



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

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

(11)



1-0053099

(51)^{2006.01} C07K 5/10; A61K 38/08; C12P 21/00; (13) B
C07K 7/06; C12N 15/63; A23L 1/305;
C07K 5/103

(21) 1-2017-03066

(22) 03/05/2016

(86) PCT/KR2016/004650 03/05/2016

(87) WO 2017/111215 29/06/2017

(30) 10-2015-0183011 21/12/2015 KR; 10-2016-0026600 04/03/2016 KR

(45) 25/11/2025 452

(43) 25/09/2018 366A

(73) 1. BRAINON, INC. (KR)

A-dong 90, Biryong 1-gil, Nami-myeon, Seowon-gu Cheongju-si Chungcheongbuk-do 28184, Republic of Korea

2. KANG, Yongkoo (KR)

102-1706, Bearstown Apt. 40, Seonyu-ro Yeongdeungpo-gu Seoul 07282, Republic of Korea

(72) KANG, Yongkoo (KR).

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) PEPTIT CÓ HIỆU QUẢ CẢI THIẾN TRÍ NHỚ, DƯỢC PHẨM, CHẾ PHẨM THỰC PHẨM CHỨA PEPTIT, POLYNUCLEOTIT, VECTƠ TÁI TỔ HỢP, TẾ BÀO CHỦ, VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PEPTIT NÀY

(21) 1-2017-03066

(57) Sáng chế đề cập đến peptit có đầu tận cùng C là GAG có hiệu quả cải thiện trí nhớ và phương pháp sản xuất peptit này. Để đạt được hiệu quả đó, peptit cần phải là peptit có đầu tận cùng C là GAG và có độ dài gồm có ít nhất 4 axit amin, cụ thể là peptit có đầu tận cùng C là GAG có độ dài gồm có từ 5 đến 9 axit amin. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất các dược phẩm và thực phẩm dùng để cải thiện trí nhớ, khả năng học tập và khả năng nhận thức có chứa peptit theo sáng chế, và polynucleotit mã hóa peptit theo sáng chế, vector tái tổ hợp chứa polynucleotit, và tế bào chủ được biến nạp với vector tái tổ hợp này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm dùng để cải thiện trí nhớ, khả năng học tập và khả năng nhận thức, và cụ thể là sáng chế đề cập đến peptit có hiệu quả cải thiện trí nhớ, phương pháp sản xuất, các dược phẩm và thực phẩm dùng để cải thiện trí nhớ, khả năng học tập và khả năng nhận thức chứa peptit, polynucleotit mã hóa peptit, vector tái tổ hợp chứa polynucleotit, và tế bào chủ được biến nạp với vector tái tổ hợp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Não bộ có nhiều chức năng khác nhau, nhưng chức năng quan trọng nhất là ghi nhớ và nhận thức. Nếu con người không có khả năng nhận thức và ghi nhớ, rất khó để thực hiện các công việc trong cuộc sống hàng ngày và nó trở thành một vấn đề liên quan đến sự tồn tại. Trí nhớ và nhận thức gắn liền với hầu hết các chức năng của não bộ và cấu trúc của não bộ liên quan đến trí nhớ và nhận thức là khác nhau và có mối liên hệ mật thiết với hầu hết tất cả các phần của não bộ.

Trí nhớ được phân loại thành một số bước và được chia thành bước ghi và mã hóa thông tin, bước lưu giữ, và bước truy cập và thu hồi vị trí của bộ nhớ.

Mã hóa là giai đoạn ban đầu trong đó thông tin đi vào não bộ thông qua các cơ quan cảm giác được biết đến và ghi nhớ. Thông tin trước hết được lưu thông qua việc mã hóa, nhưng để thông tin đã lưu được tiếp tục giữ lại và lưu một cách chắc chắn hơn, cần có thêm một bước khác sau khi mã hóa được gọi là củng cố. Nếu sự củng cố trí nhớ không đạt được tốt, việc lãng quên xảy ra nhanh chóng và việc giữ lại trí nhớ trở nên khó khăn. Thu hồi nghĩa là quá trình gợi nhớ có ý thức các nội dung được lưu trong trí nhớ dài hạn. Phương pháp thu hồi bao gồm triệu hồi và thừa nhận. Việc triệu hồi là để gợi nhớ có ý thức các nội dung của trí nhớ và thừa nhận là để gợi nhớ các nội dung trong khi áp dụng các gợi ý. Trong hầu hết các trường hợp, việc triệu hồi là khó khăn hơn việc thừa nhận. Tuy nhiên, ở các bệnh nhân bị tổn thương thùy trán hoặc chứng mất trí trong bệnh mạch máu dưới vỏ, việc triệu hồi lại rất khó khăn, tuy nhiên việc thừa nhận được

thực hiện tốt, và trong trường hợp này, việc mã hóa và lưu giữ của trí nhớ được thực hiện tốt, nhưng gặp vấn đề ở việc thu hồi. Nếu có vấn đề về lưu giữ trí nhớ, cả việc thu hồi và thừa nhận đều gặp vấn đề.

Ngoài ra, trí nhớ ngắn hạn cũng được gọi là trí nhớ công việc, là quá trình thực hiện nhiệm vụ tiếp theo bằng cách sử dụng thông tin sau khi lưu giữ thông tin trong khoảng thời gian ngắn. Trí nhớ ngắn hạn có nghĩa là sự lưu giữ tạm thời trước khi thông tin đi vào não bộ ổn định đưa vào trí nhớ dài hạn. Đặc điểm của trí nhớ công việc là trí nhớ này thường bị xóa đi sau khi thực hiện nhiệm vụ định trước.

Trí nhớ dài hạn có nghĩa là nhận biết nhiệm vụ mới và ghi nhớ nhiệm vụ mới một lần nữa sau khi trôi qua một thời gian định trước. Việc ghi nhớ mọi điều đã trải qua trong cuộc sống hàng ngày hoặc các nội dung đã được học lại một lần nữa sau một thời gian đã qua gần như tương ứng với trí nhớ dài hạn.

