



(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)



1-0043552

(51)^{2020.01} A61K 38/10; C07K 7/08; A61P 43/00; (13) B
A61K 47/64; A61P 35/00

(21) 1-2020-03900

(22) 28/12/2018

(86) PCT/JP2018/048523 28/12/2018

(87) WO2019/138944 18/07/2019

(30) 2018-001063 09/01/2018 JP

(45) 25/02/2025 443

(43) 25/12/2020 393A

(73) FUJITA ACADEMY (JP)

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

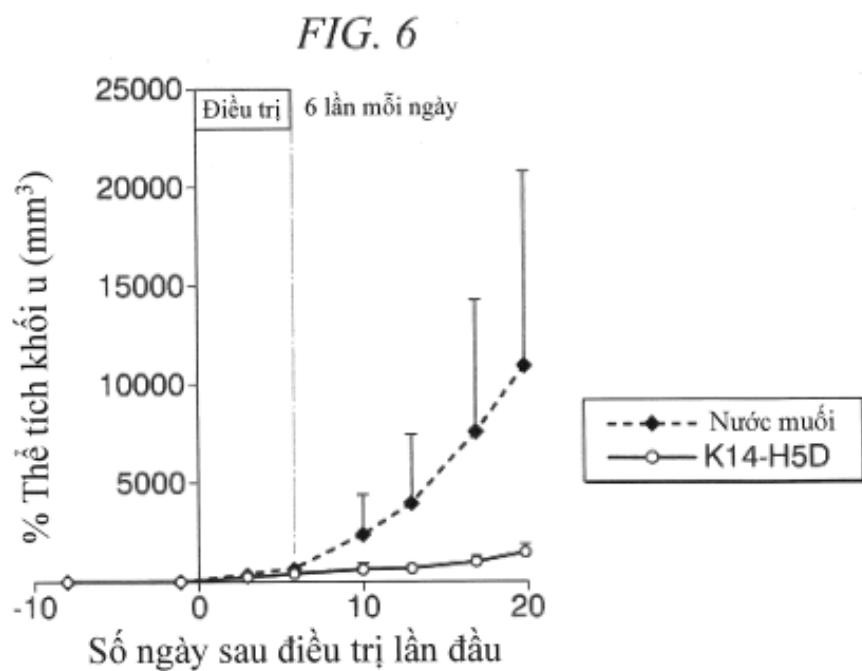
(72) Kazuhiro SUGIHARA (JP); Naohiro KANAYAMA (JP); Toshiaki SHIBATA (JP);
Yuichiro ONODERA (JP).

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

(54) CHẤT DIỆT TẾ BÀO

(21) 1-2020-03900

(57) Mục đích của sáng chế là đề xuất thuốc peptit có khả năng cảm ứng tiến trình tự chết tế bào (apoptosis) một cách chọn lọc trong các tế bào đích. Theo đó, sáng chế đề xuất chất diệt tế bào có chứa peptit dung hợp của peptit thoát thể nhân và peptit gây cảm ứng tiến trình tự chết tế bào, chất diệt tế bào này bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1, và chất diệt tế bào này được dùng làm tác nhân chữa bệnh cho bệnh do sự tăng sinh bất thường của các tế bào gây ra.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến thuốc peptit có khả năng cảm ứng chọn lọc tiến trình tự chết tế bào (apoptosis) trong các tế bào đích.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các thành phần hoạt tính của các dược phẩm được phân loại thành các thuốc có phân tử lượng thấp (các thuốc hợp chất phân tử lượng thấp), các thuốc kháng thể, và các thuốc có phân tử lượng trung bình lớn hơn các hợp chất phân tử lượng thấp và nhỏ hơn các kháng thể, dựa trên kích thước của chúng. Ví dụ, các thuốc có phân tử lượng trung bình bao gồm các thuốc peptit. Các thuốc có phân tử lượng thấp, các thuốc có phân tử lượng trung bình và các thuốc kháng thể có các ưu điểm và nhược điểm riêng của chúng. Ví dụ, do các thuốc có phân tử lượng thấp có phân tử lượng nhỏ, nên các thuốc này có thể đi qua màng tế bào và đi vào bên trong các tế bào đích, nhưng không thể ức chế sự liên kết giữa các protein. Hơn nữa, mặc dù có lợi thế là chi phí sản xuất tương đối thấp, việc sàng lọc đã được thực hiện trong nhiều năm và rất khó tìm kiếm các phân tử mới. Mặt khác, các thuốc kháng thể có tính đặc hiệu cao và khả năng liên kết với các phân tử đích và có thể ức chế sự liên kết giữa các protein, nhưng phân tử lượng lớn của các thuốc kháng thể này lại ngăn không cho chúng đi qua màng tế bào và đi vào bên trong các tế bào đích. Ngoài ra, chi phí sản xuất cao là một bất lợi lớn. Các thuốc có phân tử lượng trung bình có cả các ưu điểm của các thuốc có phân tử lượng thấp và các thuốc kháng thể. Đó là, ngoài việc có tính đặc hiệu cao và khả năng liên kết với phân tử đích, chúng có thể tác động lên phân tử đích thể nhân qua màng tế bào. Ngoài ra, do thường có thể tổng hợp hóa học, nên chi phí sản xuất thấp hơn so với các thuốc kháng thể và có thể tổng hợp được thuốc có độ tinh khiết cao.

Tiến trình tự chết tế bào có nghĩa là sự chết tế bào được kiểm soát và được điều chỉnh như một cơ chế ức chế tăng sinh trong số các sự chết tế bào của các sinh vật đa bào. Trong các sinh vật đa bào, việc loại trừ các tế bào không cần thiết hoặc các tế bào có hại gây ra trong quá trình tái tạo hoặc quá trình sinh sản được thực hiện bằng cách cảm ứng tiến trình tự chết tế bào trong tế bào này. Ngoài ra, bằng cách cảm ứng tiến trình tự chết tế bào trong tế bào là nguyên nhân gây bệnh và loại trừ tế bào này, có thể hy vọng cải thiện tình trạng của bệnh này. Theo cách này, các chất có hoạt tính cảm ứng tiến trình tự chết tế bào được sử dụng để điều trị bệnh. Ví dụ, bằng cách cảm ứng tiến trình tự chết tế bào trong tế bào ung thư, có thể hy vọng sẽ chữa được hoặc chữa khỏi bệnh ung thư.

Ví dụ như, thuốc peptit gây cảm ứng tiến trình tự chết tế bào trong các tế bào gây bệnh là chế phẩm peptit có chứa peptit dung hợp của peptit Z13 được biểu hiện cụ thể trên bề mặt tế bào của các tế bào lạc nội mạc tử cung (các tế bào nội mạc tử cung có mặt ở ngoài nội mạc tử cung) và liên kết đặc hiệu với kênh cổng nucleotit tuần hoàn beta 3

(cyclic nucleotide-gated channel beta 3 - CNGB3) là phân tử không được biểu hiện trên bề mặt phúc mạc, và peptit thoát thể nhân (endosome escape peptide), và peptit dung hợp của peptit Z13 và peptit cảm ứng tiến trình tự chết tế bào đã được công bố (tham khảo Công bố Đơn đăng ký sáng chế Mỹ số 2016/145308). Bằng cách kết hợp cả hai peptit trong tế bào nội mạc tử cung bởi nhóm chức peptit Z13, có thể cảm ứng tiến trình tự chết tế bào một cách chọn lọc trong tế bào nội mạc tử cung. Theo một ví dụ, chế phẩm peptit bao gồm peptit dung hợp giữa peptit Z13 và peptit thoát thể nhân và peptit dung hợp giữa peptit Z13 và peptit cảm ứng tiến trình tự chết tế bào đã được đưa vào phúc mạc của khi đầu chó đã bị mắc bệnh lạc nội mạc tử cung bằng nội soi ổ bụng, tiến trình tự chết tế bào chọn lọc chỉ được cảm ứng trong tế bào của tổn thương lạc nội mạc tử cung, và tiến trình tự chết tế bào không được cảm ứng trong các tế bào lân cận khác (tham khảo tài liệu NATURE COMMUNICATIONS, 2014, Tập 5, Bài số 4478, của Sugihara và các tác giả khác).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất thuốc peptit có khả năng cảm ứng chọn lọc tiến trình tự chết tế bào (apoptosis) trong các tế bào đích.

