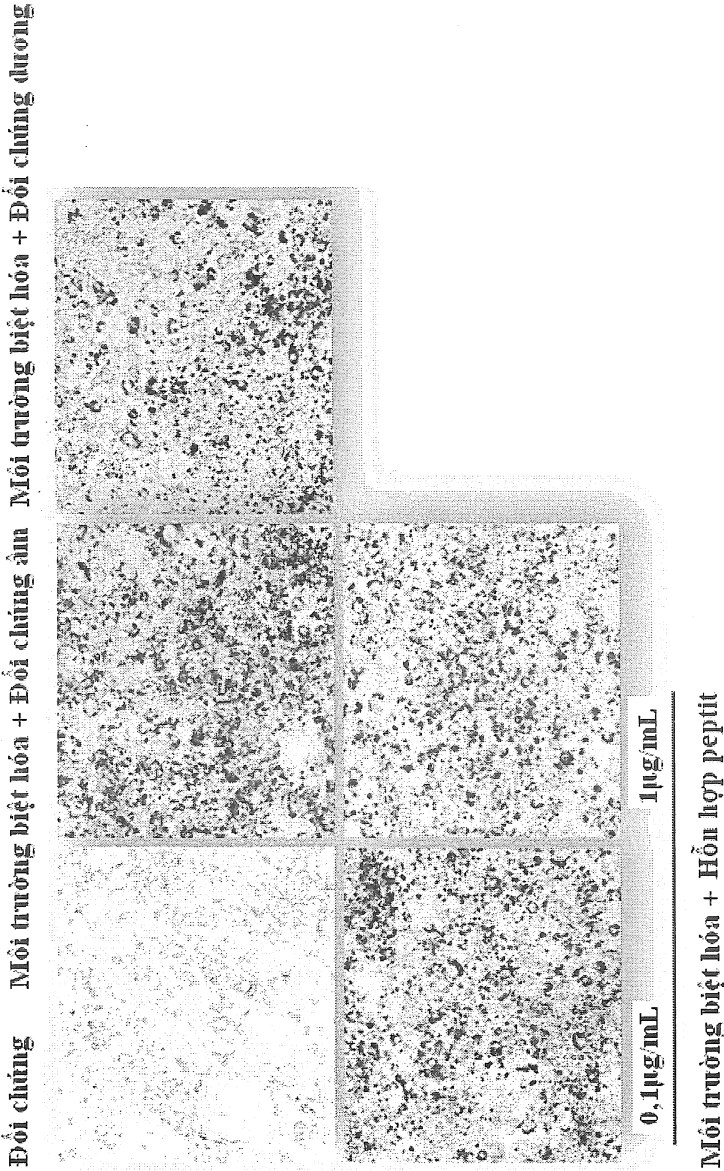
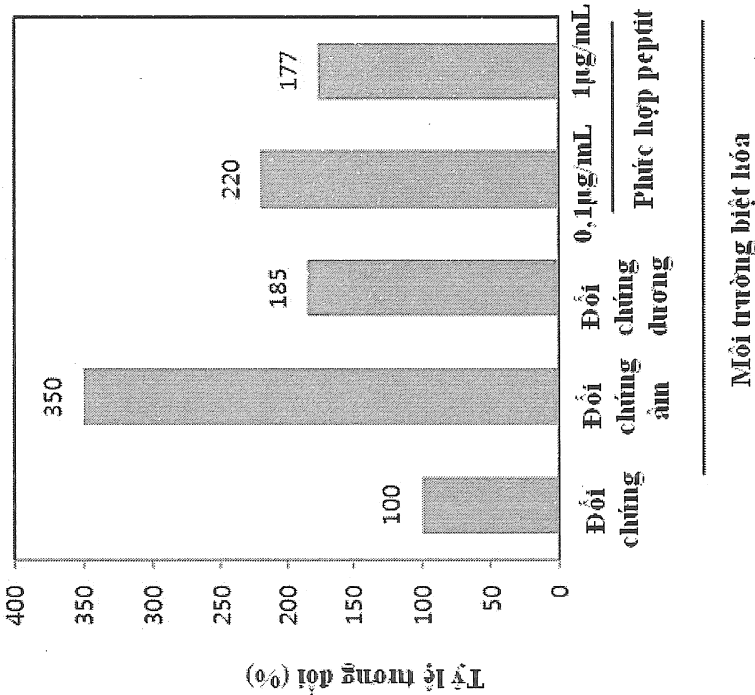


Fig.2



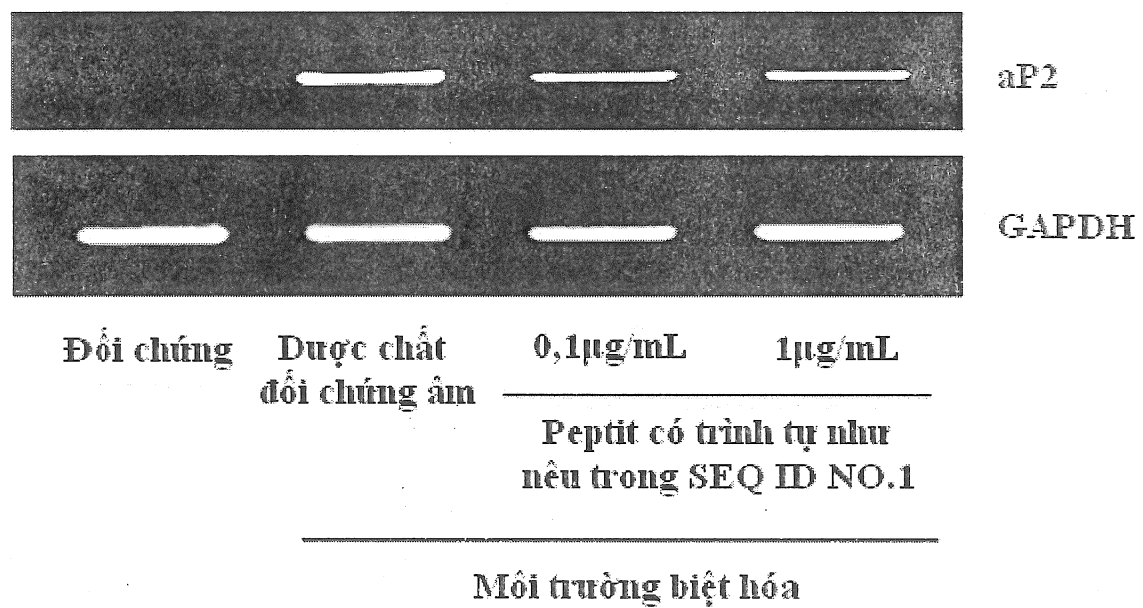
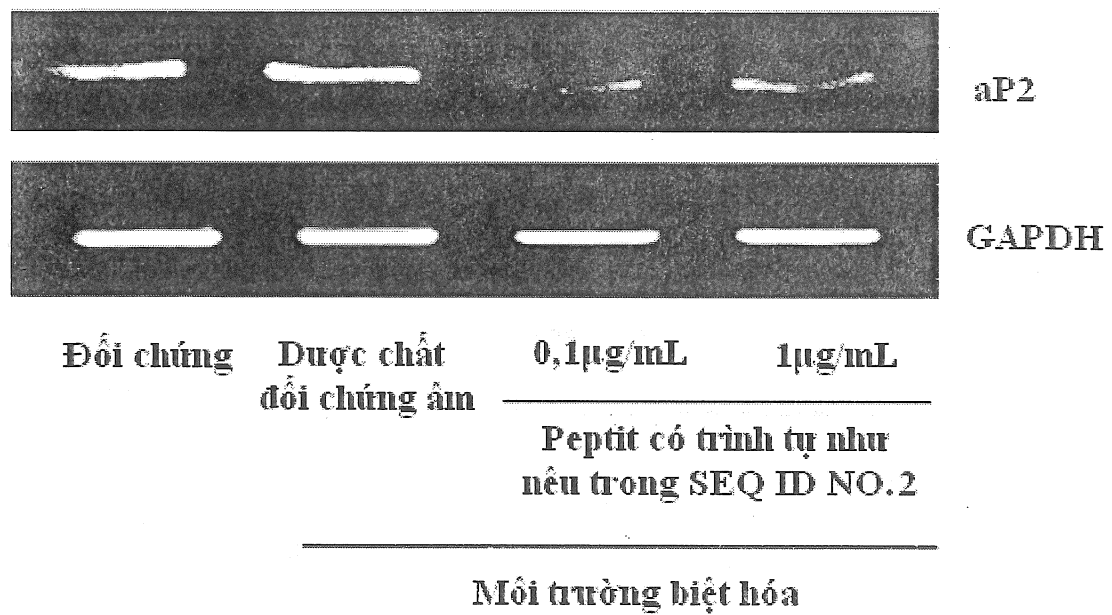
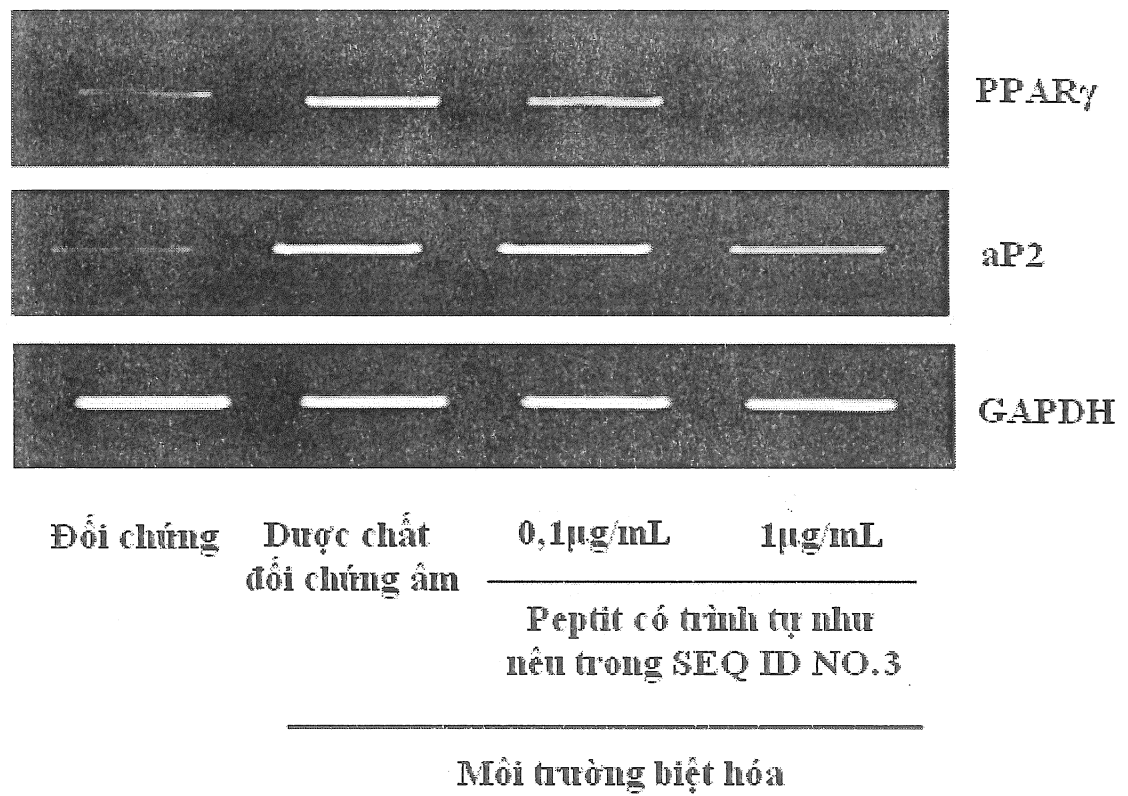
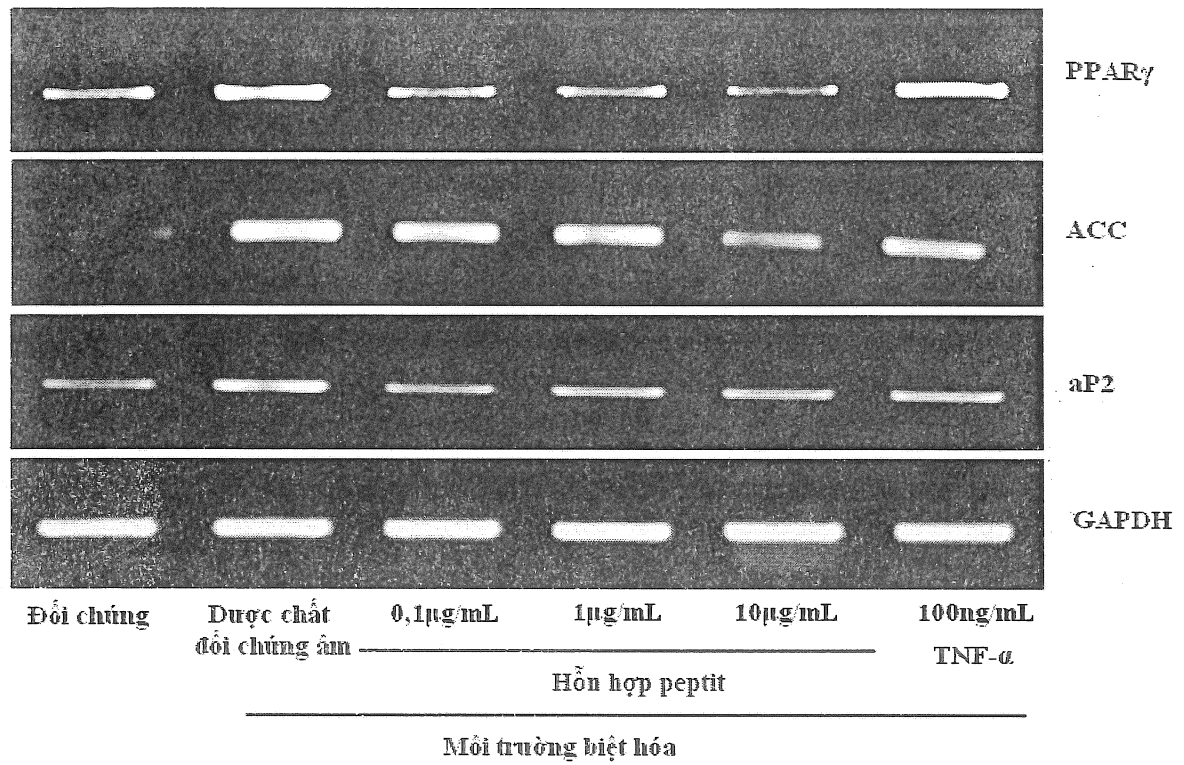