Các rối loạn về trí nhớ và nhận thức tương ứng với các loại bệnh rất nguy hiểm làm cho không thể duy trì cuộc sống hàng ngày, và bao gồm các bệnh gây ra bởi rất nhiều nguyên nhân và cơ chế khác nhau, ví dụ như lão hóa, bệnh Alzheimer, bệnh tâm thần phân liệt, bệnh Parkinson, bệnh Huntington, bệnh pick, bệnh Creutzfeldt-Jakob, trầm cảm, tổn thương đầu, đột quỵ, giảm oxy mô hệ thần kinh trung ương, thiếu máu não cục bộ, viêm não, lú lẫn, tổn thương não do chấn thương, hạ đường huyết, hội chứng Wernicke-Korsakoff, nghiện ma túy, động kinh, sán lá gan, xơ cứng chân hải mã, đau đầu, lão hóa não, sa sút trí tuệ, thoái hóa thùy trán-thái dương, khối u, giãn não thất áp lực bình thường, HIV, bệnh mạch não, bệnh não, bệnh tim mạch, mất trí nhớ, nhiễm xạ, bệnh chuyển hóa, suy tuyến giáp, suy giảm nhận thức nhẹ, thiếu nhận thức và thiếu tập trung. Để khắc phục các rối loạn về trí nhớ và nhận thức, đã có nhiều nỗ lực nghiên cứu khác nhau được thực hiện, nhưng đến nay, chưa có báo cáo hay ứng dụng nào về hiệu quả của các peptit tổng hợp có trình tự chính xác cũng như các chất có hiệu quả bảo vệ thần kinh tối ưu và hiệu quả cải thiện chức năng não bộ chống lại các bệnh liên quan đến hệ thống não bộ-thần kinh được đưa ra.

Do đó, sáng chế được thực hiện với mục đích đề xuất peptit dùng để cải thiện trí nhớ, khả năng học tập và nhận thức.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để đạt được mục đích nêu trên, phương án ví dụ của sáng chế đề xuất peptit bao

gồm trình tự axit amin với đầu tận cùng C là GAG.

Theo của sáng chế, peptit có số lượng gốc axit amin nằm trong khoảng từ 4 đến 6, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các độ dài này, và peptit có trình tự axit amin là GGAG, AGAG, QGAG, hoặc SGAGAG, nhưng sáng chế có thể không bị giới hạn ở các trình tự axit amin này.

Theo phương án khác của sáng chế, peptit có số lượng gốc axit amin nằm trong khoảng từ 5 đến 9, và peptit có trình tự axit amin là QAGAG, SGGAG, hoặc GAGGAGGAG, nhưng sáng chế có thể không bị giới hạn ở đó.

Theo khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất được phẩm được dùng để phòng và điều trị rối loạn về trí nhớ, học tập hoặc nhận thức, có chứa peptit theo sáng chế làm thành phần hoạt tính.

Theo sáng chế, rối loạn về trí nhớ, học tập hoặc nhận thức là rối loạn về trí nhớ, học tập hoặc nhận thức do lão hóa, bệnh Alzheimer, tâm thần phân liệt, bệnh Parkinson, bệnh Huntington, bệnh pick, bệnh Creutzfeldt-Jakob, trầm cảm, tổn thương đầu, đột quỵ, giảm oxy mô hệ thần kinh trung ương, thiếu máu não cục bộ, viêm não, lú lẫn, tổn thương não do chấn thương, hạ đường huyết, hội chứng Wernicke-Korsakoff, nghiện ma túy, động kinh, sán lá gan, xơ cứng chân hải mã, đau đầu, lão hóa não, sa sút trí tuệ, thoái hóa thùy trán-thái dương, khối u, giãn não thất áp lực bình thường, HIV, bệnh mạch não, bệnh não, bệnh tim mạch, mất trí nhớ, nhiễm xạ, bệnh chuyển hóa, suy tuyến giáp, suy giảm nhận thức nhẹ, thiếu nhận thức và thiếu tập trung, nhưng sáng chế có thể không bị giới hạn ở đó.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm dùng để tăng cường chức năng của não hoặc nhận thức, chứa peptit theo sáng chế dưới dạng thành phần hoạt tính. Theo sáng chế, chức năng não hoặc nhận thức là khả năng học tập, khả năng ghi nhớ, hoặc tập trung, nhưng sáng chế có thể không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất polynucleotit mã hóa peptit nêu trên, vector tái tổ hợp chứa polynucleotit, tế bào chủ được biến nạp với vector tái tổ hợp và phương pháp điều chế peptit theo sáng chế bao gồm nuôi cấy tế bào chủ này.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Theo sáng chế, có thể xác nhận rằng peptit có đầu tận cùng C là GAG có hiệu quả

cải thiện trí nhớ. Để peptit có hiệu quả, peptit cần phải là peptit có độ dài gồm có ít nhất 4 axit amin. Ngoài ra, peptit có đầu tận cùng C là GAG có độ dài gồm có từ 5 đến 9 axit amin cũng có hiệu quả tương tự. Kết quả là, peptit theo sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng chế phẩm để cải thiện trí nhớ, khả năng học tập, và khả năng nhận thức.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị minh họa hiệu quả nâng cao trí nhớ của peptit chứa trình tự axit amin có đầu tận cùng C là GAG thông qua thử nghiệm né tránh thụ động, trong đó trục y là thời gian (giây);

Fig.2 là đồ thị minh họa hiệu quả nâng cao trí nhớ của pepit chứa trình tự axit amin có đầu tận cùng C là GAG thông qua thử nghiệm mê cung chữ Y, trong đó trục y là tỷ lệ thay đổi tự phát (%);

Fig.3 là đồ thị minh họa hiệu quả nâng cao trí nhớ của pepit chứa trình tự axit amin có đầu tận cùng C gồm có từ 5 đến 9 axit amin là GAG thông qua thử nghiệm thông qua thử nghiệm né tránh thụ động; và

Fig.4 là đồ thị minh họa hiệu quả nâng cao trí nhớ của pepit chứa trình tự axit amin có đầu tận cùng C gồm có từ 5 đến 9 axit amin là GAG thông qua thử nghiệm mê cung chữ Y.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án thực hiện sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Theo một phương án, peptit được đề xuất bao gồm trình tự axit amin với đầu tận cùng C là GAG.