Các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu sâu rộng để giải quyết các vấn đề nêu trên, và kết quả là, phát hiện ra rằng peptit dung hợp của peptit thoát thể nhân bao gồm trình tự peptit riêng có peptit cảm ứng tiến trình tự chết tế bào bao gồm trình tự peptit riêng có thể cảm ứng tiến trình tự chết tế bào trong các tế bào ung thư với tính chọn lọc và hiệu quả cao, và nhờ đó đã tạo ra sáng chế.

Tức là, sáng chế đề xuất các chất diệt tế bào sau đây và phương pháp điều trị bệnh do sự tăng sinh tế bào bất thường.

[1] Chất diệt tế bào bao gồm peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1.

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

peptit chỉ bao gồm các D-axit amin,

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

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

peptit chỉ bao gồm các L-axit amin.

[3] Chất diệt tế bào theo mục [1] hoặc mục [2], trong đó chất này là chất chữa bệnh cho bệnh do sự tăng sinh bất thường của các tế bào gây ra.

[4] Chất diệt tế bào theo mục [3], trong đó bệnh này là bệnh ung thư.

[5] Phương pháp điều trị bệnh do sự tăng sinh tế bào bất thường gây ra, bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu chất diệt tế bào theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [4] cho động vật đã mắc bệnh do sự tăng sinh tế bào bất thường gây ra.

Chất diệt tế bào theo sáng chế có khả năng cảm ứng tiến trình tự chết tế bào trong các tế bào đích rất hiệu quả. Do đó, chất diệt tế bào này đặc biệt hiệu quả để làm tác nhân điều trị cho các bệnh do sự tăng sinh tế bào bất thường gây ra chẳng hạn như bệnh ung thư.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là đồ thị thể hiện các kết quả đo lượng ATP tương đối (%) của các tế bào A431-CNGB3-myc được điều trị bằng mỗi peptit trong Ví dụ 1.

FIG. 2 là đồ thị thể hiện các kết quả đo lượng ATP tương đối (%) của các tế bào OVCAR3-Luc được điều trị bằng mỗi peptit trong Ví dụ 1.

FIG. 3 là đồ thị thể hiện các kết quả đo lượng ATP tương đối (%) của các tế bào OVCAR3-Luc được điều trị bằng mỗi peptit trong Ví dụ 1.

FIG. 4 là đồ thị thể hiện các kết quả đo cường độ phát quang (luminescence intensity - RLU) của phúc mạc của mô hình chuột bệnh lạc nội mạc tử cung được tiêm trong phúc mạc peptit K14D-H5D một lần trong Ví dụ 2.

FIG. 5 là đồ thị thể hiện các kết quả của phép đo theo thời gian của tốc độ tăng (%) số lượng photon trong chuột OVCAR3-Luc được sử dụng peptit K14D-H5D trong Ví dụ 3.

FIG. 6 là đồ thị thể hiện các kết quả của phép đo theo thời gian của tốc độ tăng (%) thể tích khối u của chuột OVCAR3-Luc được sử dụng peptit K14D-H5D trong Ví dụ 3.

FIG. 7 là đồ thị thể hiện sự thay đổi theo thời gian của tỷ lệ sống sót của chuột OVCAR3-Luc được sử dụng peptit K14D-H5D trong Ví dụ 3 trong điều kiện làm chết êm ái (euthanasia) khi tốc độ tăng trưởng khối u gấp 10 lần.

FIG. 8 là đồ thị thể hiện sự thay đổi theo thời gian của tỷ lệ sống sót của chuột OVCAR3-Luc được sử dụng peptit K14D-H5D trong Ví dụ 3 trong điều kiện làm chết êm ái (euthanasia) khi tốc độ tăng trưởng khối u gấp 20 lần.

Mô tả chi tiết sáng chế

<Chất diệt tế bào>

Chất diệt tế bào theo sáng chế có chứa peptit (sau đây, cũng có thể gọi là “peptit thực hiện”) bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 (KLAKLAKKLAKHLAHL). Peptit thực hiện này là peptit trong đó peptit có hoạt tính cảm ứng tiến trình tự chết tế bào và peptit có hoạt tính thoát thể nhân được liên kết ngẫu nhiên. Do chất diệt tế bào theo sáng chế là đủ nhỏ, chất diệt tế bào này có thể được kết hợp vào các tế bào đích bằng cách nhập bào (endocytosis) mà không cần hệ thống hấp thu riêng. Sau đó, chất diệt tế bào này được kết nang với thể nhân (endosome) được kết hợp vào các tế bào đích được giải phóng vào tế bào chất của các tế bào đích này do phá vỡ màng thể nhân bởi tác động của nhóm chức peptit có hoạt tính thoát thể nhân. Chất diệt tế bào này được giải phóng vào tế bào chất phá hủy màng ty thể bởi tác động của nhóm chức nhóm chức peptit có hoạt tính cảm ứng tiến trình tự chết tế bào, và cảm ứng tiến trình tự chết tế bào của các tế bào đích này.

Chất diệt tế bào theo sáng chế có chứa, trong một phân tử, nhóm chức peptit có hoạt tính cảm ứng tiến trình tự chết tế bào và nhóm chức peptit có hoạt tính thoát thể nhân. Do đó, so với chế phẩm peptit chỉ có chứa peptit có hoạt tính cảm ứng tiến trình tự chết tế bào, hoặc chỉ có chứa peptit có hoạt tính thoát thể nhân, chất diệt tế bào theo sáng chế có thể cảm ứng tiến trình tự chết tế bào rất hiệu quả trong các tế bào đích.

Theo sáng chế và bản mô tả sáng chế này, “các tế bào đích” là các tế bào mục tiêu cần được cảm ứng tiến trình tự chết tế bào.

Như được bộc lộ trong Công bố Đơn đăng ký sáng chế Mỹ số 2016/145308, peptit (sau đây, đôi khi được gọi là “peptit KLAk”) bao gồm trình tự axit amin (sau đây đôi khi được gọi là “trình tự KLAk”) được tạo ra bởi bốn lần lặp axit amin KLAk có tác dụng cảm ứng tiến trình tự chết tế bào bằng cách làm hỏng màng ty thể (hoạt tính cảm ứng tiến trình tự chết tế bào). Peptit (sau đây, đôi khi được gọi là “peptit HLAH”) bao gồm trình tự axit amin (sau đây, đôi khi được gọi là “trình tự HLAH”) được tạo ra bởi bốn lần lặp axit amin HLAH có tác dụng phá vỡ màng thể nhân (hoạt tính thoát thể nhân). Peptit trong đó peptit KLAk này và peptit HLAH này được liên kết có hoạt tính thoát thể nhân và hoạt tính cảm ứng tiến trình tự chết tế bào, và cường độ của các hoạt tính này bị ảnh hưởng bởi độ dài của axit amin trong mỗi peptit và thứ tự liên kết của hai peptit này.

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

Peptit thực hiện có trong chất diệt tế bào theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là peptit này là peptit bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1, có thể là peptit bao gồm L-axit amin, có thể là peptit bao gồm D-axit amin, hoặc có thể là peptit bao gồm L-axit amin và D-axit amin. Do tính ổn định cao trong thể nhân và thu được hoạt tính cảm ứng tiến trình tự chết tế bào cao hơn, ưu tiên peptit thực hiện này là peptit bao gồm ít nhất một số D-axit amin, ít nhất một trong số trình tự KLAH này (trong trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1, các axit amin từ thứ 1 đến thứ 14) và trình tự HLAH này (trong trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1, các axit amin từ thứ 15 đến thứ 19), ưu tiên hơn đối với peptit bao gồm D-axit amin, và được ưu tiên đặc biệt trong tất cả là peptit bao gồm D-axit amin.