Fig.3A

**Fig.3B**

**Fig.3C**

**Fig.4**

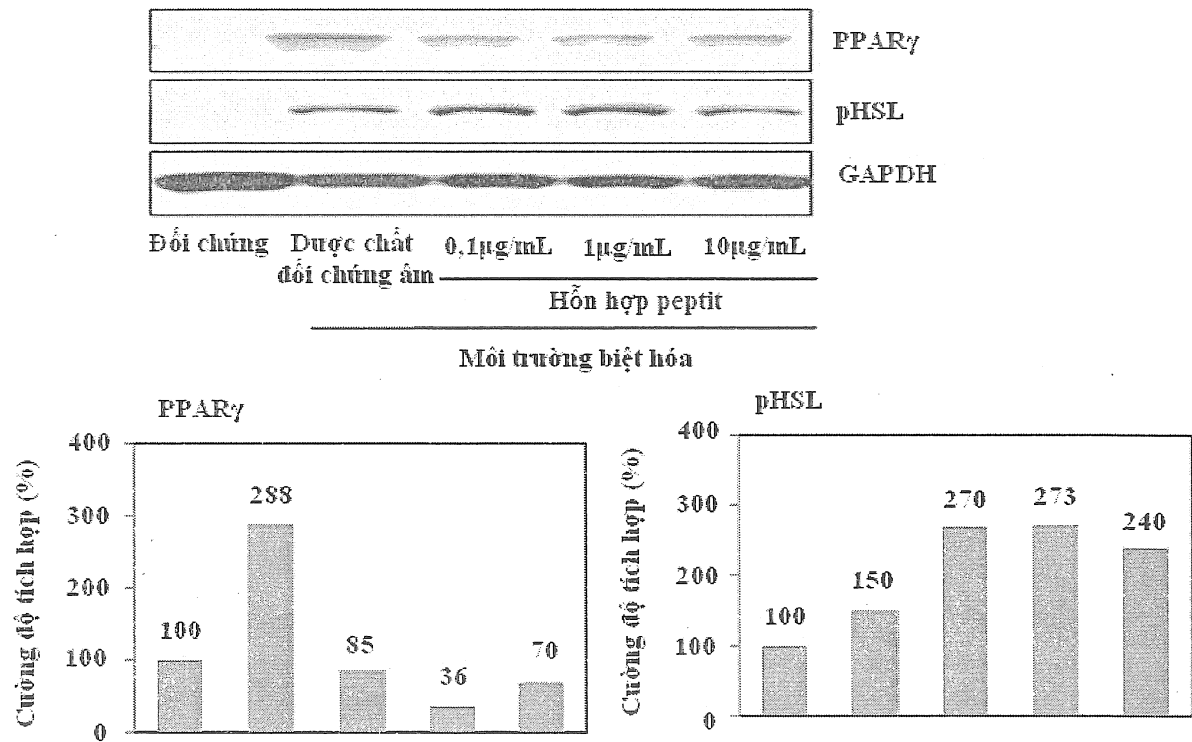
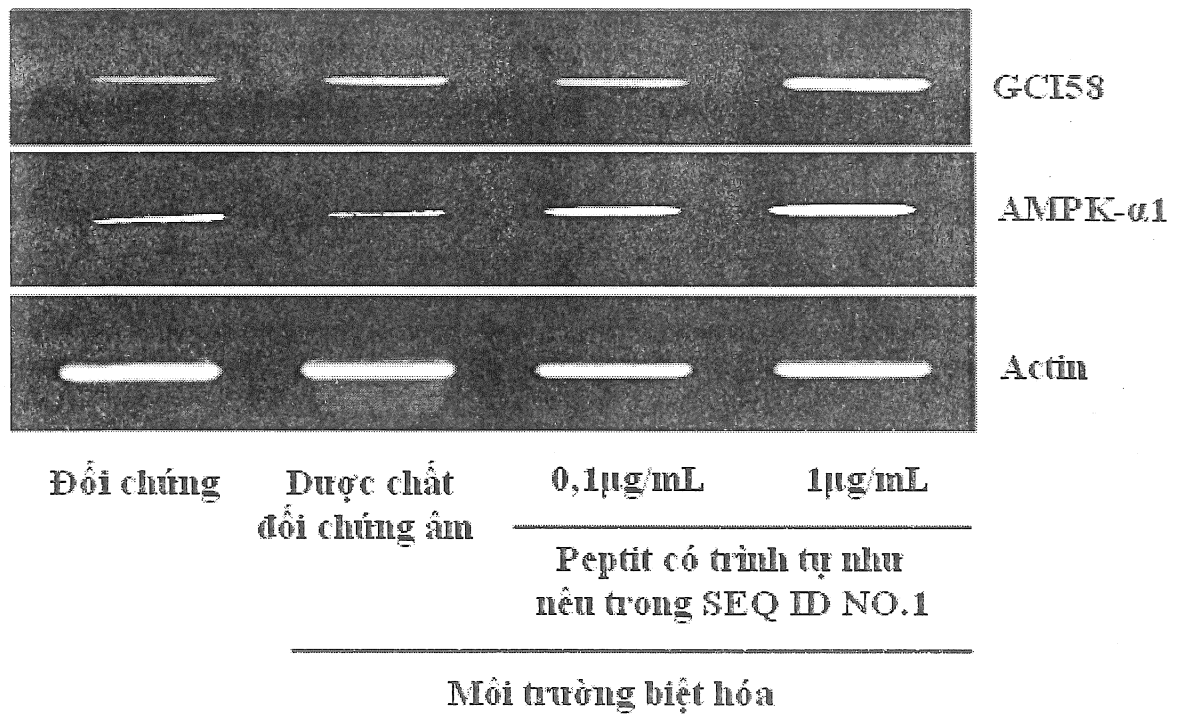
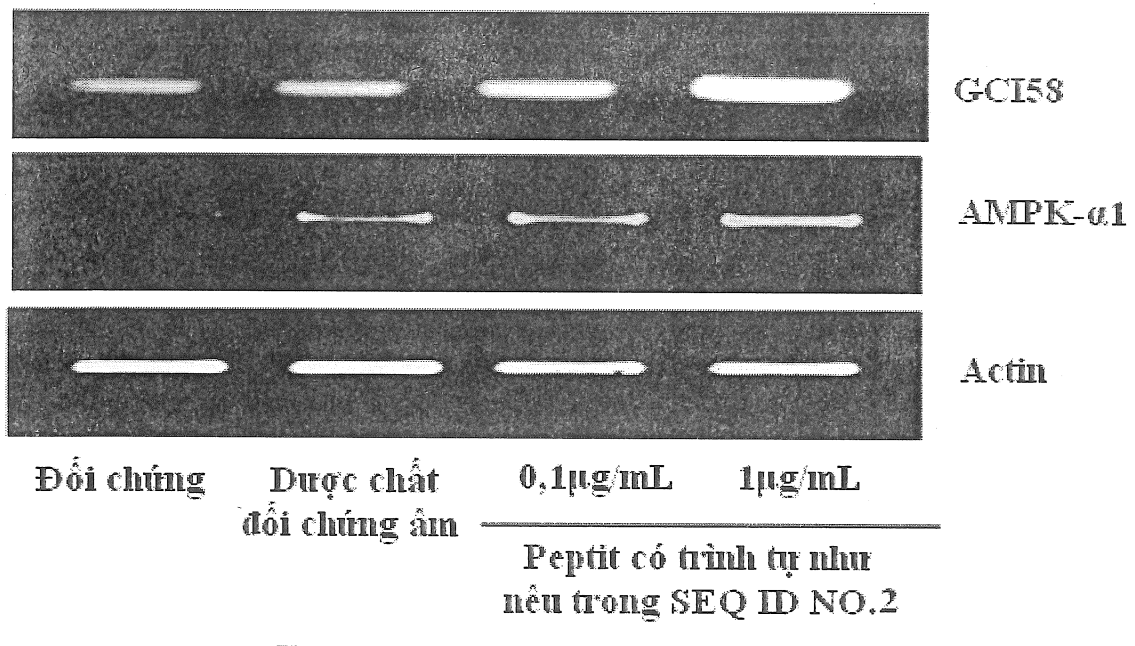