Theo sáng chế, peptit có nguồn gốc từ sản phẩm thủy phân tơ fibroin, nhưng sáng chế có thể không bị giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, peptit được tổng hợp nhân tạo, nhưng sáng chế có thể không bị giới hạn ở đó.

Theo phương án ví dụ khác của sáng chế, tốt nhất là, peptit có số lượng gốc axit amin nằm trong khoảng từ 4 đến 6, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở độ dài này, và peptit có trình tự axit amin là GGAG, AGAG, QGAG, hoặc SGAGAG, nhưng sáng chế có thể không bị giới hạn ở các trình tự axit amin đó.

Theo phương án ví dụ khác nữa của sáng chế, tốt nhất là, peptit có số lượng gốc axit amin nằm trong khoảng từ 5 đến 9, và peptit có trình tự axit amin là QAGAG, SGGAG, hoặc GAGGAGGAG, nhưng sáng chế có thể không bị giới hạn ở đó.

Peptit theo sáng chế bản thân có độ ổn định rất tốt, nhưng để cải thiện hơn nữa độ ổn định, các nhóm bảo vệ khác nhau có thể được sử dụng. Các ví dụ về các nhóm bảo vệ bao gồm nhóm axit amin, nhóm axetyl, nhóm florenyl metoxycarbonyl, nhóm formyl, nhóm palmitoyl, nhóm myristyl, nhóm stearyl và polyetylen glycol (PEG). Các nhóm bảo vệ có thể được liên kết vào các gốc axit amin khác nhau của peptit theo sáng chế, nhưng tốt nhất là có thể được liên kết vào các đầu mút N- hoặc C-.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất được phẩm được dùng để phòng và điều trị rối loạn về trí nhớ, học tập hoặc nhận thức, có chứa peptit theo sáng chế làm thành phần hoạt tính.

Theo phương án ví dụ của sáng chế, tốt nhất là, rối loạn về trí nhớ, học tập hoặc nhận thức là rối loạn về trí nhớ, học tập hoặc nhận thức do lão hóa, bệnh Alzheimer, tâm thần phân liệt, bệnh Parkinson, bệnh Huntington, bệnh pick, bệnh Creutzfeldt-Jakob, trầm cảm, tổn thương đầu, đột quỵ, giảm oxy mô hệ thần kinh trung ương, thiếu máu não cục bộ, viêm não, lú lẫn, tổn thương não do chấn thương, hạ đường huyết, hội chứng Wernicke-Korsakoff, nghiện ma túy, động kinh, sán lá gan, xơ cứng chân hải mã, đau đầu, lão hóa não, sa sút trí tuệ, thoái hóa thùy trán-thái dương, khối u, giãn não thất áp lực bình thường, HIV, bệnh mạch não, bệnh não, bệnh tim mạch, mất trí nhớ, nhiễm xạ, bệnh chuyển hóa, suy tuyến giáp, suy giảm nhận thức nhẹ, thiếu nhận thức và thiếu tập trung, nhưng sáng chế có thể không bị giới hạn ở đó.

Dược phẩm có thể chứa chất mang được dụng. Chất mang được dụng chứa trong chế phẩm thường được sử dụng trong công thức thuốc, và bao gồm lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, mannitol, tinh bột, gôm acacia, canxi phosphat, alginat, gelatin, canxi silicat, xenluloza vi tinh thể, polyvinylpyrrolidon, xenluloza, nước, siro, metylxenluloza, metylhydroxybenzoat, propylhydroxybenzoat, bột tan, magie stearat, dầu khoáng và tương tự, nhưng sáng chế có thể không bị giới hạn ở đó. Dược phẩm có thể còn bao gồm các chất bôi trơn, các tác nhân làm ẩm, chất ngọt, hương liệu, chất nhũ hóa, chất tạo huyền phù, chất bảo quản và tương tự bên cạnh các thành phần chính.

Dược phẩm có thể được dùng qua đường miệng hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa. Trong trường hợp dùng ngoài đường tiêu hóa, tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, tiêm bắp,

tiêm màng bụng, đưa vào nội mô, dùng tại chỗ, dùng qua đường mũi, dùng qua phổi, dùng qua trực tràng và tương tự có thể sử dụng.

Khi dùng qua đường miệng, vì protein hoặc peptit bị phân hủy, chế phẩm dùng đường miệng có thể được tạo công thức bằng cách phủ tác nhân hoạt động hoặc để được bảo vệ không bị phân hủy trong dạ dày. Hơn nữa, chế phẩm có thể được dùng cho bệnh nhân nhờ thiết bị bất kỳ trong đó được chất hoạt động có thể di chuyển đến tế bào đích.

Liều thích hợp của dược phẩm có thể được kê đơn dựa trên các yếu tố như phương pháp bào chế, dạng dùng, tuổi, cân nặng và giới tính của bệnh nhân, tình trạng bệnh lý, thực phẩm, thời gian dùng thuốc, đường dùng thuốc, tỷ lệ bài tiết, và độ nhạy đáp ứng thuốc. Liều thích hợp của chế phẩm có thể nằm trong khoảng từ 0,001 đến 100 mg/kg ở người lớn.

Thuật ngữ “liều có hiệu quả dược lý” có nghĩa là liều thích hợp để phòng hoặc điều trị rối loạn về trí nhớ, rối loạn về nhận thức hoặc rối loạn trong học tập.