Chất diệt tế bào theo sáng chế có thể có các phân tử sinh học khác được liên kết với peptit thực hiện này miễn là tác dụng của peptit thực hiện bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 không bị suy yếu. Các ví dụ về các phân tử sinh học khác này bao gồm các peptit. Tuy nhiên, tốt hơn nếu tổng kích thước của chất diệt tế bào này ở mức sao cho nó có thể được kết hợp vào các tế bào bằng cách nhập bào mà không cần hệ thống hấp thu riêng. Cụ thể, ưu tiên nhóm chức không phải là peptit thực hiện này là từ 1 đến 15 peptit, ưu tiên hơn là từ 1 đến 10 peptit. Khi chất diệt tế bào theo sáng chế có chứa nhóm chức không phải là peptit thực hiện bao gồm trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1, nhóm chức không phải là peptit thực hiện này có thể là ở phía đầu tận cùng N hoặc ở phía đầu tận cùng C của peptit thực hiện này.

Chất diệt tế bào theo sáng chế hữu hiệu để làm tác nhân chữa bệnh cho các bệnh do sự tăng sinh bất thường gây ra, và được đặc biệt ưu tiên làm tác nhân chữa bệnh cho bệnh ung thư và bệnh lạc nội mạc tử cung. Loại bệnh ung thư được điều trị bằng chất diệt tế bào theo sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn cụ thể ở, ung thư tử cung, ung thư cổ tử cung, ung thư khoang chậu, ung thư buồng trứng, ung thư vú, khối u thành bụng, khối u mạc nối, ung thư thực quản, ung thư dạ dày, ung thư ruột non, ung thư đại tràng, ung thư trực tràng, ung thư manh tràng, ung thư túi mật, ung thư tuyến tụy, ung thư gan, ung thư lá lách, ung thư thận, ung thư lưỡi, ung thư vòm họng, ung thư mũi, ung thư tuyến cận giáp, ung thư tuyến giáp, ung thư hạch ác tính, ung thư xương, ung thư da, ung thư phổi, ung thư trung thất, ung thư tinh hoàn, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư bàng quang, khối u não và tương tự. Hơn nữa, bệnh ung thư này có thể là ung thư nguyên phát hoặc ung thư di căn.

Như được thể hiện trong các ví dụ dưới đây, chất diệt tế bào theo sáng chế có thể cảm ứng tiến trình tự chết tế bào với hiệu quả cao trong các tế bào có sự tăng sinh bất thường. Lý do cho điều này là không rõ ràng, nhưng được cho là như sau. Nói chung, bản thân các tế bào có sự tăng sinh bất thường có thể có hoạt tính cao và có hoạt tính kết hợp cao với các chất khác nhau từ bên ngoài bởi sự nhập bào. Do đó, có thể coi là chất diệt tế bào theo sáng chế được đưa vào *in vivo* được ưu tiên hấp thu bởi các tế bào có sự tăng sinh bất thường để cảm ứng tiến trình tự chết tế bào hơn là các tế bào bình thường.

Nếu chất diệt tế bào theo sáng chế được sử dụng làm dược phẩm, đường dùng không bị giới hạn cụ thể, và có thể được xác định một cách thích hợp tùy thuộc vào các tế bào đích và các mô chứa các tế bào đích này. Ví dụ, đường dùng của chất diệt tế bào theo sáng chế có thể là qua đường miệng, tiêm tĩnh mạch, tiêm trong phúc mạc, đường thụt hoặc tương tự.

Các bệnh do sự tăng sinh bất thường gây ra có thể được điều trị bằng cách sử dụng lượng hữu hiệu chất diệt tế bào theo sáng chế cho động vật mắc bệnh do sự tăng sinh tế bào bất thường gây ra. Lượng hữu hiệu chất diệt tế bào này có thể là lượng có thể làm giảm lượng các tế bào đích (các tế bào bị tăng sinh bất thường) trong cơ thể động vật được sử dụng chất diệt tế bào này so với trường hợp không sử dụng chất diệt tế bào này, và ưu tiên lượng không gây ra các tác dụng phụ nghiêm trọng do chất diệt tế bào này. Lượng hữu hiệu chất diệt tế bào này có thể được xác định bằng thử nghiệm có xét đến chủng loại của các tế bào đích này, loại động vật cần được sử dụng, phương pháp sử dụng và tương tự. Ví dụ, khi chất diệt tế bào này được đưa vào động vật đã mắc bệnh do sự tăng sinh bất thường của các tế bào gây ra chẳng hạn như bệnh ung thư, lượng hữu hiệu này có thể được xác định là lượng sao cho số lượng tế bào có sự tăng sinh bất thường trong cơ thể của động vật này ưu tiên giảm đến 90% hoặc ít hơn, ưu tiên hơn là giảm đến 80% hoặc ít hơn, thậm chí ưu tiên hơn giảm đến 75% hoặc ít hơn, thậm chí còn ưu tiên hơn nữa giảm đến 50% hoặc ít hơn, so với số lượng tế bào có sự tăng sinh bất thường trong cơ thể của động vật không được sử dụng thuốc.

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

Chất diệt tế bào theo sáng chế được bào chế bằng cách được trộn với tá dược, chất gắn kết, chất bôi trơn, chất làm tan rã, chất hóa lỏng, dung môi, chất hòa tan, chất đệm, chất tạo huyền phù, chất nhũ hóa, chất tạo đẳng trương, chất ổn định, chất khử trùng, chất chống oxy hóa, chất tạo hương vị, chất tạo màu, và tương tự, tùy thuộc vào yêu cầu của chế phẩm thuốc.

Các ví dụ về tá dược này bao gồm các sacarit chẳng hạn như lactoza, glucoza và D-manitol, các xenluloza chẳng hạn như tinh bột và xenluloza tinh thể, các rượu đường chẳng hạn như erythritol, sorbitol và xylitol, đicanxi phosphat, canxi cacbonat và cao lanh. Các ví dụ về chất kết nối này bao gồm tinh bột được tạo gelatin sơ bộ, gelatin, cao su Ả rập, metyl xenluloza, carboxy metyl xenluloza, natri carboxy metyl xenluloza, xenluloza tinh thể, D-manitol, trehaloza, hydroxy propyl xenluloza, hydroxy propyl metyl xenluloza, polyvinyl pyrrolidon, rượu polyvinyllic và tương tự. Các ví dụ về chất bôi trơn này bao gồm axit stearic, canxi stearat, bột tac, este của axit béo sucroza, polyetylen glycol và tương tự. Các ví dụ về chất phân rã này bao gồm polyvinyl pyrrolidon liên kết chéo (crospovidon), hydroxy propyl xenluloza mức thay thế thấp, tinh bột, axit alginic,

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

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

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

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được trình bày chi tiết hơn nữa bằng cách sử dụng các ví dụ. Sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ sau đây.

Các tế bào mô hình bệnh lạc nội mạc tử cung và mô hình chuột bệnh lạc nội mạc tử cung được sử dụng trong các thử nghiệm sau được điều chế như sau.

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

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

Thực hiện nuôi cấy các tế bào A431-CNGB3-myc này ở 37°C trong môi trường cacbon đioxit 5% theo thể tích sử dụng môi trường trong đó 10% huyết tương bào thai bò (fetal bovine serum - FBS, do Corning Corporation sản xuất) đã được làm bất hoạt và 1% penicillin-streptomycin (do Invitrogen Corporation sản xuất) có chứa trong môi trường DMEM Glucoza cao (do GIBCO Corporation sản xuất) làm môi trường nuôi cấy. Thực hiện chuyển tiếp mỗi hai đến ba ngày.

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

Cấy các tế bào A431-CNGB3-myc này vào khoang phúc mạc của chuột bị suy giảm miễn dịch (chủng NOD/ShiJic-scid Jcl, do CLEA Japan, Inc. cung cấp) để chuẩn bị mô hình chuột bệnh lạc nội mạc tử cung.