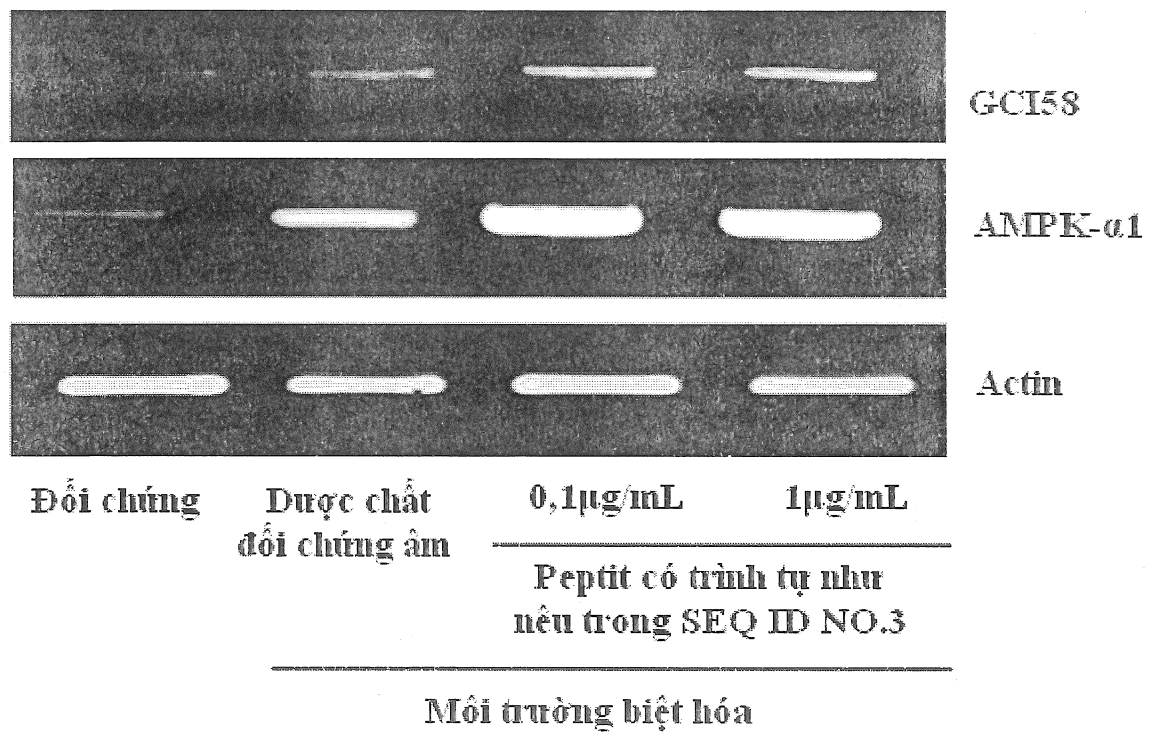
Fig.5

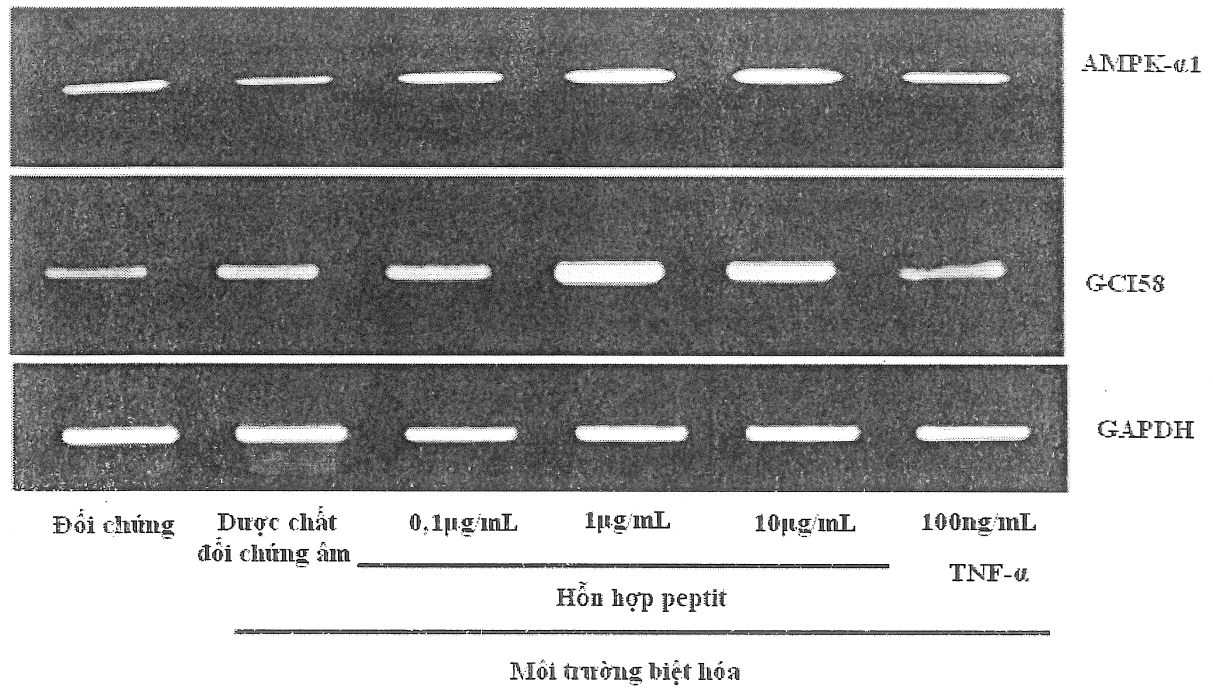
**Fig.6A**

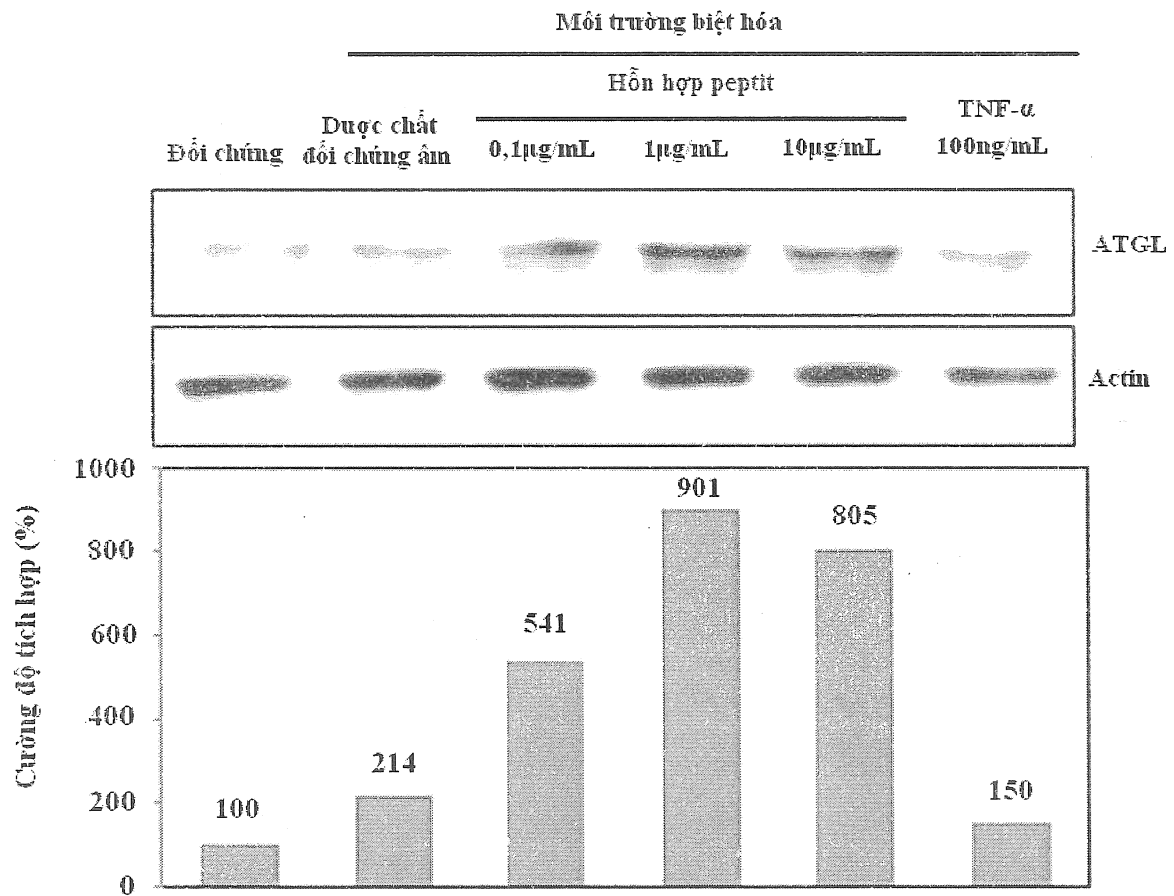


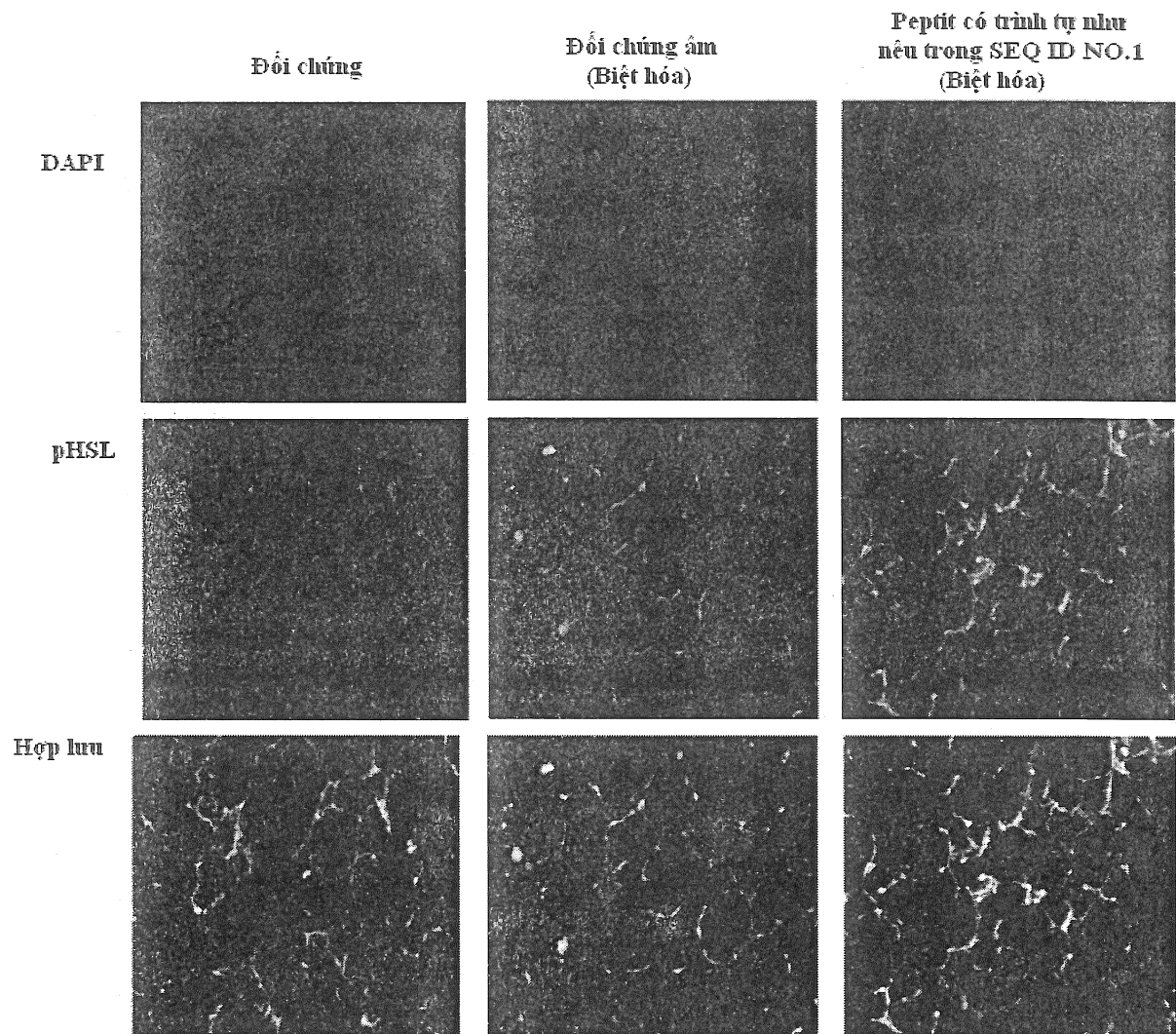
Môi trường biệt hóa

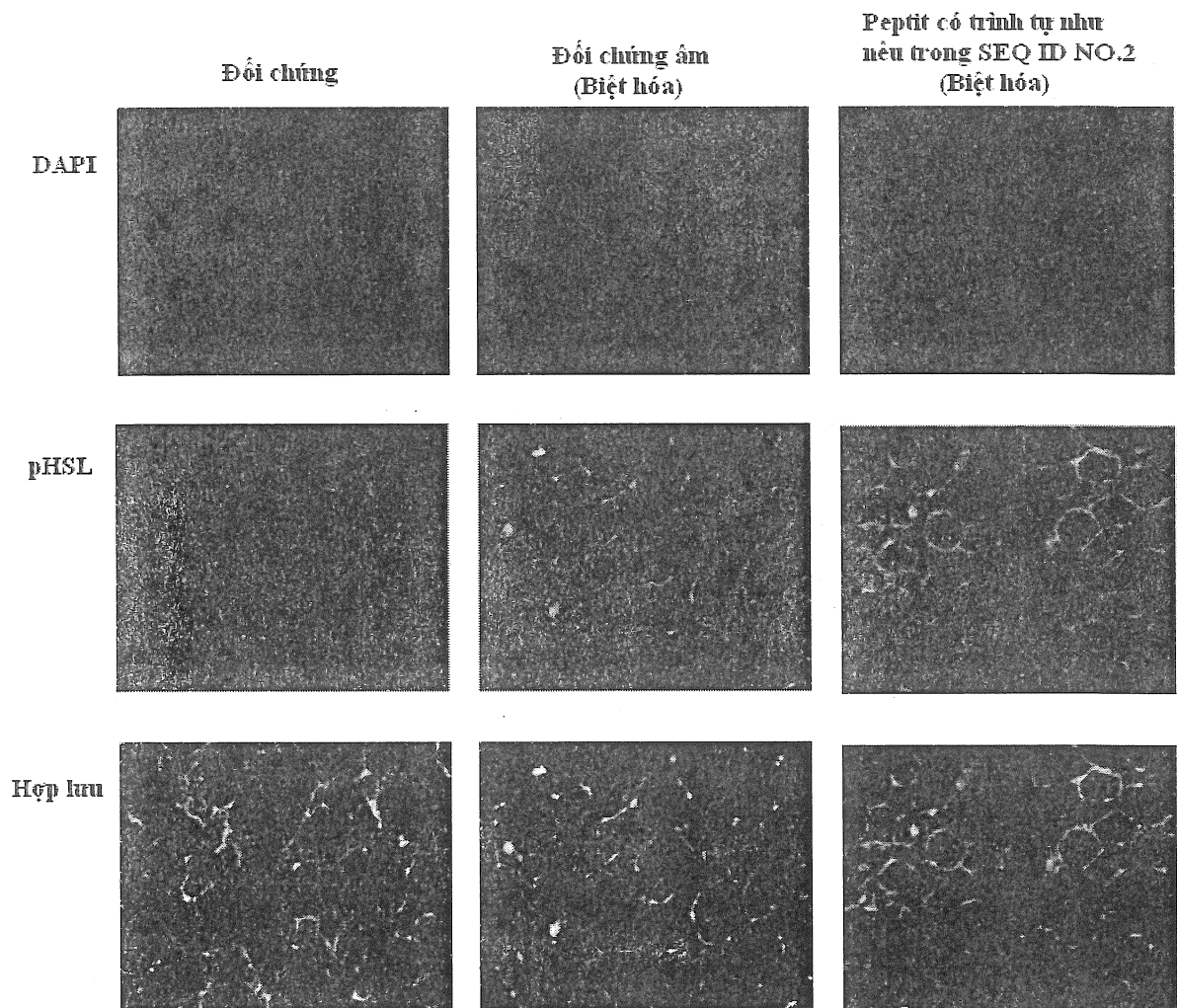
Fig.6B

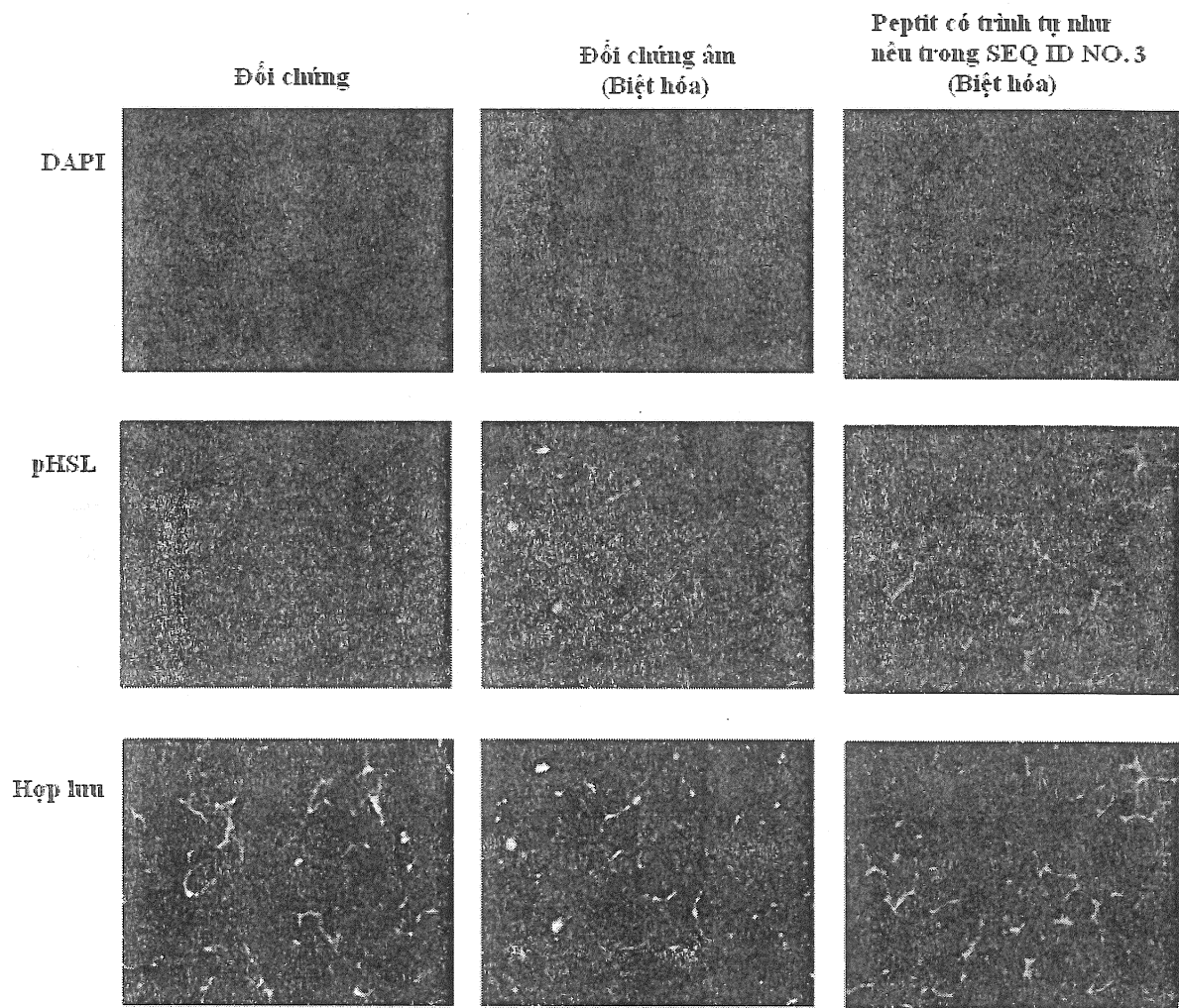
**Fig.6C**

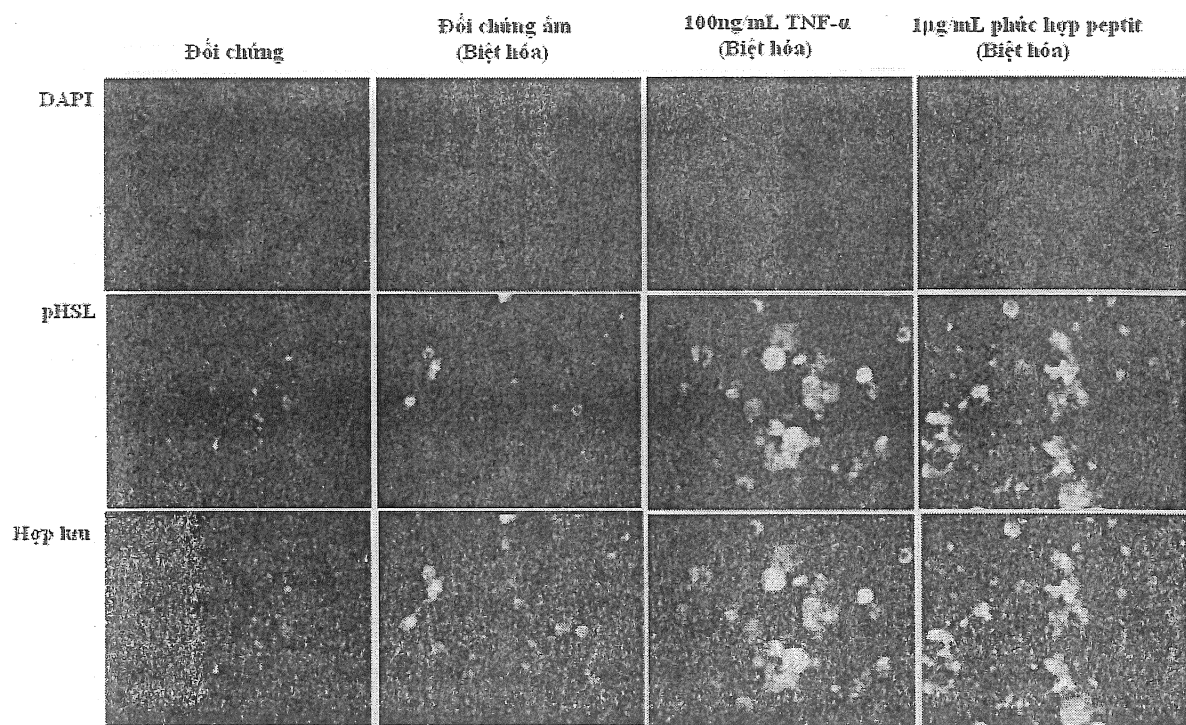
**Fig.6D**

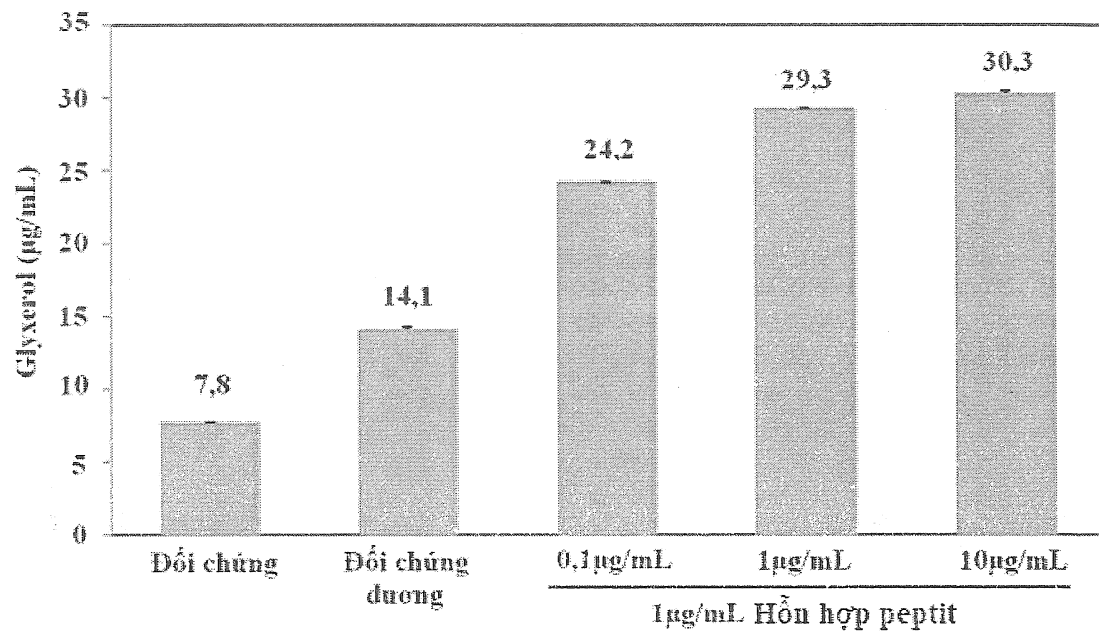
**Fig.7**

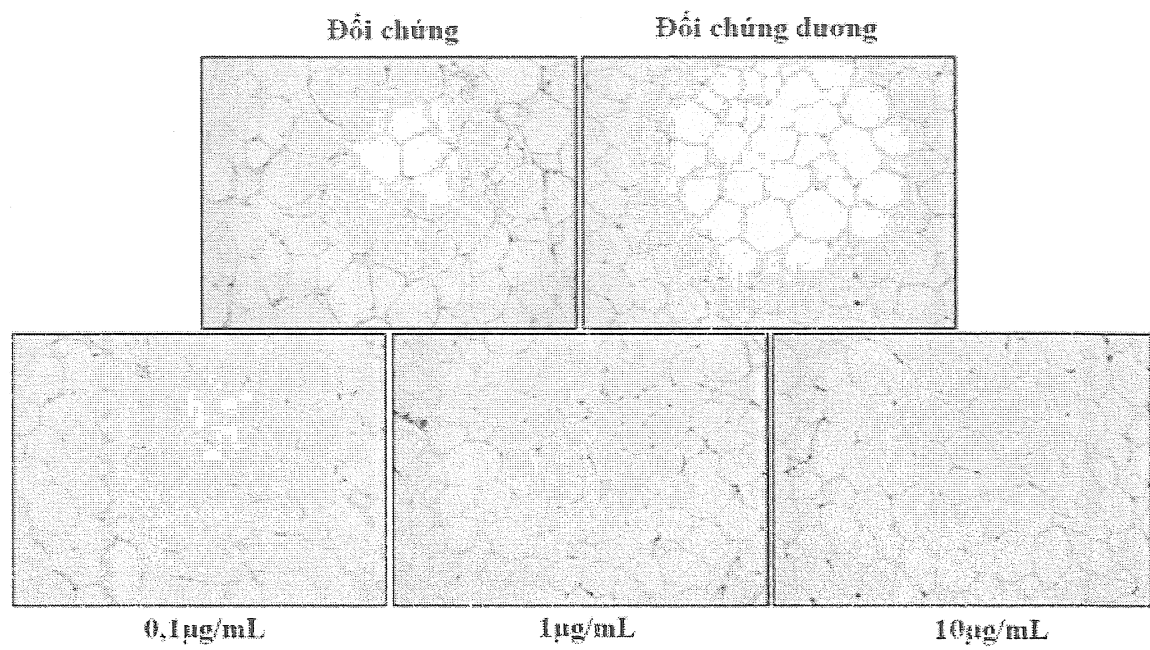
**Fig.8A**

**Fig.8B**

**Fig.8C**

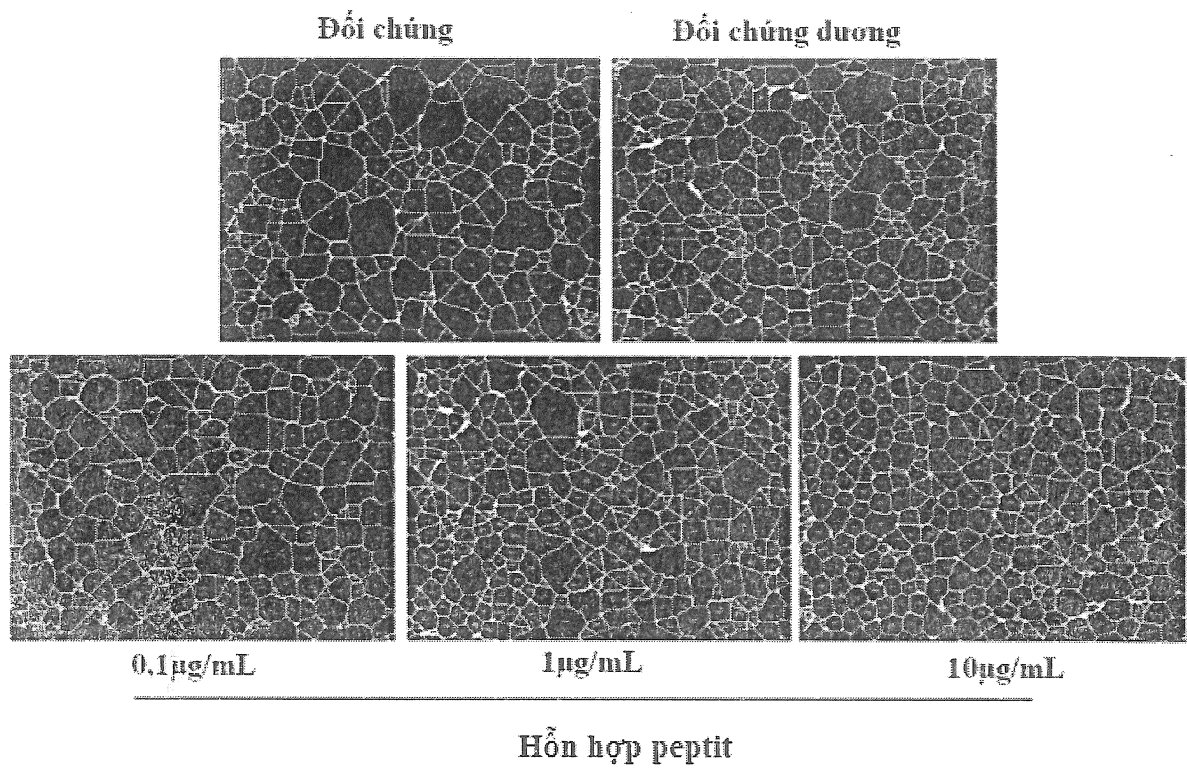
**Fig.8D**

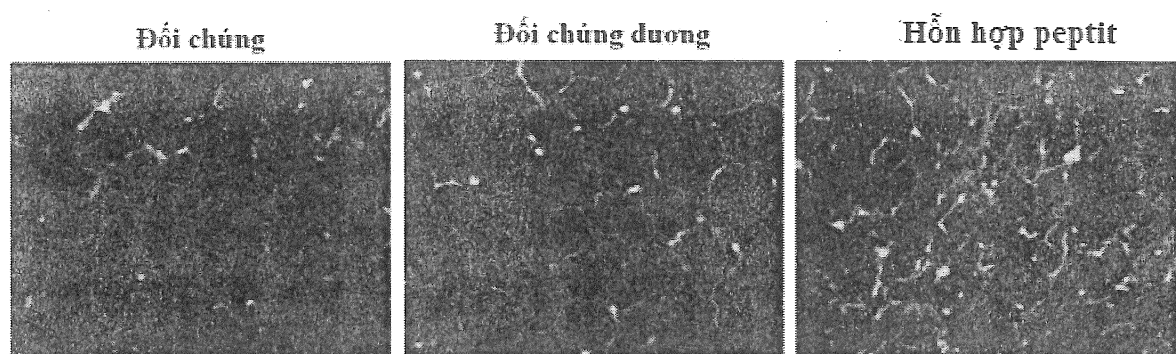
**Fig.9**



Hỗn hợp peptit

Fig.10A

**Fig.10B**

**Fig.11**

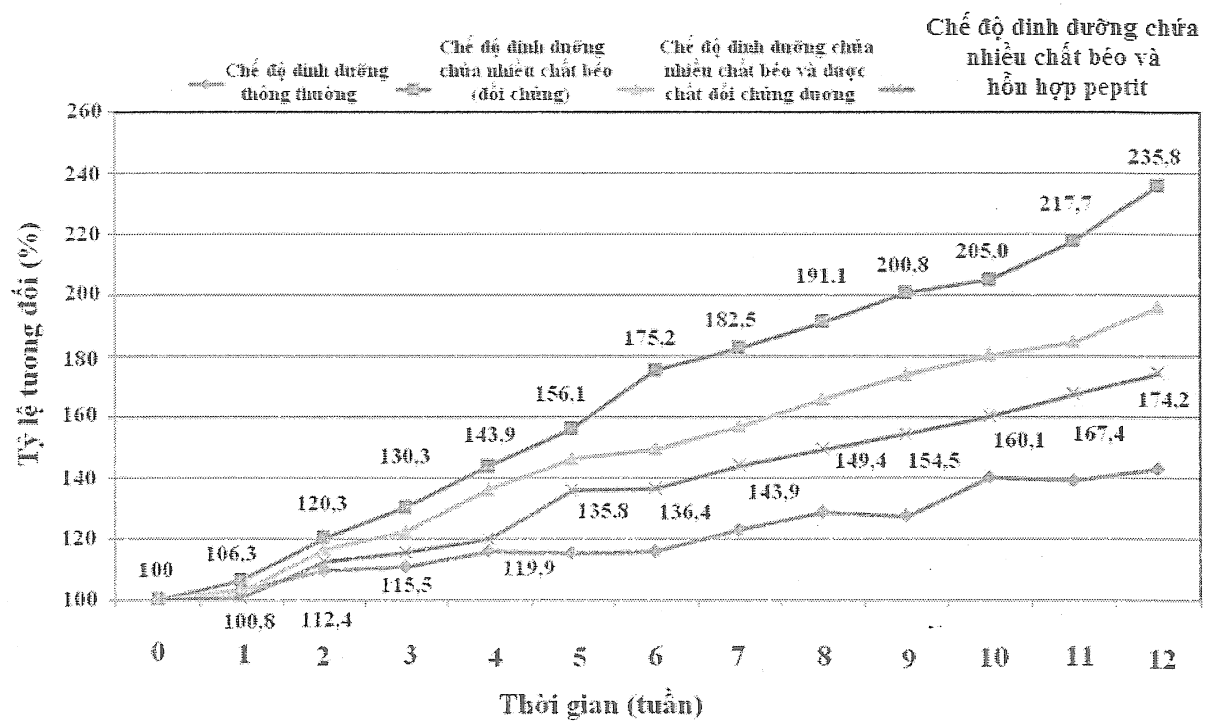
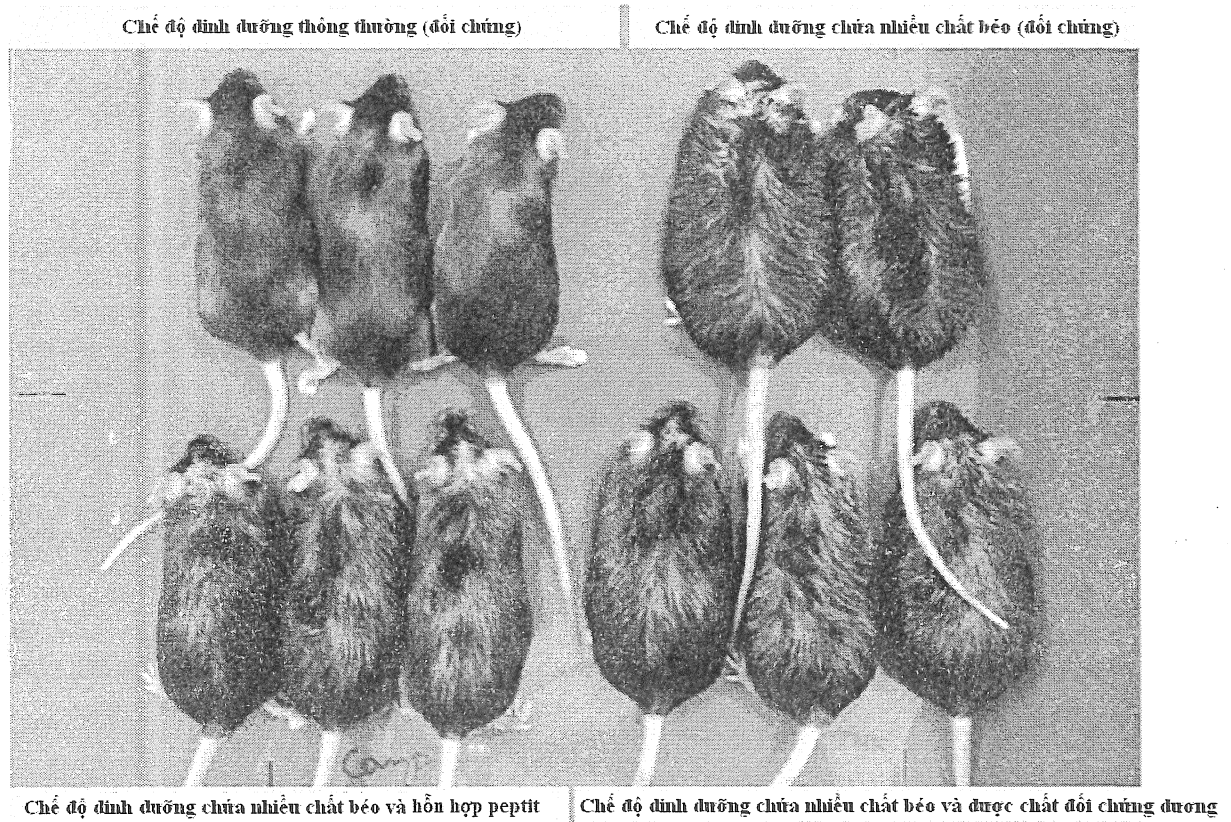


Fig.12

**Fig.13**

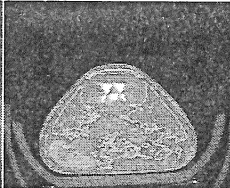