Chế phẩm được tạo công thức sử dụng chất mang và/hoặc tá dược được dùng theo phương pháp có thể được thực hiện dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật để được bào chế ở dạng liều đơn vị hoặc được bào chế nhờ đưa vào dạng chứa đa liều. Trong trường hợp này, công thức có thể là dạng dung dịch, huyền phù, siro hoặc nhũ tương trong môi trường dầu hoặc nước hoặc ở dạng chất chiết, tán xạ, bột, hạt, viên nén hoặc viên nang và có thể còn bao gồm chất phân tán hoặc chất ổn định. Hơn nữa, chế phẩm có thể được dùng cho bệnh nhân dưới dạng thuốc điều trị riêng lẻ hoặc kết hợp với các thuốc điều trị khác, và được dùng theo thứ tự hoặc đồng thời với các thuốc điều trị ở các lĩnh vực liên quan.

Đồng thời, sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm dùng để tăng cường chức năng của não hoặc nhận thức, chứa peptit theo sáng chế dưới dạng thành phần hoạt tính.

Theo phương án ví dụ của sáng chế, tốt hơn là, chức năng não hoặc nhận thức là khả năng học tập, khả năng ghi nhớ, hoặc tập trung, nhưng sáng chế có thể không bị giới hạn ở đó.

Lượng peptit trong thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế có thể được bổ sung là từ 0,01 đến 15% trọng lượng so với tổng trọng lượng thực phẩm, và chế phẩm đồ uống bổ dưỡng có thể được bổ sung ở tỷ lệ từ 0,02 đến 5 g, và tốt nhất là từ 0,3 đến 1 g cho

mỗi 100 ml, nhưng có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này tùy theo sản phẩm.

Chế phẩm thực phẩm có thể còn bao gồm chất phụ gia thực phẩm bổ sung dinh dưỡng có thể chấp nhận được về mặt tế bào học bên cạnh peptit và có thể được bào chế ở dạng viên nén, viên nang, viên tròn, dạng bào chế lỏng, thạch, bột, hạt và tương tự.

Trong chế phẩm thực phẩm theo sáng chế, các thành phần khác không bị giới hạn cụ thể trừ việc chứa peptit như là thành phần bắt buộc, và tương tự, đối với đồ uống nói chung, các chất điều vị khác nhau, các chất tinh bột tự nhiên, hoặc tương tự có thể được bao gồm như là thành phần bổ sung. Các ví dụ về các cacbohydrat tự nhiên được đề cập ở trên bao gồm đường nói chung, chẳng hạn như các monosacarit, ví dụ, glucoza, fructoza, và tương tự; các đisacarit, ví dụ, maltoza, sucroza, và tương tự; và các polysacarit, ví dụ, dextrin, xyclodextrin, và tương tự, và các dẫn xuất rượu của đường, chẳng hạn như xylitol, sorbitol, và erythritol. Đối với các chất điều vị ngoài các ví dụ nêu trên, các chất điều vị tự nhiên (thaumatin, chất chiết stevia (cỏ ngọt) (ví dụ, rebaudiosit A, glycyrrhizin, và tương tự) và các chất điều vị tổng hợp (sacarin, aspartam, và tương tự) có thể được sử dụng. Lượng cacbohydrat tự nhiên được sử dụng có thể thường nằm trong khoảng từ 1 đến 20 g, và tốt nhất là khoảng từ 5 đến 12 g cho mỗi 100 ml chế phẩm theo sáng chế.

Chế phẩm thực phẩm theo sáng chế có thể bao gồm các chất dinh dưỡng, các vitamin, các chất khoáng (electrolytes) khác nhau, các chất điều vị khác nhau chẳng hạn như các chất điều vị tổng hợp và các chất điều vị tự nhiên, các chất tạo màu và các chất làm dày (pho mát, sô-cô-la, và tương tự), axit pectic và muối của nó, axit alginic và muối của nó, axit hữu cơ, chất làm dày dạng keo bảo vệ, chất điều chỉnh độ pH, chất ổn định, chất bảo quản, glycerin, rượu, axit carbonic được sử dụng trong đồ uống có ga, hoặc tương tự, bên cạnh các thành phần chính. Bên cạnh đó, chế phẩm thực phẩm theo sáng chế có thể bao gồm cùi hoa quả để sản xuất các loại nước ép tự nhiên và nước trái cây, và nước rau quả. Các thành phần có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp với nhau. Tỷ lệ các thành phần thường được chọn trong khoảng từ 0 đến 20 phần trọng lượng so với hợp chất theo sáng chế.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa peptit theo sáng chế.

“Polynucleotit” là hợp chất trùng hợp (polyme) của deoxyribonucleotit hoặc

ribonucleotit tồn tại ở dạng sợi đơn hoặc sợi đôi. Polynucleotit bao gồm trình tự hệ gen ARN, trình tự ADN (gADN và cADN) và ARN được sao chép từ đó, và bao gồm cả các dạng tương tự của các polynucleotit trừ khi có chỉ định cụ thể khác.

Polynucleotit không chỉ bao gồm trình tự nucleotit mà còn có cả trình tự bổ sung cho trình tự nucleotit. Trình tự bổ sung không chỉ bao gồm trình tự bổ sung hoàn chỉnh mà còn bao gồm trình tự bổ sung cơ bản. Trình tự có nghĩa là trình tự có thể lai với trình tự nucleotit dưới các điều kiện nghiêm ngặt đã biết trong lĩnh vực sinh học phân tử.

Hơn nữa, polynucleotit có thể được biến đổi. Sự biến đổi bao gồm thêm, bớt hoặc thế không bảo thủ hoặc thế bảo thủ ở nucleotit. Cần hiểu rằng polynucleotit mã hóa trình tự axit amin bao gồm trình tự nucleotit có sự tương đồng đáng kể so với trình tự nucleotit. Sự tương đồng đáng kể có thể là trình tự có độ tương đồng ít nhất là 80%, độ tương đồng ít nhất là 90%, hoặc độ tương đồng ít nhất là 95%, trong trường hợp phân tích trình tự được sắp xếp để tương ứng tối đa với trình tự khác bất kỳ từ trình tự nucleotit và được sắp xếp bằng cách sử dụng thuật toán thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất vector tái tổ hợp chứa polynucleotit theo sáng chế.