Cụ thể là, sau khi làm rã đông các tế bào A431-CNGB3-myc được trữ đông, điều chế dung dịch tế bào bằng cách bổ sung thêm môi trường nuôi cấy vào các tế bào đã được chuyển tiếp hai lần bằng cách sử dụng đĩa 10-cm (Số lô F3BAXQ103, do Thermo Fisher Scientific Co., Ltd. sản xuất,) để thành 1×10^6 tế bào/0,5 mL/cơ thể được sử dụng làm dung dịch thuốc điều trị. Dung dịch thuốc điều trị này được đưa vào trong phúc mạc cho chuột cái 7 tuần tuổi bị suy giảm miễn dịch ngay sau khi chuẩn bị cấy ghép các tế bào A431-CNGB3-myc này.

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

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

Kết quả kiểm tra bằng mắt đối với chuột sau khi cấy ghép tế bào A431-CNGB3-myc, trong thử nghiệm thứ nhất, mặc dù đã xác nhận được bằng mắt khối u sau khi cấy ghép một tuần, không quan sát thấy sự phát tán trong phúc mạc, nhưng hai hoặc ba tuần

sau khi cấy ghép, xác nhận được bằng mắt khối u và sự phát tán trong phúc mạc. Trong thử nghiệm thứ hai, xác nhận được bằng mắt sự phát tán trong phúc mạc sau khi cấy ghép một tuần. Ngoài ra, do việc nhuộm c-myc của mảnh mô phúc mạc của chuột sau khi cấy ghép, đã khẳng định rằng một tuần sau khi cấy ghép, đã xảy ra sự phát tán trong phúc mạc.

<Chuột mắc bệnh ung thư buồng trứng mang khối u dưới da được chuyển gen luciferaza (luciferase gene-transferred subcutaneous tumor bearing ovarian cancer - OVCAR3-Luc)>

Sử dụng mô khối u được cấy vào chuột đã được chuẩn bị bằng cách nuôi cấy dòng tế bào ung thư buồng trứng (các tế bào OVCAR3-Luc, được chuyển từ cơ sở khác) đã được đưa gen luciferaza vào. Các tế bào OVCAR3-Luc đã được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy chứa môi trường RPMI 1640 (11875-093: do Gibco sản xuất) có chứa FBS bất hoạt 10% (do Corning sản xuất) ở 37°C và trong môi trường cacbon đioxit 5% theo thể tích. Thực hiện chuyển tiếp mỗi 2-3 ngày.

Sử dụng dòng tế bào OVCAR3-Luc đã được tách ra bằng cách xử lý bằng trypsin và dung dịch tế bào được chuẩn bị bằng cách bổ sung thêm môi trường nuôi cấy để có 5×10^5 tế bào/100 μ L/cơ thể làm dung dịch thuốc điều trị. Tiêm dưới da dung dịch thuốc điều trị này vào lưng chuột SCID cái 8 đến 10 tuần tuổi ngay sau khi chuẩn bị, nhờ đó chuẩn bị mô hình chuột có khối u dưới da trong đó các tế bào OVCAR3-Luc được cấy dưới da.

[Ví dụ 1]

Kiểm tra hoạt tính diệt tế bào của mỗi peptit đối với hai loại tế bào ung thư (các tế bào A431-CNGB3-myc và các tế bào OVCAR3-Luc) có khả năng tăng sinh tế bào được tăng cường. Các trình tự axit amin của các peptit được sử dụng được thể hiện trong Bảng 1. Trong số các peptit được liệt kê trong Bảng 1, peptit K14D-H5D là peptit có trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1, peptit này chỉ bao gồm các D-axit amin. Peptit K14D là peptit KLAK chỉ bao gồm các D-axit amin, và peptit H5D là peptit HLAH chỉ bao gồm các D-axit amin. Peptit K14D-H5D-Z13 là peptit thu được bằng cách bổ sung thêm peptit Z13 có chứa các L-axit amin vào đầu tận cùng C của peptit K14D-H5D này. Peptit K7D-H18D là peptit có chứa trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 5, peptit này chỉ bao gồm các D-axit amin.

[Bảng 1]

Peptit	Seq.	Seq. số
K14D-H5D	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHL	1
K14D	KLAKLAK-KLAKLAK	2
H5D	HLAHL	3

K14D-H5D-Z13	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHL-VRRADNRPG	4
K7D-H18D	KLAKLAK-HLAHLAH-HLAHLAH-HLAH	5

<Đánh giá hoạt tính diệt tế bào >

Đánh giá hoạt tính diệt tế bào của mỗi peptit bằng cách đo lượng ATP trong các tế bào được xử lý bằng mỗi peptit sử dụng bộ dụng cụ xét nghiệm CellTiter-Glo (nhãn hiệu đã được đăng ký) (do Promega sản xuất).

Cụ thể là, trước tiên cấy các tế bào A431-CNGB3-myc hoặc các tế bào OVCAR3-Luc sau 3 đến 4 lần chuyển tiếp trong đĩa 96 giếng (do Corning/Costar sản xuất, số lô 00515003) để điều chỉnh nồng độ tế bào thành 1×10^4 tế bào/giếng. Sau khi nuôi cấy trong 2 ngày kể từ khi cấy, bổ sung thêm mỗi peptit vào từng giếng với nồng độ cuối cùng là 0 (không thêm peptit), 2,34, 4,69, 9,38, 18,8, 37,5, 75,0, 150,0, 300,0 μM , sau đó nuôi cấy trong 24 giờ. Tiếp theo, peptit K14D được kết hợp với peptit H5D, và hỗn hợp tạo thành của cả hai peptit này được bổ sung thêm vào mỗi giếng. Sau đó, loại bỏ váng nuôi cấy ra khỏi mỗi giếng, bổ sung thêm bộ đệm CellTiter-Glo vào các tế bào còn lại và đồng nhất hóa, và sau đó thu thập váng bằng cách ly tâm để thu được dịch thủy phân. Bổ sung thêm vào dịch thủy phân này lượng PBS gấp đôi và 2 lần thuốc thử CellTiter Glo với lượng tương đương với dịch thủy phân này và khuấy để chuẩn bị dung dịch phản ứng, và để dung dịch phản ứng này ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Đo cường độ phát quang (RELATIVE LIGHT UNITS (RLU) - đơn vị ánh sáng tương đối) của mỗi dung dịch phản ứng sau khi để yên ở nhiệt độ phòng bằng máy đọc vi đĩa đa chế độ lai ghép Synergy H1 (do BioTek sản xuất). Cường độ phát quang của dung dịch phản ứng này là chỉ số của lượng ATP. Cường độ phát quang của dung dịch phản ứng càng nhỏ, thì lượng ATP càng nhỏ và hoạt tính diệt tế bào của peptit được sử dụng càng mạnh. Tất cả các thử nghiệm được đo ba lần, và giá trị trung bình của chúng được lấy làm cường độ phát xạ (RLU) của mỗi dung dịch phản ứng.

Cường độ phát quang tương đối (%) của mỗi dung dịch phản ứng được tính bằng cách lấy cường độ phát quang (RLU) của dung dịch phản ứng không có peptit làm cơ sở 100%, và được tính dưới dạng lượng ATP tương đối (%). Lượng ATP tương đối (%) của các tế bào A431-CNGB3-myc được xử lý bằng mỗi peptit được thể hiện trong FIG. 1, và lượng ATP tương đối (%) của các tế bào OVCAR3-Luc được xử lý bằng mỗi peptit được thể hiện trong FIG. 2 và FIG. 3, một cách tương ứng. Trong các hình vẽ này, "K14D + H5D" chỉ báo lượng ATP tương đối (%) của dung dịch phản ứng đã được bổ sung thêm cả peptit K14D và peptit H5D vào.