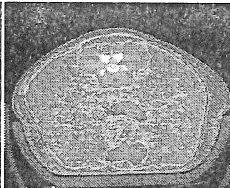
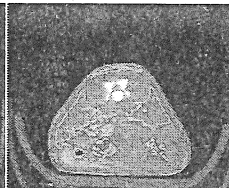
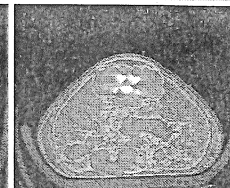
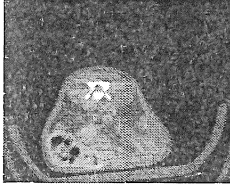
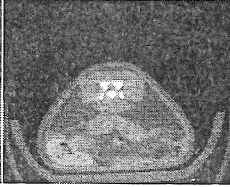
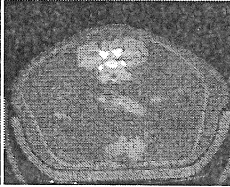
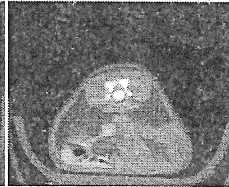
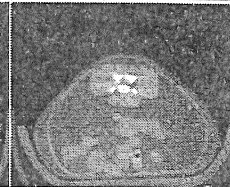
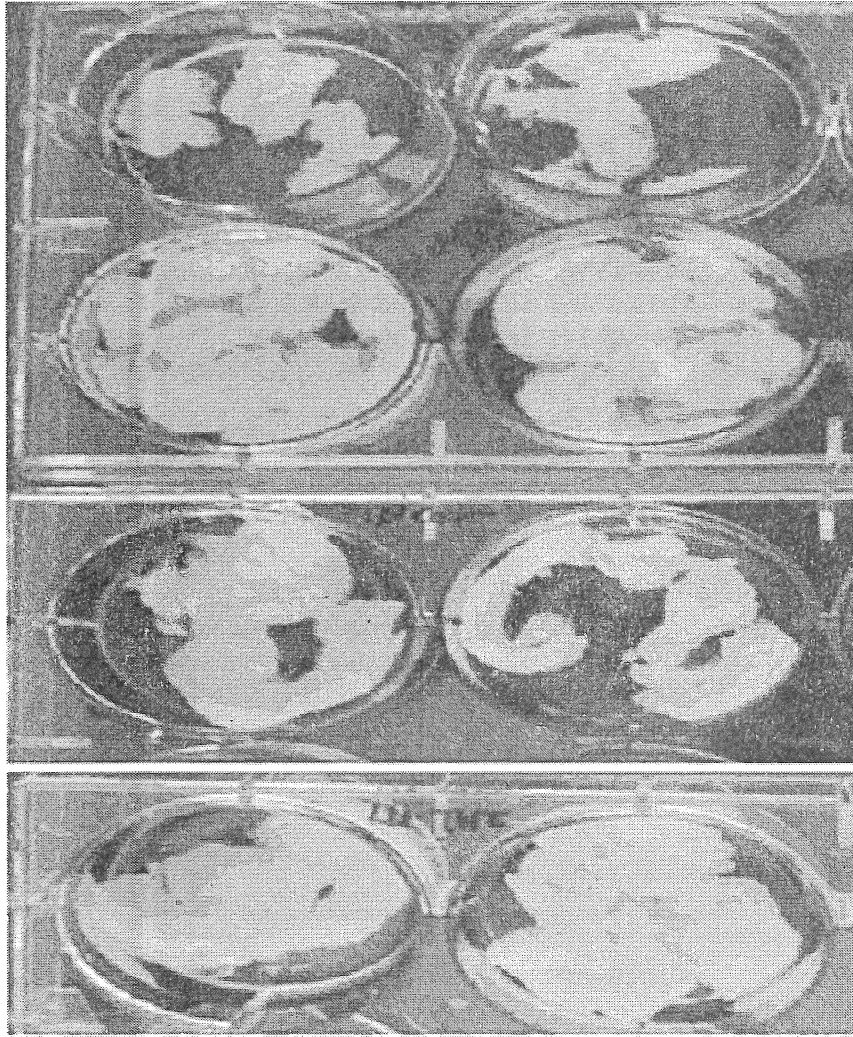
Đối chứng (chế độ dinh dưỡng thông thường)	Chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo (2 tuần)	Chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo (10 tuần)	Chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo (10 tuần) và hỗn hợp peptit (8 tuần)	Chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo (10 tuần) và TNF α (8 tuần)
Mô mỡ: màu vàng				
				
				