Thuật ngữ “vector” có nghĩa là phương tiện để biểu hiện gen đích trong tế bào chủ. Ví dụ, vector bao gồm vector plasmid, vector cosmid vector, và các vector virus chẳng hạn như vector thực khuẩn thể, vector adenovirus, vector retrovirus, và vector virus kết hợp nhiều tuyến. Vector có thể được sử dụng làm vector tái tổ hợp có thể được tạo ra bằng cách thao tác các plasmid (ví dụ, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, các chuỗi pGEX, các chuỗi pET, pUC19, và tương tự), các thực khuẩn thể (ví dụ, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δz1, M13, và tương tự) hoặc virus (ví dụ, Cytomegalovirus (CMV), Simian virus 40 (SV40), và tương tự).

Trong vector tái tổ hợp, polynucleotit mã hóa peptit có thể được liên kết hoạt động với promotor.

Thuật ngữ “liên kết hoạt động” có nghĩa là sự gắn dính chức năng giữa trình tự điều hòa biểu hiện nucleotit (ví dụ, trình tự promotor) và trình tự nucleotit khác. Theo đó, trình tự điều hòa có thể điều hòa sự phiên mã và/hoặc dịch mã của trình tự nucleotit khác nhờ sự bám dính chức năng.

Vector tái tổ hợp có thể thường được xây dựng làm vector tạo dòng hoặc vector biểu hiện. Vector biểu hiện có thể sử dụng các vector thông thường được sử dụng để biểu hiện các protein ngoại lai trong thực vật, động vật hoặc vi sinh vật trong lĩnh vực tương ứng. Vector tái tổ hợp có thể được xây dựng bằng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực tương ứng.

Vector tái tổ hợp có thể được xây dựng bằng cách sử dụng tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn làm tế bào chủ. Ví dụ, vector được sử dụng là vector biểu hiện, và trong trường hợp sử dụng tế bào nhân sơ làm tế bào chủ, vector thường bao gồm promoter mạnh (ví dụ, promoter pL λ , promoter trp, promoter lac, promoter tac, promoter T7, và tương tự), vị trí bám dính ribôxôm để khởi tạo dịch mã, và trình tự kết thúc sao chép/dịch mã. Trong trường hợp sử dụng tế bào nhân chuẩn làm tế bào chủ, gốc sao chép thực hiện chức năng trong tế bào nhân chuẩn có trong vector bao gồm gốc sao chép f1, gốc sao chép SV40, gốc sao chép pMB1, gốc sao chép adeno, gốc sao chép AAV, gốc sao chép CMV, gốc sao chép BBV, và tương tự, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, promoter (ví dụ, promoter metallothionein) có nguồn gốc từ hệ gen của tế bào động vật có vú hoặc promoter (ví dụ, promoter pha trễ của adenovirus, promoter 7.5K của virus bệnh đậu mùa, promoter SV40, promoter cytomegalovirus (CMV) và promoter tk của virus Herpes (Herpes Simplex Virus - HSV)) có nguồn gốc từ các virus trên động vật có vú có thể được sử dụng, và trình tự bổ sung đuôi poly(A) vào ARN thông tin (polyadenylation) thường được sử dụng làm trình tự kết thúc phiên mã.

Đồng thời, sáng chế đề xuất tế bào chủ được biến nạp với vector tái tổ hợp theo sáng chế.

Tế bào chủ theo sáng chế có thể sử dụng tế bào chủ bất kỳ đã biết trong lĩnh vực tương ứng. Trong trường hợp tế bào chủ là tế bào nhân sơ, các chủng vi khuẩn *E. coli*, chẳng hạn như *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, và *E. coli* W3110, các chủng *bacillus*, chẳng hạn như *bacillus subtilis* và *bacillus thuringiensis*, và các chủng enterobacteriaceae, chẳng hạn như *salmonella typhimurium*, *serratia marcescens* và các loài vi khuẩn *pseudomonas* khác có thể được sử dụng. Trong trường hợp biến nạp vào tế bào nhân chuẩn, nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*), các tế bào ở côn trùng, các tế bào ở thực vật và các tế bào ở động vật, ví dụ, các dòng tế bào SP2/0, dòng tế bào K1 ở chuột túi má Trung Quốc (Chinese hamster ovary - CHO), dòng tế bào DG44 ở chuột túi má Trung Quốc CHO, PER.C6, W138,

BHK, COS-7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN, MDCK, và tương tự có thể được sử dụng.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế peptit theo sáng chế bao gồm nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế.

Việc biến nạp polynucleotit hoặc vector tái tổ hợp có chứa polynucleotit vào tế bào chủ có thể sử dụng phương pháp biến nạp đã biết trong lĩnh vực công nghệ sinh học. Phương pháp biến nạp được sử dụng có thể là phương pháp CaCl_2 hoặc phương pháp điện biến nạp, hoặc tương tự khi tế bào chủ là tế bào nhân sơ, và các phương pháp vi tiêm, kết tủa canxi phosphat, điện biến nạp, biến nạp gián tiếp qua lipôxôm và bắn gen khi tế bào chủ là tế bào nhân chuẩn, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Phương pháp sàng lọc tế bào chủ đã biến nạp có thể được thực hiện dễ dàng bằng cách sử dụng kiểu hình được biểu hiện bởi chỉ thị lựa chọn theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực công nghệ sinh học. Ví dụ, khi chỉ thị lựa chọn là gen kháng kháng sinh cụ thể, thể biến nạp có thể được sàng lọc dễ dàng bằng cách nuôi cấy thể biến nạp trong môi trường chứa chất kháng sinh.