Như được thể hiện trong FIG. 1 và FIG. 2, trong trường hợp cả peptit K14D và peptit H5D đã được bổ sung thêm vào, không quan sát thấy hoạt tính diệt tế bào trên bất kỳ tế bào ung thư nào, ngay cả khi lượng peptit được bổ sung thêm vào là 300 μ M. Ngược lại, peptit K14D-H5D và peptit K7D-H18D, là các peptit dung hợp của peptit KLAK và peptit HLAH, thể hiện lượng ATP tương đối được giảm theo cách thức phụ thuộc vào liều và hoạt tính diệt tế bào. Peptit K14D-H5D rõ ràng là có hoạt tính diệt tế bào mạnh hơn so với peptit K7D-H18D trong bất kỳ tế bào ung thư nào. Hơn nữa, như được thể hiện trong FIG. 3, peptit K14D-H5D và peptit K14D-H5D-Z13 thể hiện hoạt tính diệt tế bào như nhau trên các tế bào OVCAR3-Luc không có CNGB3 trên bề mặt tế bào. Tức là, xác nhận rằng ngay cả peptit trong đó peptit khác được liên kết với peptit K14D-H5D cũng có hoạt tính diệt tế bào miễn là nó có kích thước có thể được kết hợp bằng cách nhập bào.

<Nhuộm TUNEL >

Thực hiện nhuộm TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling - Dán nhãn đầu cắt dUTP trung gian TdT) trên các tế bào A431-CNGB3-myc được xử lý bằng 300 μ M peptit K14D-H5D và các tế bào A431-CNGB3-myc không được xử lý bằng peptit. Kết quả là, trong các tế bào A431-CNGB3-myc được xử lý bằng peptit K14D-H5D, nhân của hầu hết các tế bào đều bị nhuộm màu nâu (TUNEL dương tính) và rõ ràng là có ít tế bào hơn so với các tế bào A431-CNGB3-myc không được xử lý bằng peptit. Mặt khác, trong các tế bào A431-CNGB3-myc không được xử lý bằng peptit, không tìm thấy các tế bào màu nâu trong nhân. Từ những kết quả này, khẳng định rằng peptit K14D-H5D cảm ứng tiến trình tự chết tế bào và thể hiện tác dụng diệt tế bào.

[Ví dụ 2]

Cho mô hình chuột mắc bệnh lạc nội mạc tử cung sử dụng peptit K14D-H5D được sử dụng trong ví dụ 1 và kiểm tra hoạt tính diệt tế bào trên các tế bào nội mạc tử cung.

<Đưa peptit vào phúc mạc một lần>

Bảy ngày sau khi các tế bào A431-CNGB3-myc được cấy ghép trong phúc mạc, đưa 0,5 ml dung dịch nước muối sinh lý được làm ấm đến 37°C vào phúc mạc mô hình chuột mắc bệnh lạc nội mạc tử cung trong điều kiện gây mê bằng isofluran, sau đó tiến hành xoa bóp. Ngay sau khi xoa bóp, đưa dung dịch peptit K14D-H5D đã được hòa tan trong nước muối sinh lý vào phúc mạc. Peptit K14D-H5D này được dùng với liều 0 mg/10 mL/kg (đối chứng) (n = 7), 5 mg/10 mL/kg (n = 8), hoặc 10 mg/10 mL/kg (n = 8) trên trọng lượng cơ thể chuột

<Thu thập phúc mạc (thu thập mẫu)>

Mô hình chuột mắc bệnh lạc nội mạc tử cung đã được cho sử dụng peptit K14D-H5D được làm mất máu cho đến chết trong điều kiện gây mê bằng isofluran 24 giờ sau khi cho sử dụng peptit và thu thập phúc mạc. Phần phúc mạc để đo ATP được đông lạnh trong nitơ lỏng và sau đó được bảo quản trong tủ đông sâu cho đến khi đo. Các phúc mạc này dùng để chuẩn bị mẫu bệnh phẩm được ngâm trong dung dịch đệm trung tính formalin 10%, được cố định, và sau đó được lưu trữ trong tủ lạnh.

<Đo trọng lượng>

Mỗi con chuột được cân 7 ngày sau khi cấy ghép tế bào A431-CNGB3-myc trong phúc mạc, trước khi cho sử dụng peptit K14D-H5D và trước khi bị làm mất máu.

Nhóm chuột trong đó liều peptit K14D-H5D trên trọng lượng cơ thể chuột là 0 mg/10 mL/kg được biểu thị là nhóm G1, nhóm chuột trong đó liều peptit K14D-H5D trên trọng lượng cơ thể chuột là 5 mg/10 mL/kg được biểu thị là nhóm G2 và nhóm chuột trong đó liều peptit K14D-H5D trên trọng lượng cơ thể chuột là 10 mg/10 mL/kg được biểu thị là nhóm G3. Bảng 2 thể hiện các kết quả đo (các giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn) của mỗi nhóm. Trong Bảng này, "ngày thứ 7" trong cột "Trọng lượng cơ thể" là trọng lượng cơ thể 7 ngày sau khi cấy ghép các tế bào A431-CNGB3-myc trong phúc mạc, trước khi sử dụng peptit K14D-H5D và "ngày thứ 8" là trọng lượng cơ thể 24 giờ sau khi dùng peptit K14D-H5D.

[Bảng 2]

Nhóm chuột	Trọng lượng cơ thể (g)	
	Ngày thứ 7	Ngày thứ 8
G1	20,1 $\pm$ 0,6	19,7 $\pm$ 0,5
G2	20,1 $\pm$ 0,4	19,2 $\pm$ 0,5
G3	20,0 $\pm$ 0,4	17,5 $\pm$ 0,3

Như thể hiện trong Bảng 2, quan sát thấy trọng lượng cơ thể giảm nhẹ tùy thuộc vào liều lượng peptit K14D-H5D này, nhưng mức giảm này là nhỏ. Từ những kết quả này, phát hiện thấy rằng peptit K14D-H5D này có ảnh hưởng nhỏ đến các tế bào bình thường, và do đó peptit này có thể được sử dụng cho động vật tương đối an toàn.

<Đo lượng ATP>Đo lượng ATP bằng cách sử dụng Bộ dụng cụ xét nghiệm CellTiter-Glo (nhãn hiệu đã được đăng ký) (do Promega sản xuất). Đo khối lượng của phúc mạc đông lạnh và bổ sung thêm đệm CellTiter-Glo với lượng gấp 10 lần so với lượng mô đông lạnh để được đồng nhất hóa, và sau đó thu thập váng bằng cách ly tâm để thu được dịch thủy phân. Bổ sung thêm vào dịch thủy phân này lượng PBS gấp đôi và 2 lần Thuốc thử CellTiter Glo với lượng tương đương với dịch thủy phân này và khuấy để chuẩn bị dung dịch phản ứng, và để dung dịch phản ứng này được để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.

Đo độ phát quang (RLU) của mỗi dung dịch phản ứng sau khi để ở nhiệt độ phòng bằng thiết bị đọc vi đĩa đa chế độ lai ghép Synergy H1 (do BioTek sản xuất). Tất cả các thử nghiệm đều được đo ba lần ($n = 3$) và giá trị trung bình của chúng được lấy làm giá trị đo của cường độ phát xạ (RLU) của mỗi dung dịch phản ứng.

FIG. 4 thể hiện các kết quả đo (các giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn) của lượng ATP trong mỗi nhóm. Khẳng định rằng cường độ phát quang (RLU) của phúc mạc giảm theo cách thức phụ thuộc vào liều peptit K14D-H5D được đưa vào, và lượng ATP của phúc mạc này giảm. Việc giảm lượng ATP trong phúc mạc đồng nghĩa với việc giảm số lượng tế bào A431-CNGB3-myc còn sống được cấy vào trong phúc mạc này. Từ những kết quả này, khẳng định rằng peptit K14D-H5D tiêu diệt các tế bào A431-CNGB3-myc trong khoang bụng, nói cách khác, peptit K14D-H5D tạo ra tác dụng diệt tế bào trong môi trường *in-vivo*.

[Ví dụ 3]

Peptit K14D-H5D được sử dụng trong ví dụ 1 được tiêm tĩnh mạch cho chuột OVCAR3-Luc và kiểm tra hoạt tính diệt tế bào trên các tế bào ung thư.