	Thể tích tổng số (mm ³)	Chất béo tổng số (mm ³)	Chất béo nội tạng (mm ³)	Chất béo dưới da (mm ³)
Đối chứng (chế độ dinh dưỡng thông thường)	4958,25	702,72	380,09	322,63
Chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo (2 tuần)	6530,09	2084,98	1411,14	673,84
Chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo (10 tuần)	12464,91	8014,03	5821,27	2192,76
Chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo (10 tuần) và phức hợp peptit (8 tuần)	6012,12	1391,75	871,15	520,60
Chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo (10 tuần) và TNF α đối chứng dương (8 tuần)	8240,67	4165,80	2833,72	1332,08

Fig.14



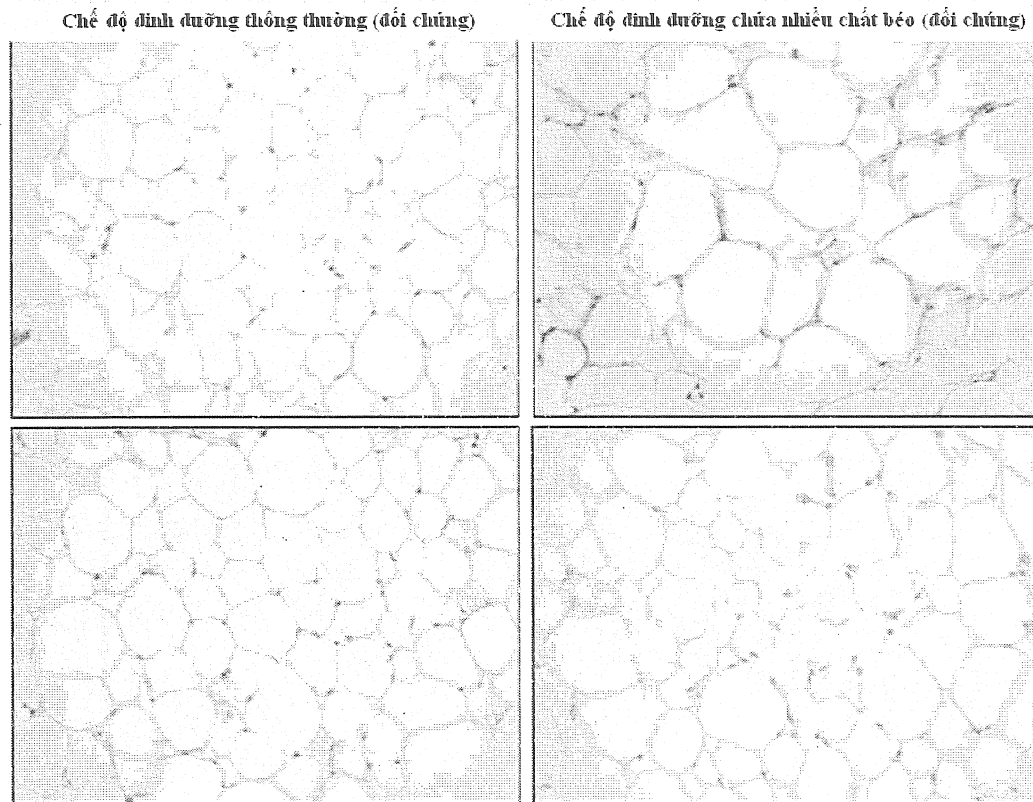
Chế độ dinh dưỡng
thông thường
(đối chứng)

Chế độ dinh dưỡng
chứa nhiều chất béo
(đối chứng)