Các ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ thực hiện sáng chế. Tuy nhiên, các ví dụ này là các ví dụ minh họa cho sáng chế và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1: Tổng hợp peptit

Các peptit tổng hợp được thu từ ngân hàng gen Genscript (New Jersey, USA). Các peptit được tổng hợp bằng phương pháp FlexPeptideTM và được xác nhận bằng cách sử dụng sắc ký lỏng cao áp và sắc khí khối phổ. Các trình tự axit amin của các peptit tổng hợp được liệt kê trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

Tên peptit (mã trình tự)	Trình tự axit amin
Peptit-1	AG
Peptit-2	GAG
Peptit-3	AGAG
Peptit-4	QGAG
Peptit-5	GGAG

Peptit-6	SGAGAG
----------	--------

Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã tổng hợp thêm các peptit (các trình tự từ 7 đến 9) có các trình tự axit amin từ 5 đến 9 để thực hiện các thử nghiệm bổ sung. Các peptit tổng hợp này được thu từ ngân hàng gen Genscript (New Jersey, USA). Các peptit được tổng hợp bằng phương pháp FlexPeptide™ và được xác nhận bằng cách sử dụng sắc ký lỏng cao áp và sắc khí khối phổ. Các trình tự axit amin của các peptit tổng hợp là như sau:

QAGAG (trình tự số 7)

SGGAG (trình tự số 8)

GAGGAGGAG (trình tự số 9)

Ví dụ 2: Chất thử và động vật thử nghiệm

Scopolamin được mua từ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Chuột đực IRC 4 tuần tuổi được mua từ Korean BioLink Co. (Chungbuk, Korea). Sau thời gian thích ứng 1 tuần, chuột được sử dụng trong thử nghiệm và tất cả các chất thử được đưa vào chuột qua màng bụng. Các rối loạn về trí nhớ xảy ra khi tiêm scopolamine 30 phút trước khi thử nghiệm và các peptit tổng hợp được tiêm vào tại thời điểm 30 phút trước khi tiêm scopolamin.

Ví dụ 3: Xác nhận hiệu quả của peptit trong thử nghiệm né tránh thụ động

Thử nghiệm né tránh thụ động được thực hiện trong các buồng sáng và buồng tối trong cùng một chuồng. Sàn của mỗi buồng được tạo hình bằng các thanh thép không gỉ đường kính 2 mm được đặt cách nhau ở các khoảng cách 1 cm. Các ô sáng (20 x 20 x 20 cm) có bóng đèn công suất 100 W chiếu sáng. Các ô sáng này được nối với cửa sập.

Với thử nghiệm tiếp nhận, chuột được đặt trong phòng sáng sau khi tiêm các chất thử và cửa được mở sau 10 giây. Khi chuột đã đi hoàn toàn vào phòng tối, cửa được đóng lại và khóa điện được kích hoạt trong 3 giây. Thử nghiệm duy trì được thực hiện vào thời điểm 24 giờ sau khi thử nghiệm tiếp nhận và chuột ở trong buồng sáng. Thời gian chờ của các thử nghiệm tiếp nhận và duy trì được đo là thời gian đến khi chuột thí nghiệm đi vào buồng tối của chuồng sau khi cửa được mở.

Thời gian chờ duy trì trong thử nghiệm né tránh thụ động đại diện cho chức năng ghi nhớ dài hạn trong động vật gặm nhấm. Theo đó, hiệu quả của peptit tơ fibroin lên

sự suy giảm trí nhớ gây ra bởi scopolamin được xác nhận bằng cách sử dụng thử nghiệm né tránh thụ động bước qua và kết quả được minh họa trên Fig.1.

Như được thể hiện trên Fig.1, ở thử nghiệm duy trì, thời gian chờ ở chuột đã được xử lý bằng nước muối thông thường là 180 giây (thời gian giới hạn lớn nhất). Điều này xác nhận rằng sự đáp ứng bước qua trung bình trong nhóm được tiêm scopolamin với sự suy giảm trí nhớ do tiêm scopolamin được giảm đáng kể so với nhóm được xử lý bằng nước muối thông thường. Trước khi tiêm scopolamin, trong các nhóm được thử nghiệm với các peptit tổng hợp, quan sát thấy hiệu quả cải thiện nhẹ ở nhóm được tiêm peptit-1 gồm có hai axit amin so với nhóm chỉ được tiêm scopolamin, trong khi ít hiệu quả ở nhóm được tiêm peptit-3 so với nhóm chỉ được tiêm scopolamin. Tuy nhiên, đã có xác nhận rằng ở các nhóm peptit-2, peptit-4, peptit-5 và peptit-6, trí nhớ bị suy giảm do scopolamin được cải thiện gần với nhóm thông thường được tiêm nước muối. Từ kết quả trên, có thể xác nhận rằng peptit có đầu tận cùng C là GAG có hiệu quả cải thiện trí nhớ, và để có hiệu quả, peptit cần là peptit có độ dài gồm có ít nhất bốn axit amin.

Như được thể hiện trên Fig.3, ở thử nghiệm duy trì, thời gian chờ ở chuột đã được xử lý bằng nước muối thông thường là 180 giây (thời gian giới hạn lớn nhất). Điều này xác nhận rằng sự đáp ứng bước qua trung bình trong nhóm được tiêm scopolamin với sự suy giảm trí nhớ do tiêm scopolamin được giảm đáng kể so với nhóm được xử lý bằng nước muối thông thường. Trước khi tiêm scopolamin, ở các nhóm được tiêm peptit gồm có từ 5 đến 9 axit amin theo sáng chế, trí nhớ bị suy giảm do scopolamin được cải thiện gần với nhóm thông thường được tiêm nước muối. Từ kết quả trên, có thể xác nhận rằng peptit có đầu tận cùng C là GAG có hiệu quả cải thiện trí nhớ.