<Đưa peptit vào qua tĩnh mạch đuôi>

Mười bốn ngày sau khi cấy ghép các tế bào OVCAR3-Luc dưới da, tiêm 50 μ L dung dịch được điều chế bằng cách hòa tan peptit K14D-H5D trong nước muối sinh lý một lần một ngày trong sáu ngày liên tiếp vào chuột OVCAR3-Luc qua tĩnh mạch đuôi. Peptit K14D-H5D được dùng sao cho liều trên trọng lượng cơ thể chuột là 0 μ mol/kg/ngày (đối chứng) hoặc 1,17 μ mol/kg/ngày.

<Đo kích thước mô khối u>

Tiến hành thử nghiệm hình ảnh phát quang trên mỗi con chuột và đo số lượng photon của khối u ở lưng và kích thước của mô khối u theo thời gian.

(1) Đo số lượng photon

Đo số lượng photon bằng thiết bị hình ảnh phát quang *in-vivo* sử dụng cơ chế phát quang luciferin-luciferase. Trước tiên, gây mê chuột OVCAR3-Luc bằng thuốc gây mê hít isofluran và đưa 100 μ L dung dịch kali D-luciferin (dung dịch kali D-luciferin (126-05116: do Wako Pure Chemical Industries, Ltd. sản xuất) được hòa tan trong PBS ở nồng độ cuối cùng là 30 mg/mL) vào khoang bụng. Mười lăm phút sau khi đưa vào, chuột được đo bằng thiết bị hình ảnh phát quang *in-vivo* và đo số lượng photon. Sử dụng IVIS Imaging System (IVIS200: do Sumisho Pharma International sản xuất) là thiết bị hình ảnh *in-vivo* để định lượng quang bằng máy ảnh CCD làm mát siêu nhạy làm thiết bị chụp ảnh phát quang *in-vivo*.

(2) Đo thể tích khối u

Thể tích khối u ước tính (mm^3) ở lưng của mỗi con chuột OVCAR3-Luc được tính toán từ đường kính chính và đường kính nhỏ của khối u theo phương trình sau. Đo trực chính (mm) và trực nhỏ (mm) của khối u bằng thước cặp.

$$\text{Thể tích khối u ước tính (mm}^3\text{)]} = [\text{trực chính (mm)}] \times [\text{trực nhỏ (mm)}] \times [\text{trực nhỏ (mm)}] \times 1/2$$

FIG. 5 thể hiện sự thay đổi theo thời gian của tốc độ tăng (%) số lượng photon trong khối u ở lưng của mỗi con chuột và FIG. 6 thể hiện sự thay đổi theo thời gian của tốc độ tăng (%) thể tích khối u (mm^3) ở lưng của mỗi con chuột. Trong cả tốc độ tăng số lượng photon và tốc độ tăng thể tích khối u, giá trị vào ngày trước khi bắt đầu sử dụng dung dịch peptit được lấy làm tiêu chuẩn (100%). Trong các hình vẽ này, "điều trị" chỉ báo thời gian điều trị trong đó dung dịch peptit được tiêm tĩnh mạch. Hơn nữa, trong cả hai hình vẽ, các thanh báo lỗi chỉ xuất hiện ở phía trên chỉ báo các lỗi tiêu chuẩn (SEM). Như được thể hiện trong FIG. 5, chuột được sử dụng peptit K14D-H5D thể hiện hầu như không tăng số lượng photon và hầu như không tăng thể tích khối u. Từ những kết quả này, có thể thấy rằng việc sử dụng peptit K14D-H5D có thể tiêu diệt mô khối u *in vivo* và peptit này hữu dụng để làm thuốc chống ung thư.

<Đo tỷ lệ sống sót>

Tỷ lệ sống sót của mỗi chuột được tính toán bằng cách xác định trường hợp trong đó sự tăng trưởng khối u được đo bằng phép đo số lượng photon đạt 10 lần hoặc 20 lần so với giá trị đo được vào ngày trước khi dùng peptit này làm điều kiện trợ tử. Thực hiện quan sát trong 20 ngày và phân tích đường cong sinh tồn bằng phương pháp Kaplan-Meier.

FIG. 7 thể hiện sự thay đổi theo thời gian của tỷ lệ sống sót khi xác định trường hợp trong đó tốc độ tăng trưởng khối u đạt gấp 10 lần là điều kiện trợ tử và FIG. 8 cho thấy sự thay đổi theo thời gian của tỷ lệ sống sót khi xác định trường hợp trong đó tốc độ tăng trưởng khối u đạt gấp 20 lần là điều kiện trợ tử. Như được thể hiện trong FIG. 7 và FIG. 8, tỷ lệ sống sót của chuột OVCAR3-Luc đã được cải thiện đáng kể khi sử dụng peptit K14D-H5D, và nhận thấy rằng peptit K14D-H5D có tác dụng chống ung thư đáng chú ý.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chất diệt tế bào bao gồm peptit có chứa trình tự axit amin được biểu diễn bởi SEQ ID số: 1 là peptit thực hiện trong đó peptit có hoạt tính cảm ứng tiến trình tự chết tế bào (apoptosis) và peptit có hoạt tính thoát thể nhân được liên kết với nhau.

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

peptit chỉ bao gồm các D-axit amin,

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

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

peptit chỉ bao gồm các L-axit amin.

1/4

FIG. 1

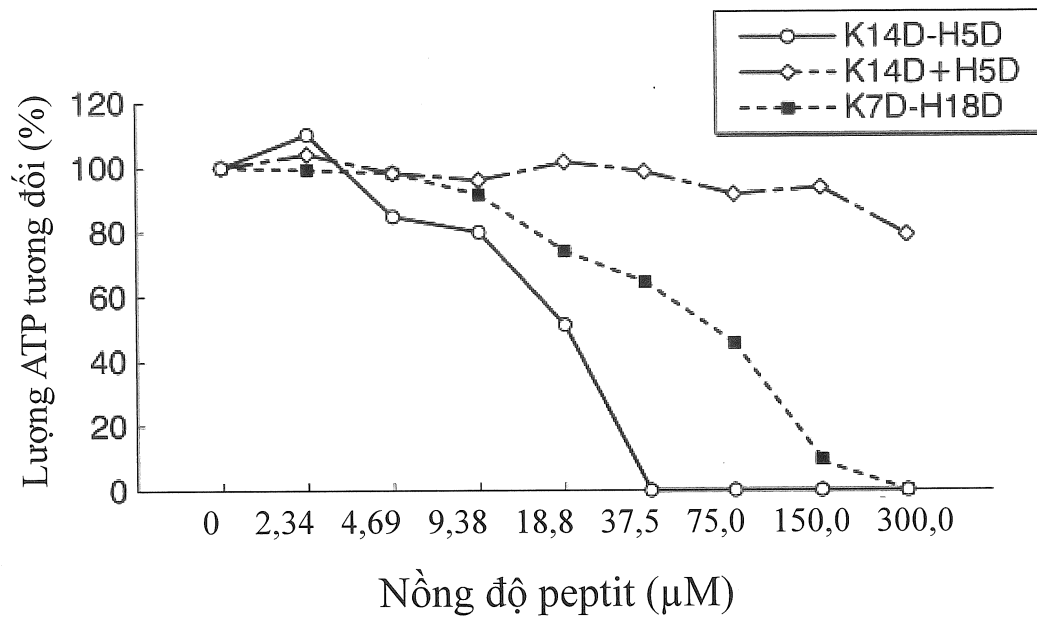
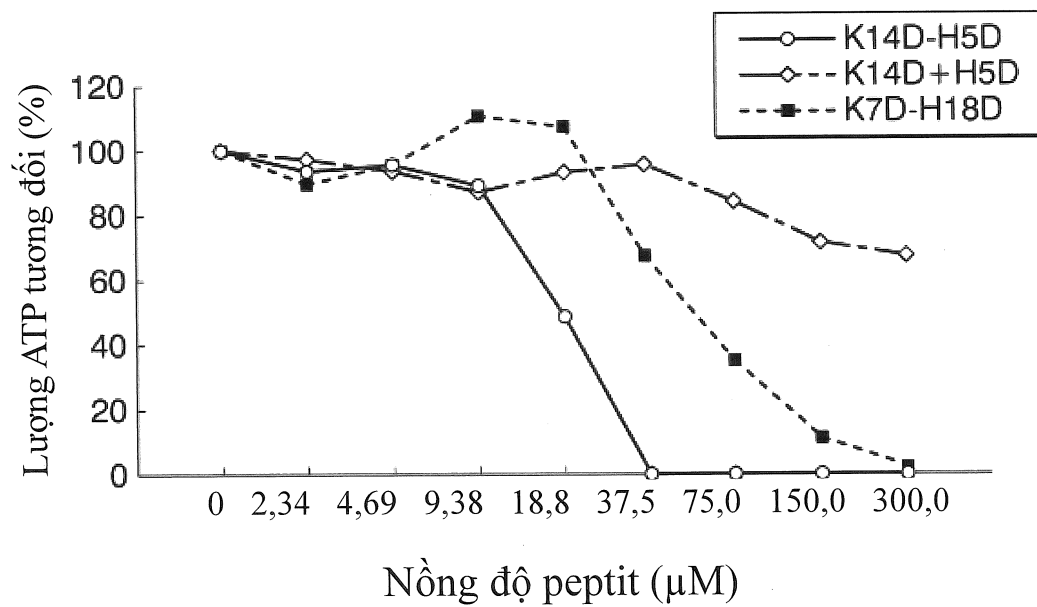