Chế độ dinh dưỡng
chứa nhiều chất béo
và hỗn hợp peptit

Chế độ dinh dưỡng chứa
nhiều chất béo và được
chất đối chứng dương

Fig.15

**Fig.16A**

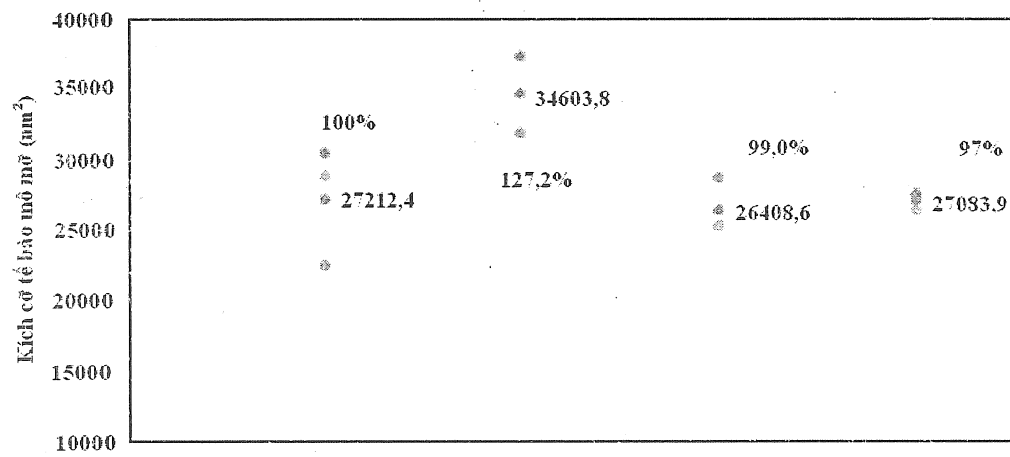
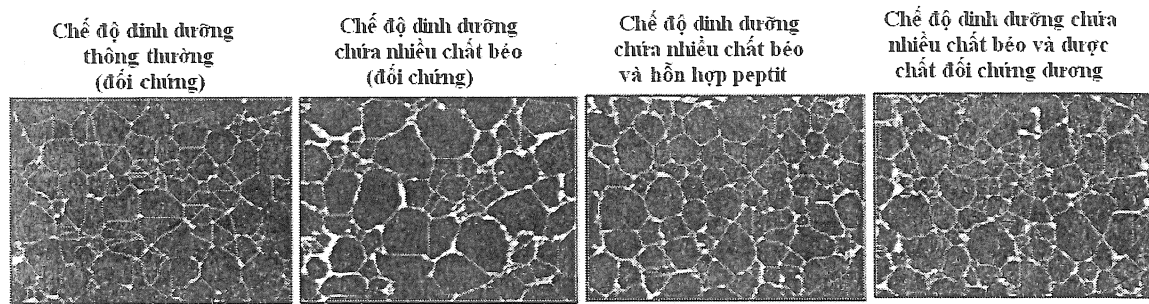
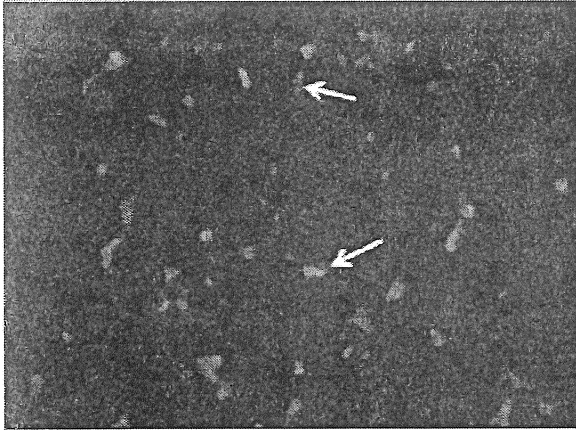
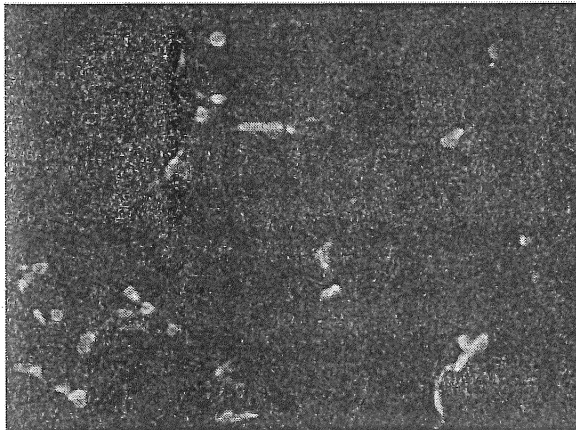
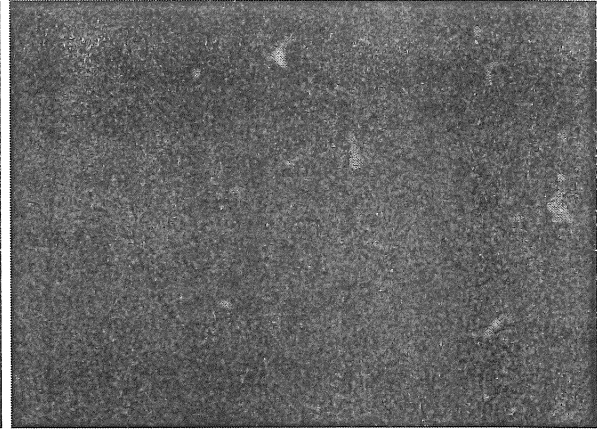
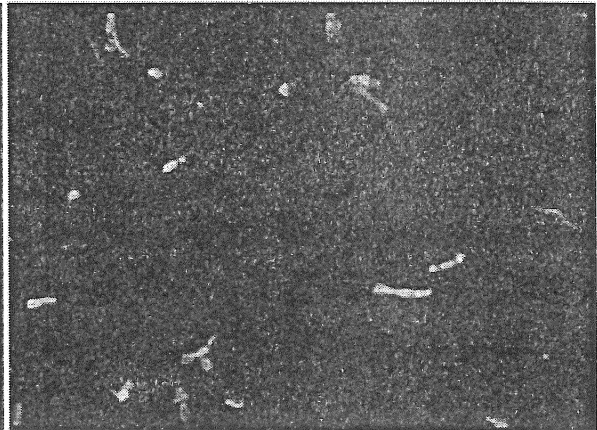


Fig.16B

Chế độ dinh dưỡng thông thường (đối chứng)



Chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo (đối chứng)

Chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo
và hỗn hợp peptitChế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo
và được chất đối chứng dương**Fig.17**

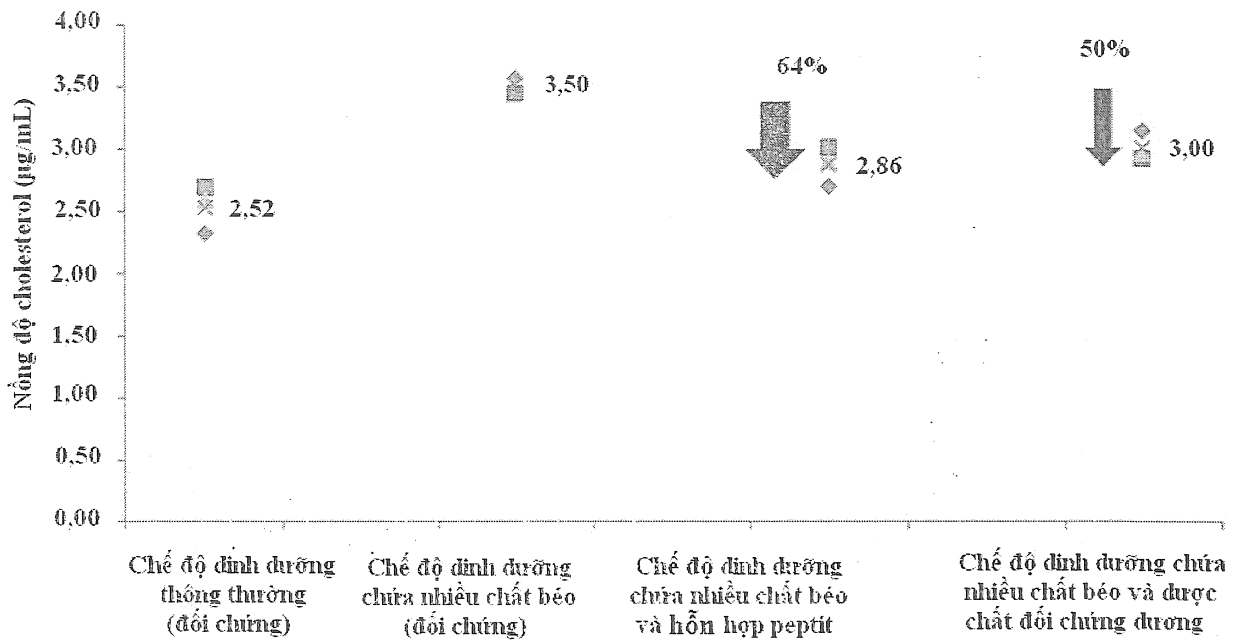
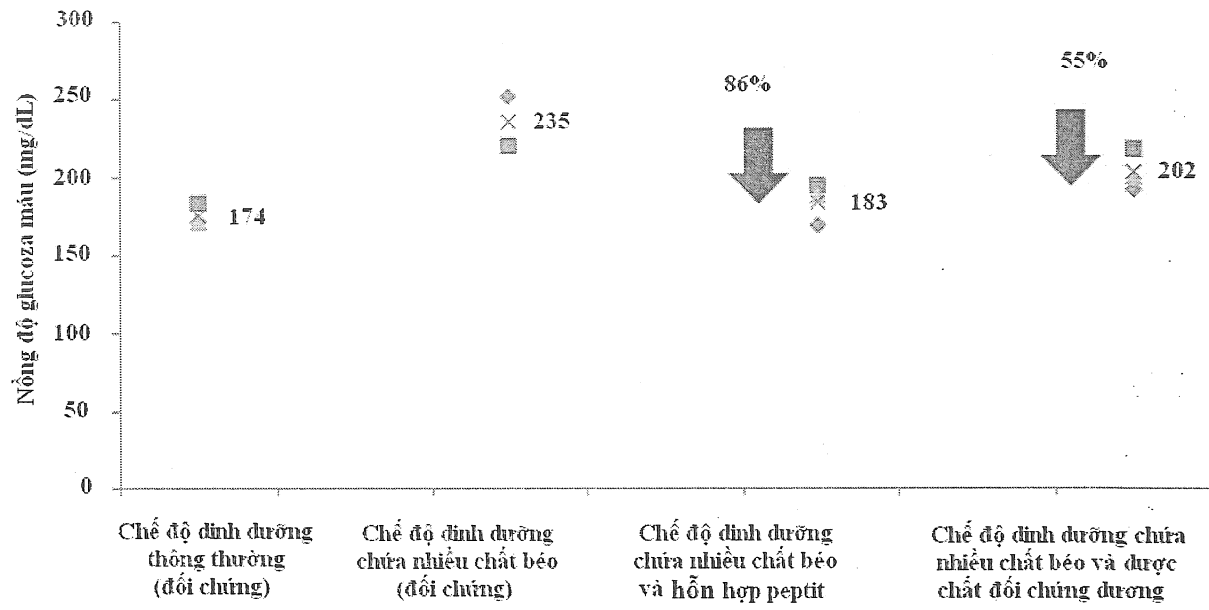


Fig.18

**Fig.19**

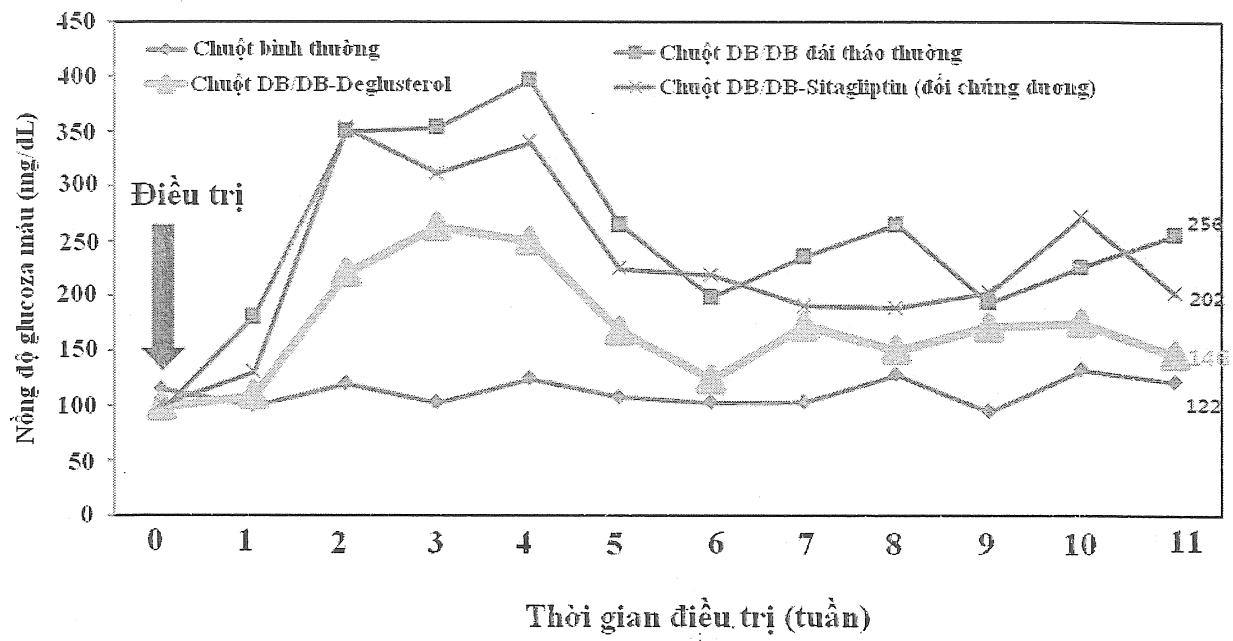


Fig.20A

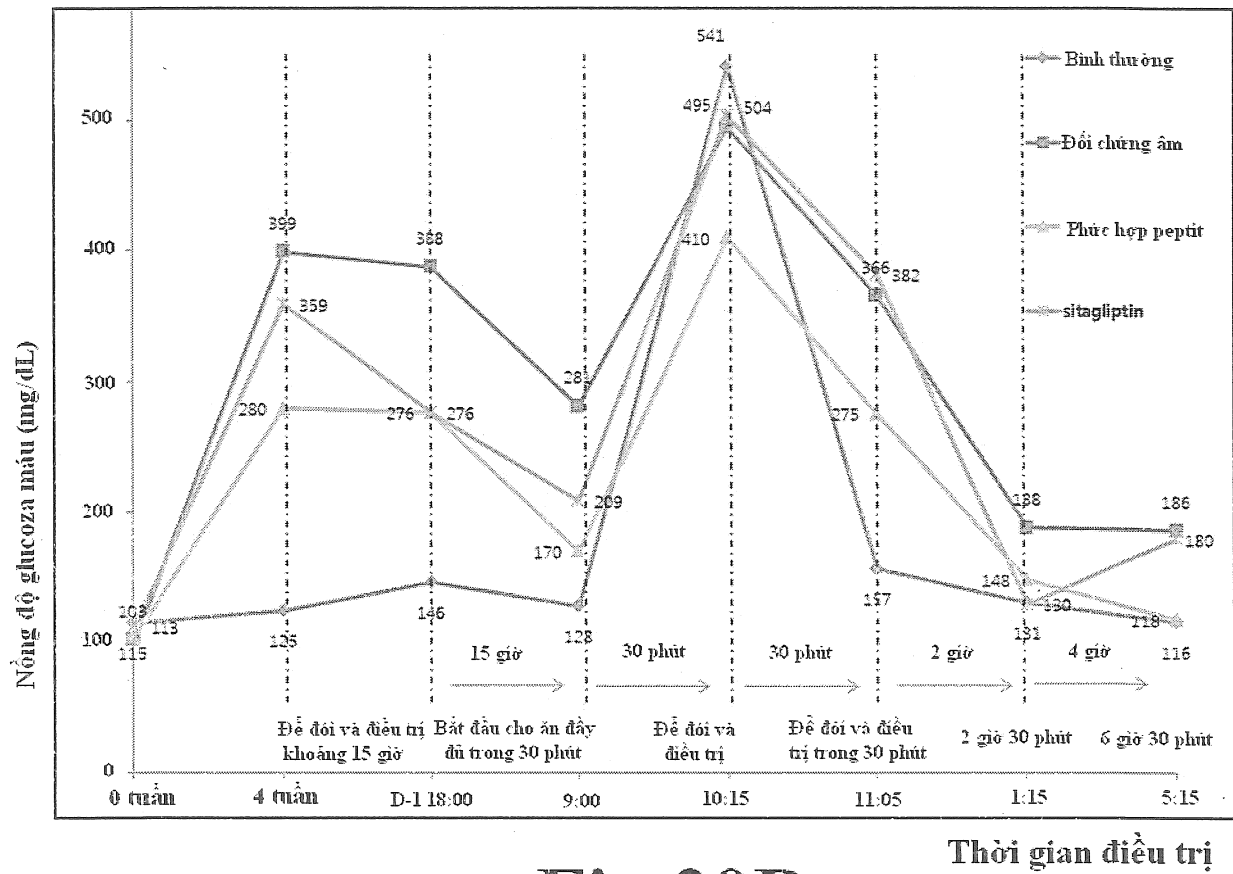
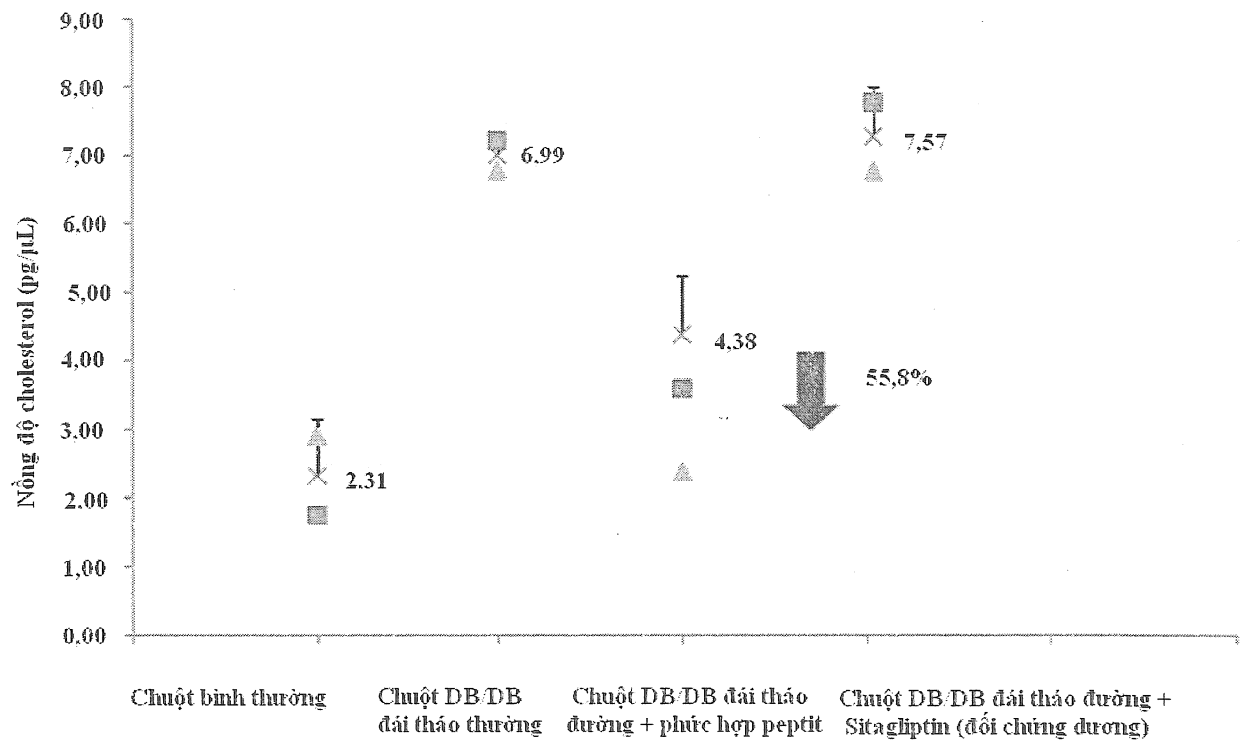