Ví dụ 4: Xác nhận hiệu quả của peptit ở thử nghiệm mê cung chữ Y

Chuột thí nghiệm được đặt tại một đầu của mê cung chữ Y với độ dài của mỗi nhánh là 30 cm, độ rộng là 5 cm, và độ cao là 13 cm và thứ tự lối vào mỗi nhánh được ghi lại. Sự thay đổi được đánh giá là thành công nếu chuột lần lượt đi vào ba nhánh khác nhau. Sự thay đổi tự phát được xác định bằng công thức sau.

$$\text{Thay đổi tự phát (\%)} = \frac{\text{số lần thay đổi}}{(\text{tổng số lối đi} - 2)} \times 100$$

Như được thể hiện trên Fig.2, có thể xác nhận là giá trị thay đổi tự phát trung bình của nhóm được tiêm scopolamin với sự suy giảm trí nhớ do tiêm scopolamin thấp hơn đáng kể so với nhóm tiêm nước muối thông thường. Trong các nhóm được tiêm các

peptit tổng hợp trước khi tiêm scopolamin, có thể xác nhận rằng nhóm các peptit-1 và peptit-2 gồm có 2 và 3 axit amin, tương ứng, đạt được hiệu quả cải thiện nhẹ so với nhóm chỉ được tiêm scopolamin, nhưng ở nhóm từ peptit-3 đến peptit-6, trí nhớ bị suy giảm do scopolamin được cải thiện đáng kể. Từ kết quả trên, có thể xác nhận rằng peptit có đầu tận cùng C là GAG có hiệu quả cải thiện trí nhớ, và để có hiệu quả, peptit cần là peptit có độ dài gồm có ít nhất bốn axit amin.

Ngoài ra, như được thể hiện trên Fig.4, có thể xác nhận rằng giá trị thay đổi tự phát trung bình của nhóm được tiêm scopolamin với sự suy giảm trí nhớ do tiêm scopolamin được giảm đáng kể so với nhóm tiêm nước muối thông thường. Ở các nhóm được tiêm các peptit gồm có từ 5 đến 9 axit amin theo sáng chế, trí nhớ bị suy giảm do scopolamin được cải thiện đáng kể, và ở các nhóm được tiêm các peptit gồm có các trình tự số 2 và 3, có hiệu quả vượt trội so với nhóm đối chứng. Từ kết quả trên, hiệu quả cải thiện trí nhớ của peptit có đầu tận cùng C là GAG được xác nhận.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Peptit bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm QGAG, QAGAG, SGGAG và GAGGAGGAG.
2. Peptit theo điểm 1, trong đó peptit được tổng hợp nhân tạo.
3. Dược phẩm dùng để phòng hoặc điều trị rối loạn về trí nhớ, nhận thức hoặc học tập, trong đó dược phẩm chứa peptit chỉ bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm AGAG, QGAG, SGAGAG, QAGAG, SGGAG và GAGGAGGAG làm thành phần hoạt tính.
4. Chế phẩm thực phẩm để tăng cường chức năng não bộ hoặc nhận thức, trong đó chế phẩm thực phẩm chứa peptit chỉ bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm AGAG, QGAG, SGAGAG, QAGAG, SGGAG và GAGGAGGAG làm thành phần hoạt tính.
5. Polynucleotit mã hóa peptit theo các điểm 1 hoặc 2.
6. Vector tái tổ hợp có chứa polynucleotit theo điểm 5.
7. Tế bào chủ được biến nạp với vector tái tổ hợp theo điểm 6.
8. Phương pháp sản xuất peptit bao gồm nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 7.