FIG. 2



2/4

FIG. 3

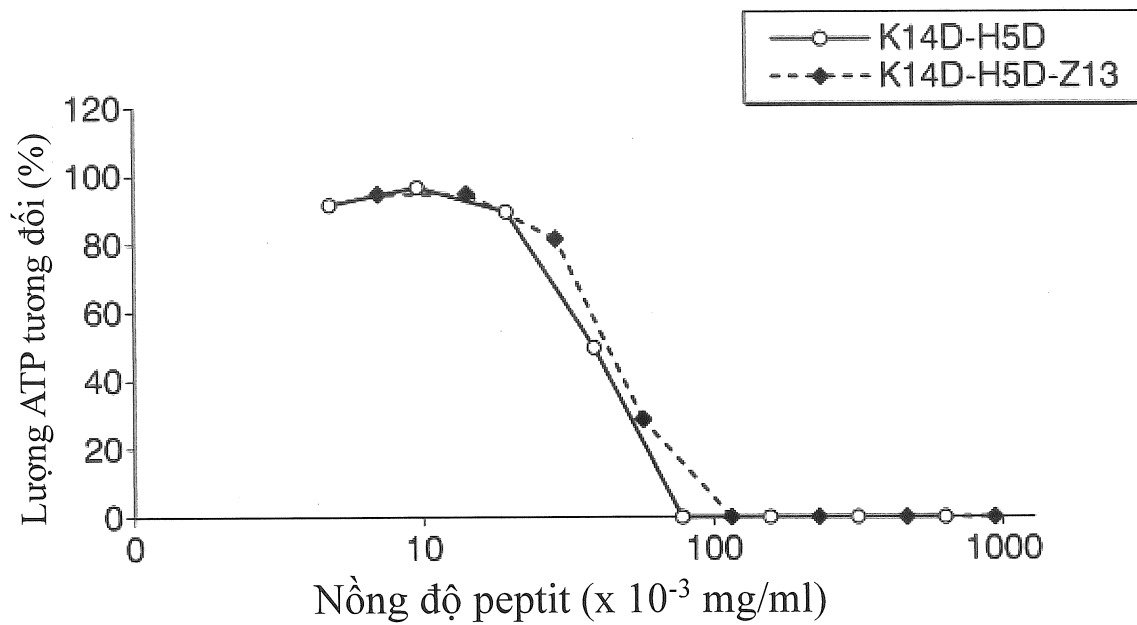
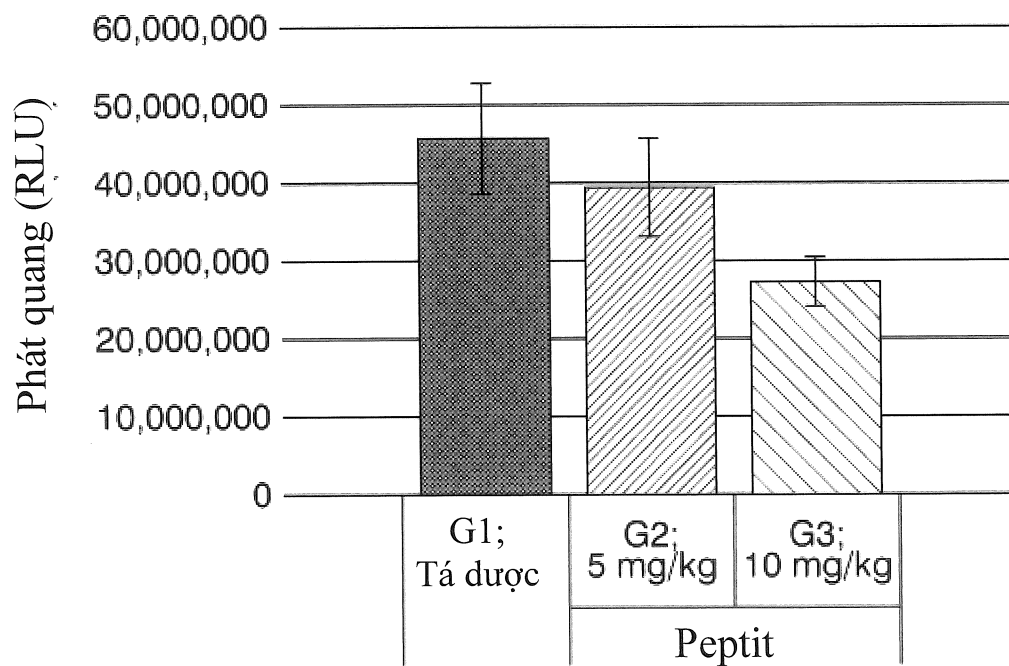