Fig.20B

**Fig.21**

Nồng độ glucosa máu (mg/dL)								
		Nồng độ glucosa máu khi đói	Mức độ hấp thu thức ăn và chế độ dinh dưỡng	30 phút sau ăn	60 phút sau ăn	120 phút sau ăn	240 phút sau ăn	300 phút sau ăn
Chuột bình thường	Chuột bình thường	105		184	181	147	151	135
Chuột đái tháo đường và chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo	PBS	178		227	250	301	247	200
	Peptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1	172		212	225	163	147	145

— Đối chứng — Chuột đái tháo đường + PBS — Chuột đái tháo đường + peptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1

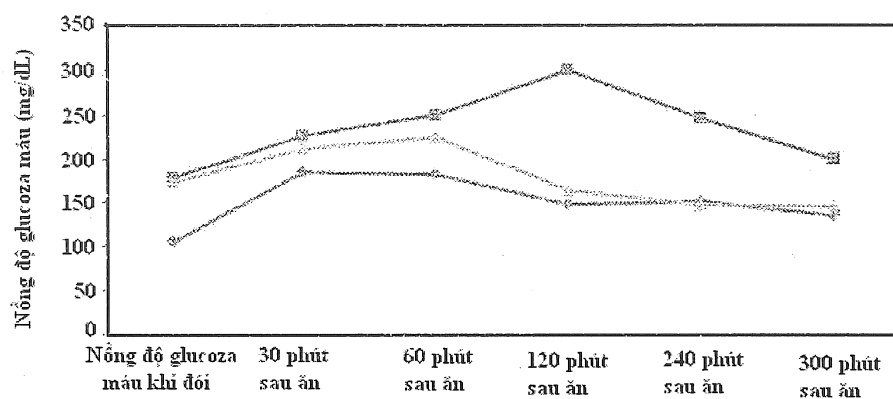


Fig.22A

Nồng độ glucoza máu (mg/dL)								
		Nồng độ glucoza máu khi đói	Mức độ hấp thu thức ăn và chế độ dinh dưỡng	30 phút sau ăn	60 phút sau ăn	120 phút sau ăn	240 phút sau ăn	300 phút sau ăn
Chuột bình thường	Chuột bình thường	105		184	181	147	151	135
Chuột đái tháo đường và chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo	PBS	178		227	250	301	247	200
	Peptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2	181		219	231	174	158	152

— Đối chứng — Chuột đái tháo đường + PBS — Chuột đái tháo đường + peptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2

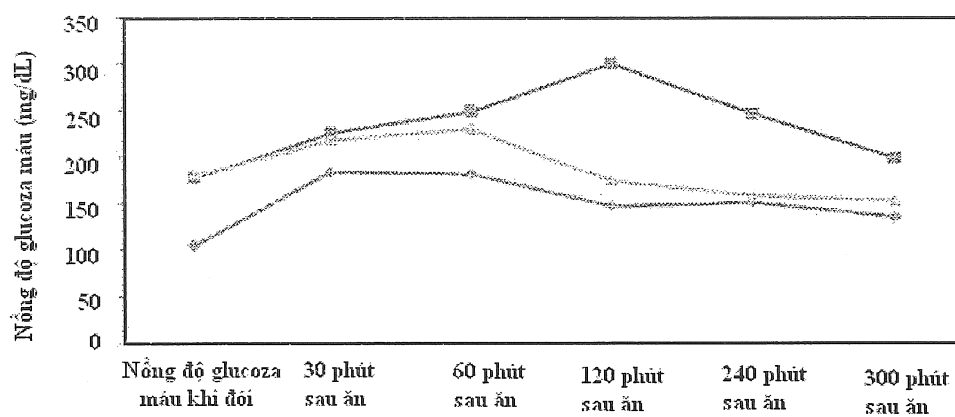


Fig.22B

Nồng độ glucoza máu (mg/dL)								
		Nồng độ glucoza máu khi đói	Mức độ hấp thu thức ăn và chế độ dinh dưỡng	30 phút sau ăn	60 phút sau ăn	120 phút sau ăn	240 phút sau ăn	300 phút sau ăn
Chuột bình thường	Chuột bình thường	105		184	181	147	151	135
Chuột đái tháo đường và chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo	PBS	178		227	250	301	247	200
	Peptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3	165		220	231	198	172	166

Đối chứng Chuột đái tháo đường + PBS Chuột đái tháo đường + peptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3

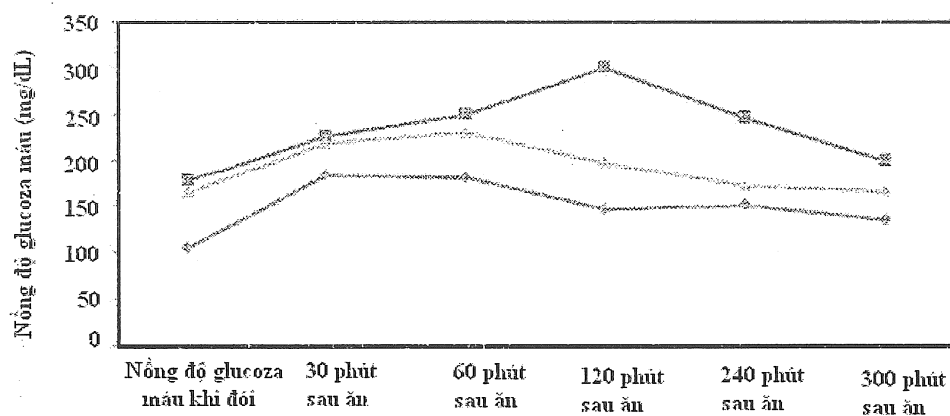


Fig.22C

Peptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4

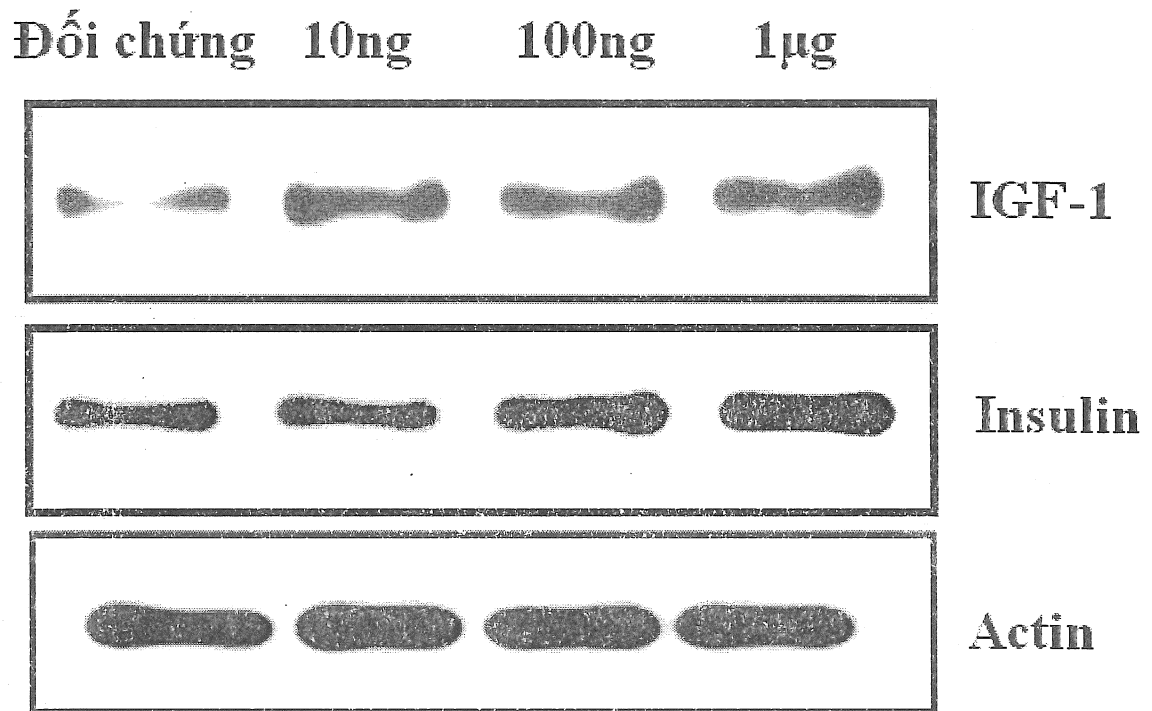


Fig.23

Nồng độ glucoza máu (mg/dL)								
		Nồng độ glucoza máu khi đói	Mức độ hấp thu thức ăn và chế độ dinh dưỡng	30 phút sau ăn	60 phút sau ăn	120 phút sau ăn	240 phút sau ăn	300 phút sau ăn
Chuột bình thường	Chuột bình thường	105		184	181	147	151	135
Chuột đái tháo đường và chế độ dinh dưỡng chứa nhiều chất béo	PBS	178		227	250	301	247	200
	Peptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4	185		219	223	171	169	163

—●— Đối chứng —■— Chuột đái tháo đường + PBS —▲— Chuột đái tháo đường + peptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4