Fig.1

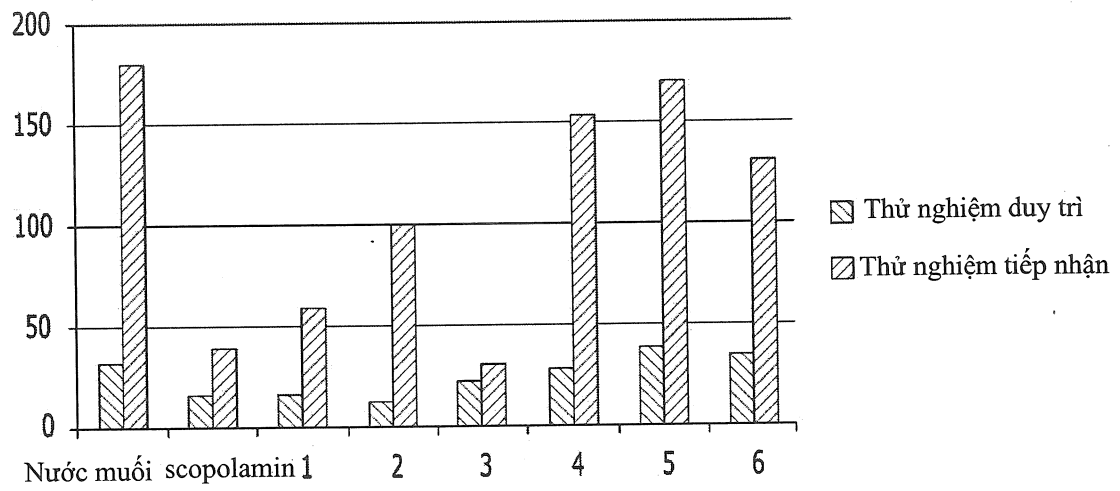


Fig.2

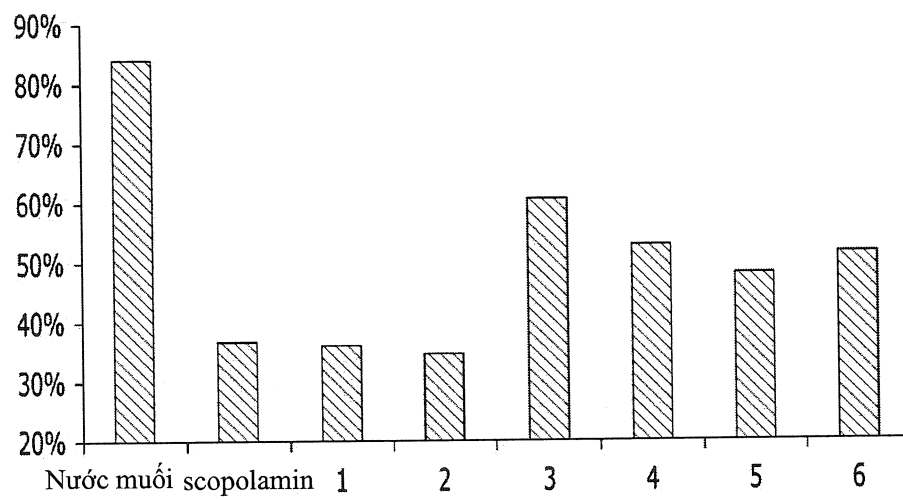


Fig.3

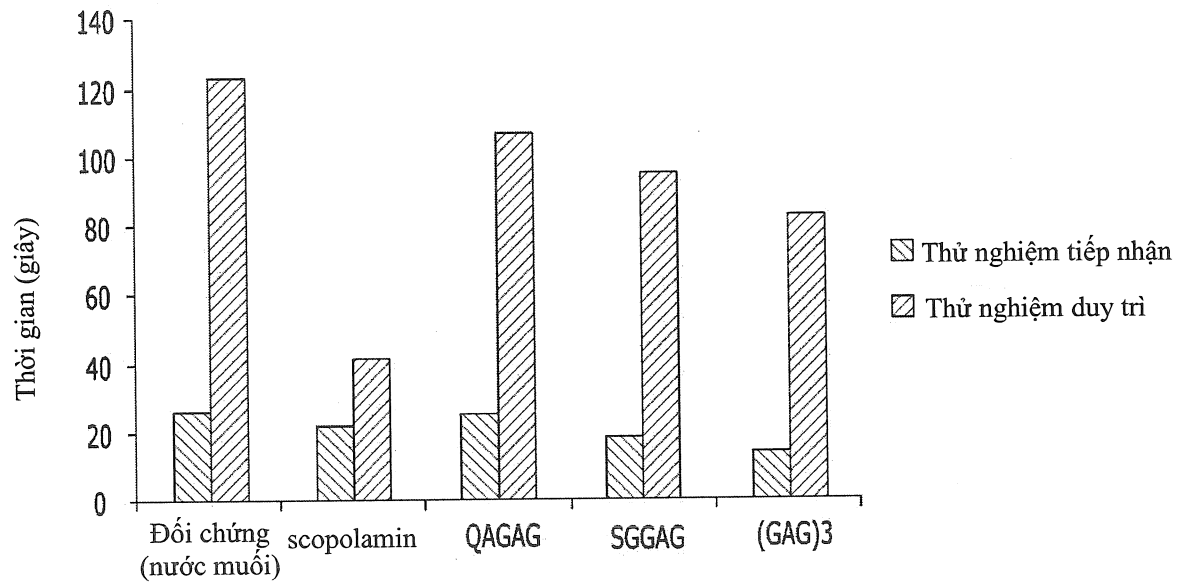
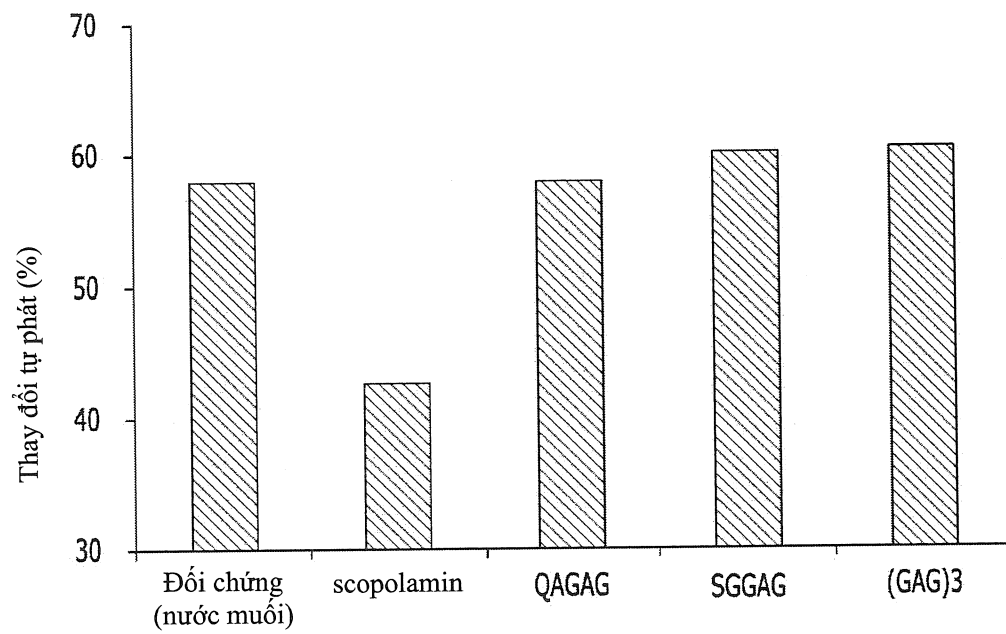


Fig.4



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BrainOn Inc.
 <120> PEPTIT CÓ HIỆU QUẢ CẢI THIẾN TRÍ NHỚ, DƯỢC PHẨM, CHẾ PHẨM THỰC PHẨM CHỨA PEPTIT, POLYNUCLEOTIT, VECTO TẢI TỔ HỢP, TẾ BÀO CHỦ, VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PETIT NÀY
 <130> PCT16-00
 <150> KR 10-2015-0183011
 <151> 2015-12-21
 <150> KR 10-2016-0026600
 <151> 2016-03-04
 <160> 9
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 2
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> peptit
 <400> 1
 Ala Gly
 1
 <210> 2
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> peptit
 <400> 2
 Gly Ala Gly
 1
 <210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> peptit

<400> 3
Ala Gly Ala Gly
1

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

<220>
<223> peptit

<400> 4
Gln Gly Ala Gly
1

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

<220>
<223> peptit

<400> 5
Gly Gly Ala Gly
1

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

<220>
<223> peptit

<400> 6
Ser Gly Ala Gly Ala Gly
1 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đột biến

<400> 7
Gln Ala Gly Ala Gly

1	5
---	---

<210>	8
<211>	5
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo
<220>	
<223>	Đột biến

<400>	8
Ser Gly Gly Ala Gly	
1	5

<210>	9
<211>	9
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo
<220>	
<223>	Đột biến

<400>	9
Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly	
1	5