FIG. 4



3/4

FIG. 5

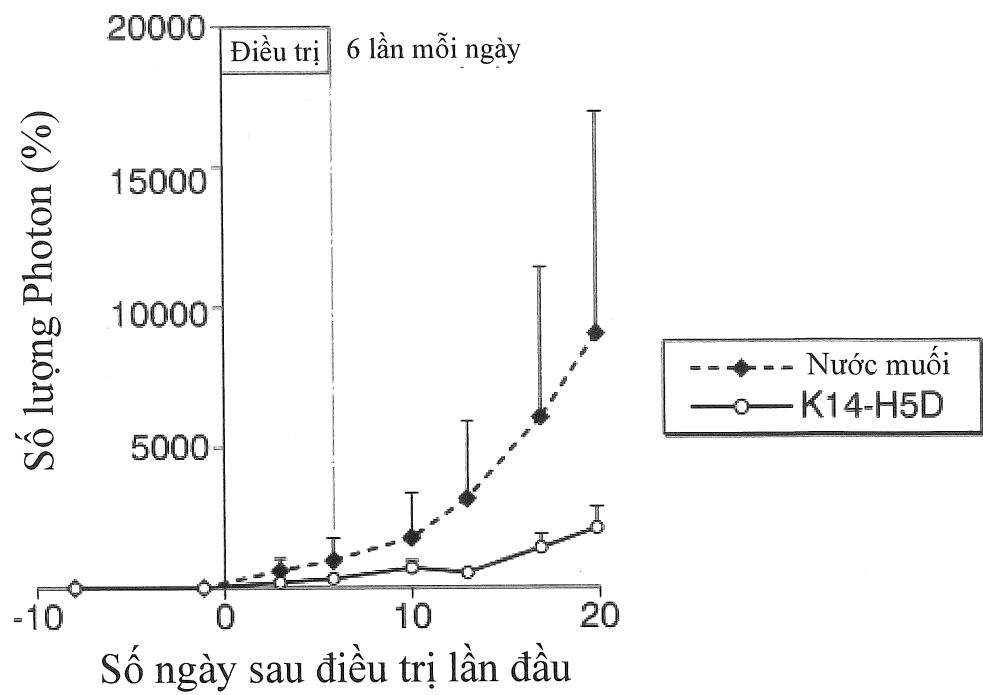
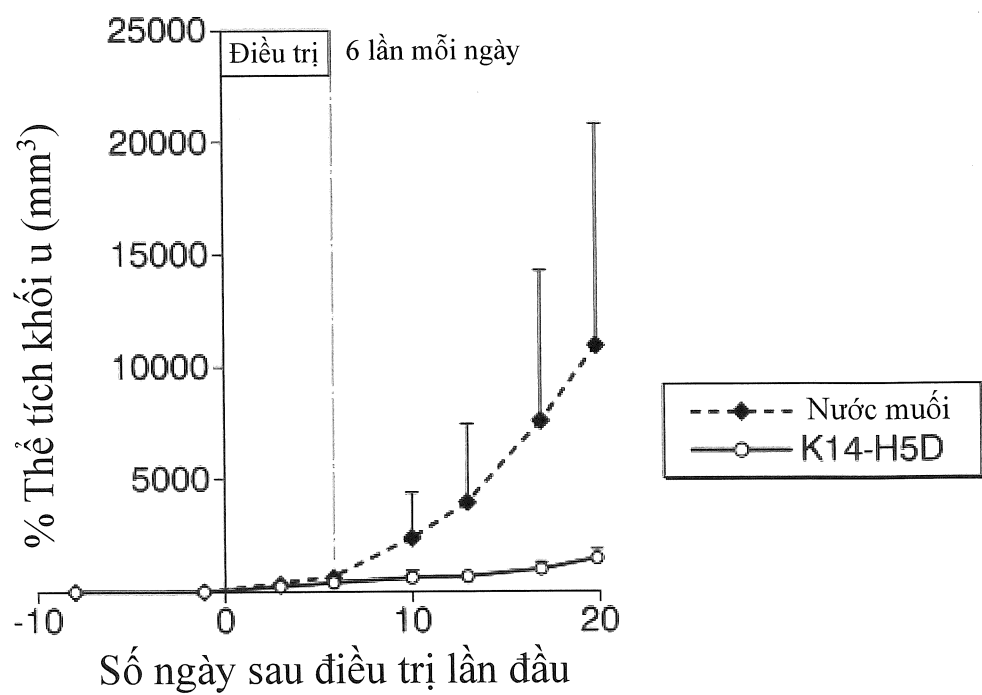


FIG. 6



4/4

FIG. 7

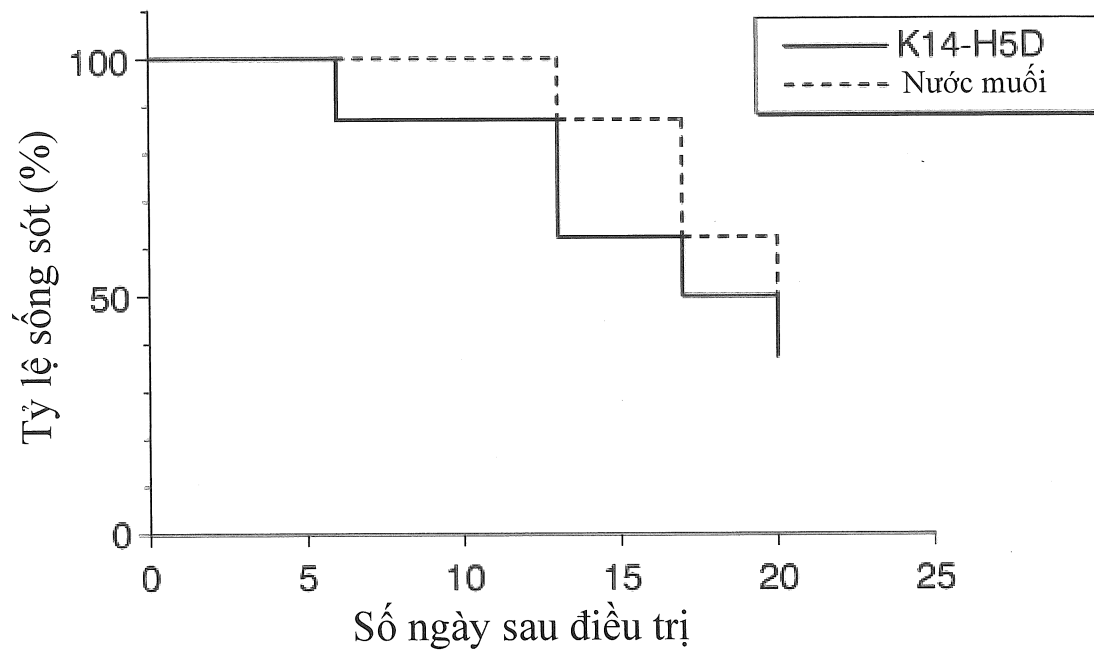
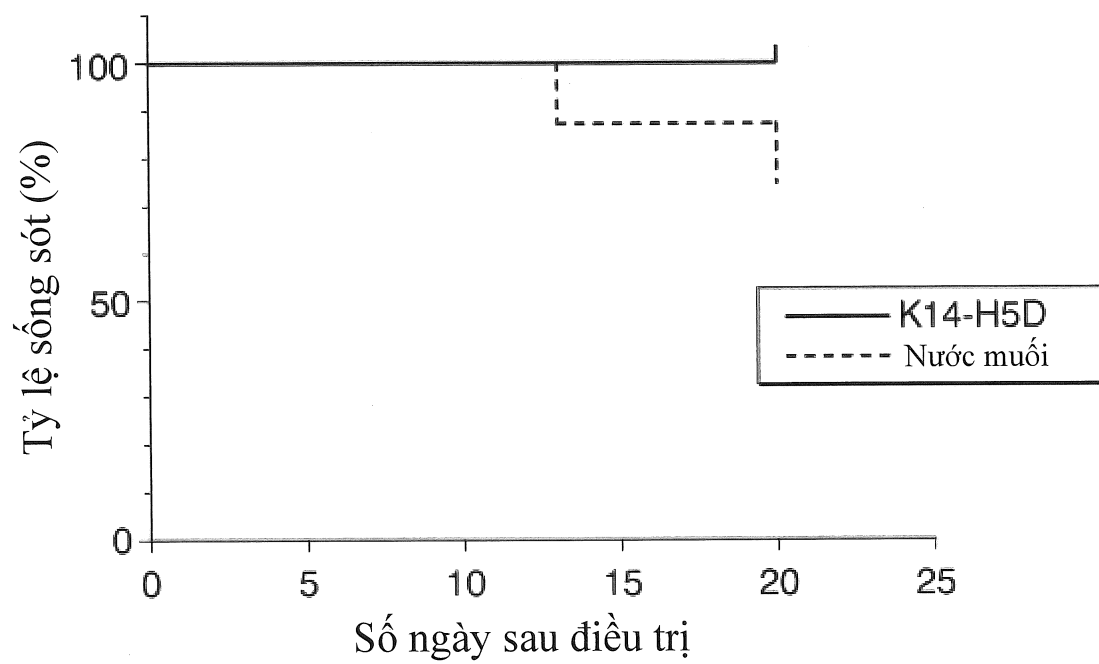


FIG. 8



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> FUJITA ACADEMY

<120> Chất diệt tế bào

<130> PC-26985

<160> 5

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit thực hiện

<400> 1

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu

1 5 10 15

Ala His Leu

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit K14D

<400> 2

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys

1 5 10

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit H5D

<400> 3

His Leu Ala His Leu

1 5

<210> 4

<211> 28

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit K14D-H5D-Z13

<400> 4

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu

1 5 10 15

Ala His Leu Val Arg Arg Ala Asp Asn Arg Pro Gly

20 25

<210> 5

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: peptit K7D-H18D

<400> 5

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys His Leu Ala His Leu Ala His His Leu

1 5 10 15

Ala His Leu Ala His His Leu Ala His

20 25