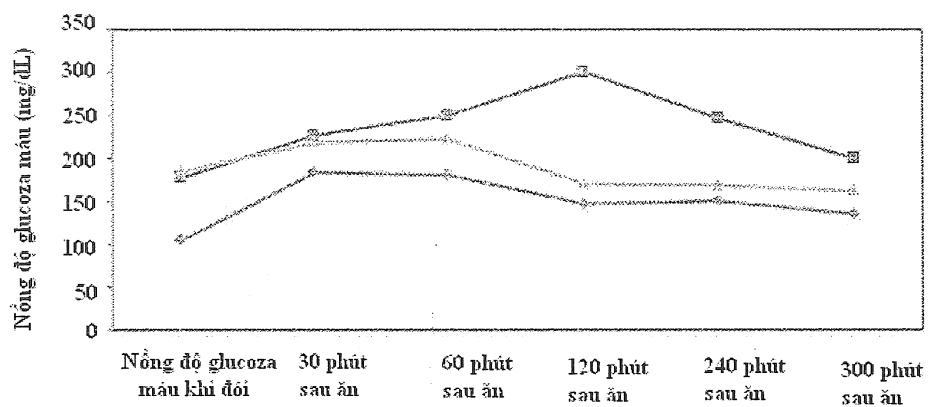


Fig.24

Tuổi: 59
Bệnh đái tháo đường típ 2 ở người
Phác đồ điều trị: một lần mỗi ngày

Phức hợp peptit

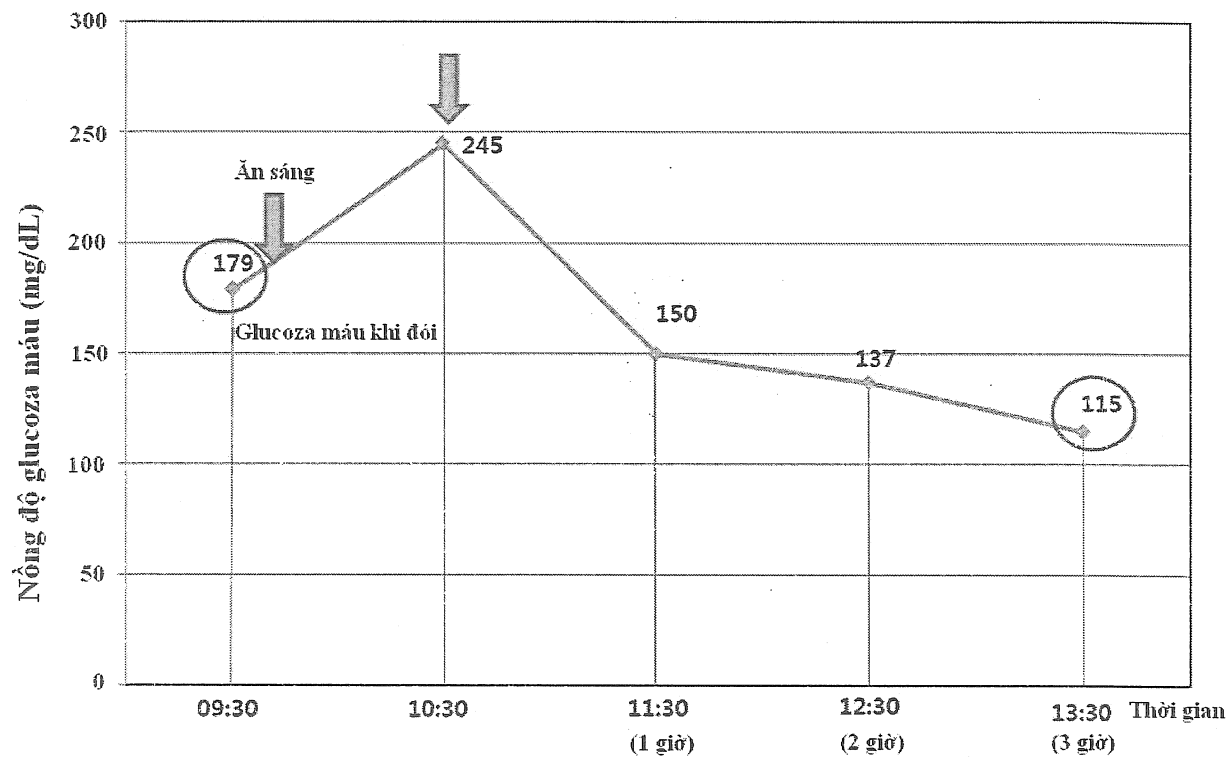


Fig.25A

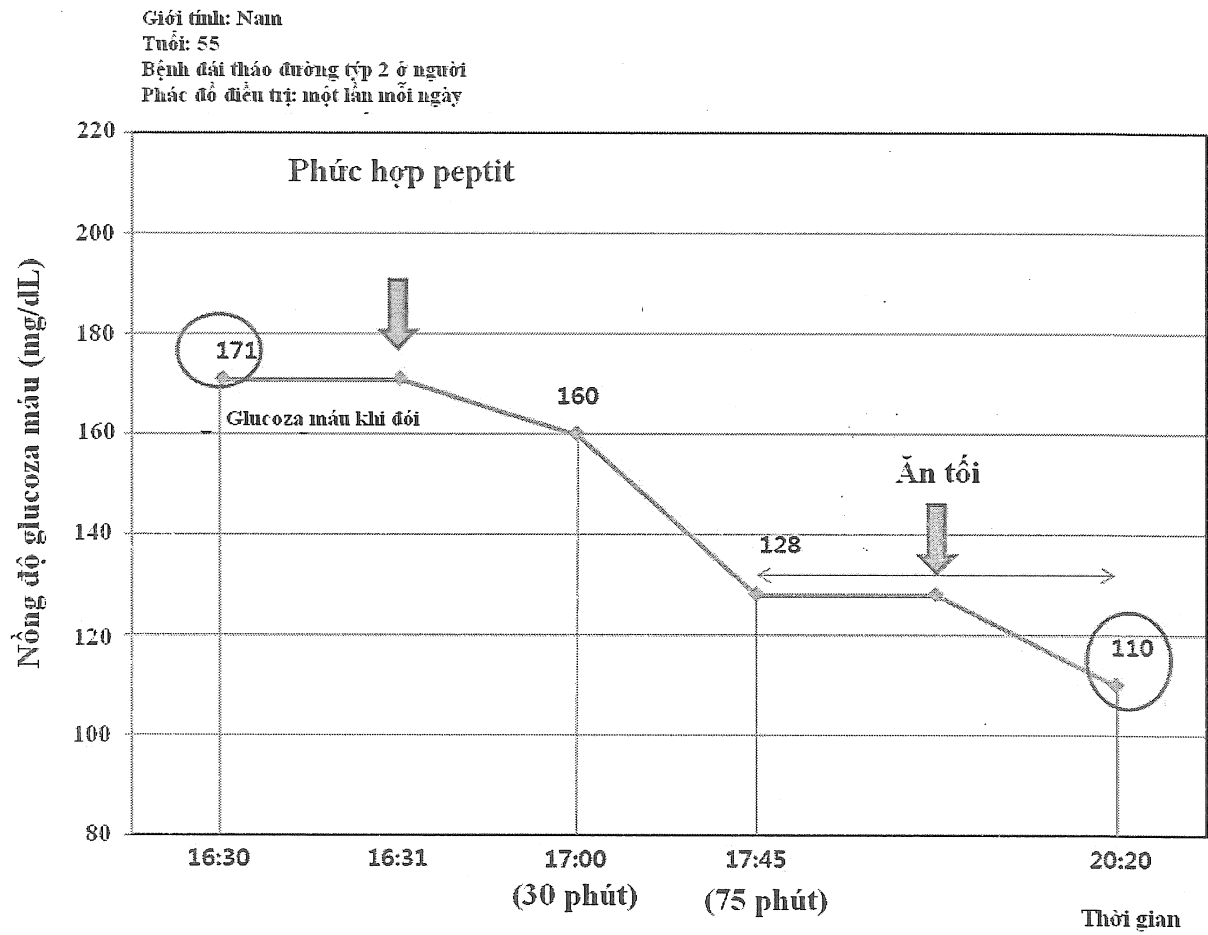


Fig.25B

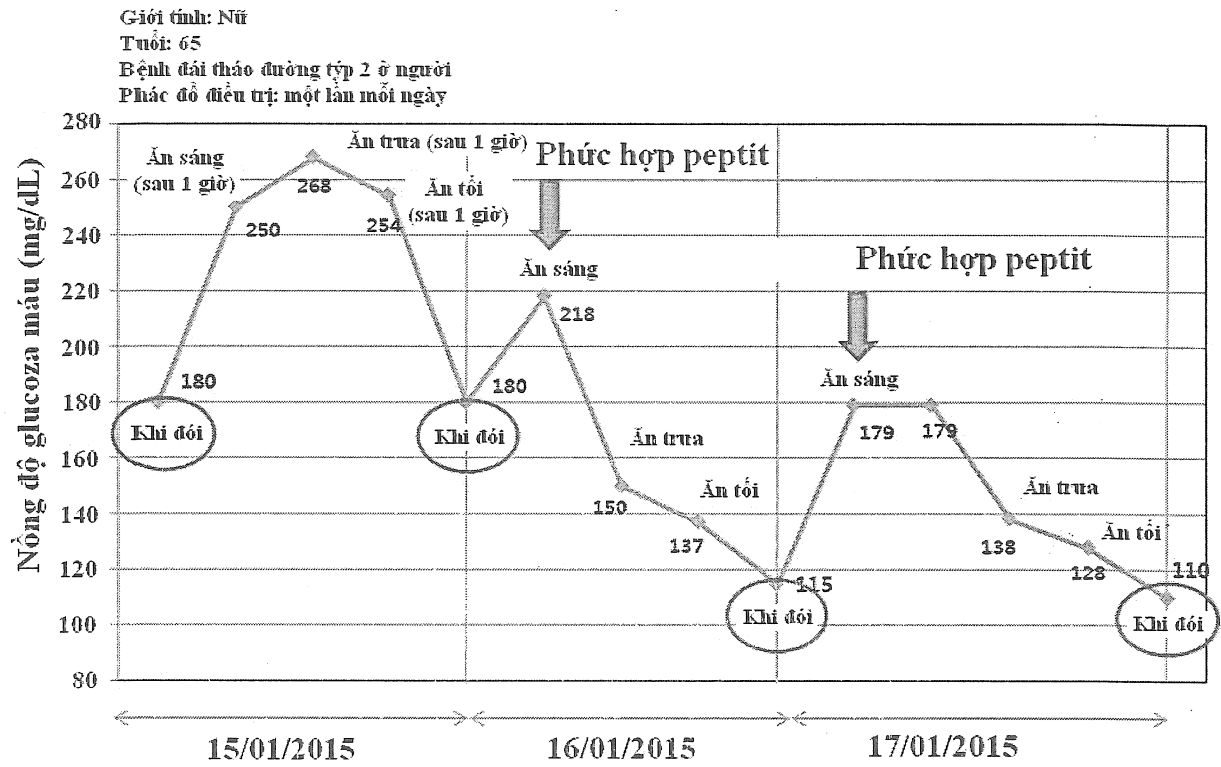


Fig.25C

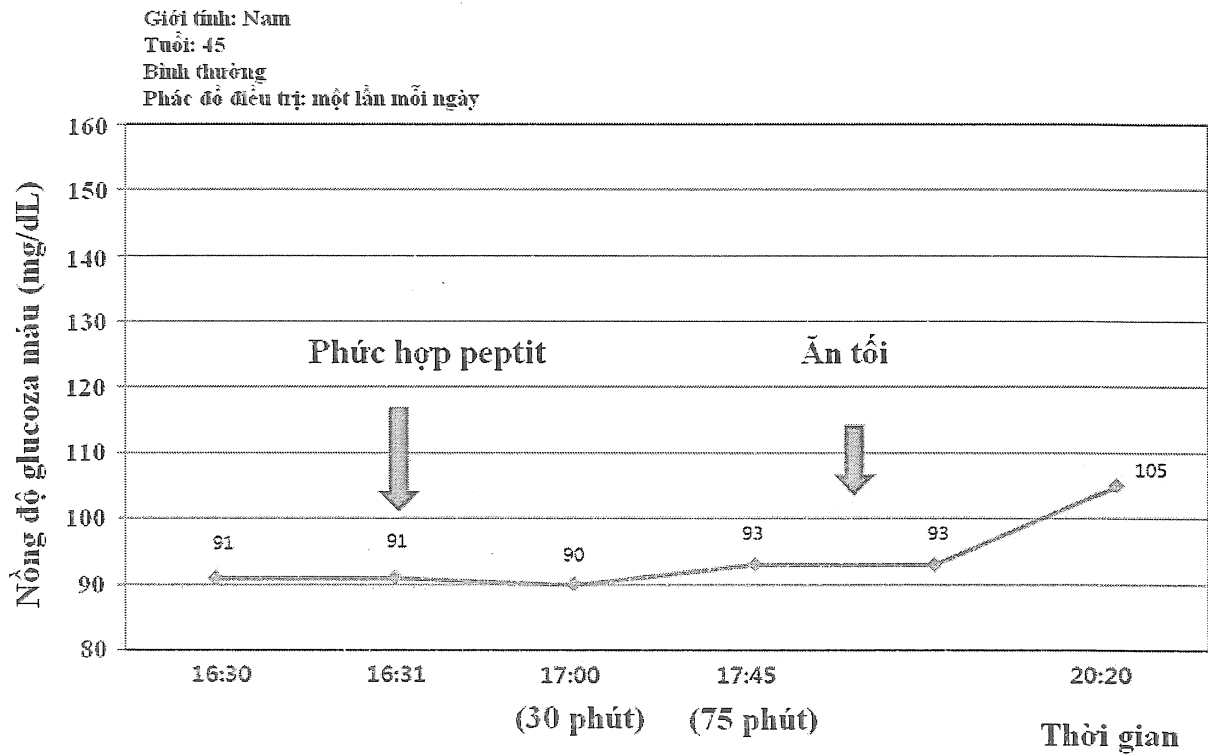


Fig.25D

DANH MỤC TRÌNH TỰ

```

<110> CAREGEN CO., LTD.
<120> PEPTIT CÓ HOẠT TÍNH CHỐNG BÉO PHÌ HOẶC ĐÁI THÁO ĐƯỜNG VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PEPTIT NÀY
<130> 2017OPA9781
<160> 17
<170> KopatentIn 2,0
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit 1
<400> 1
Leu Lys Thr Arg Asn
1 5
<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit 2
<400> 2
Lys Gly Ala Cys Thr Gly Trp Met Ala
1 5
<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit 3
<400> 3
Lys Gly Ala Ser Thr Gly Trp Met Ala
1 5
<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit 4
<400> 4
Ala Cys Tyr Leu Pro His Pro Trp Phe Cys
1 5 10
<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit 5
<400> 5
Ala Ser Tyr Leu Pro His Pro Trp Phe Ser
1 5 10
<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit 6
<400> 6
Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys
1 5 10
<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit 7
<400> 7
Ser Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Ser
1 5 10
<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> PPARγ F

```

```

<400>      8
ttttcaaggg tgccagtttc                                20
<210>      9
<211>     20
<212>     ADN
<213>     Trình tự nhân tạo
<220>
<223>     PPAR $\gamma$  R
<400>      9
aatccttggc cctctgagat                                20
<210>     10
<211>     24
<212>     ADN
<213>     Trình tự nhân tạo
<220>
<223>     ACC F
<400>     10
accttactgc catcccatgt gcta                            24
<210>     11
<211>     24
<212>     ADN
<213>     Trình tự nhân tạo
<220>
<223>     ACC R
<400>     11
gtgcctgatg atcgacagaa caaa                            24
<210>     12
<211>     20
<212>     ADN
<213>     Trình tự nhân tạo
<220>
<223>     aP2 F
<400>     12
catcagcgta aatggggatt                                20
<210>     13
<211>     20
<212>     ADN
<213>     Trình tự nhân tạo
<220>
<223>     aP2 R
<400>     13
acacattcca ccaccagctt                                20
<210>     14
<211>     24
<212>     ADN
<213>     Trình tự nhân tạo
<220>
<223>     AMPK- $\alpha$ 1 F
<400>     14
tgaccggaca taaagtggct gtga                            24
<210>     15
<211>     24
<212>     ADN
<213>     Trình tự nhân tạo
<220>
<223>     AMPK- $\alpha$ 1 R
<400>     15
tgatgatgtg aggggtgcctg aaca                            24
<210>     16
<211>     24
<212>     ADN
<213>     Trình tự nhân tạo
<220>
<223>     CGI58 F
<400>     16
tgtgcaggac tcttacttgg cagt                            24
<210>     17
<211>     24
<212>     ADN
<213>     Trình tự nhân tạo
<220>
<223>     CGI58 R
<400>     17
gtttcttttg gcagaccggt ttct                            24

```