



(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) 
1-0022200

(51)⁷ **A61L 17/00, A61K 38/00, A61L 31/16,**
A61P 7/04

(13) **B**

(21) 1-2011-01156

(22) 06.10.2009

(86) PCT/JP2009/067367 06.10.2009

(87) WO2010/041636A1 15.04.2010

(30) 2008-259860 06.10.2008 JP

2008-316133 11.12.2008 JP

(45) 25.11.2019 380

(43) 25.08.2011 281

(73) 3-D MATRIX, LTD. (JP)

3-2-4, Kojimachi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0083 Japan

(72) TAKAMURA, Kentaro (JP), GOJO, Satoshi (JP), KOBAYASHI, Satoru (JP)

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) **TÁC NHÂN LÀM LÀNH MÔ, TÁC NHÂN CẦM MÁU VÀ TÁC NHÂN NGĂN CHẶN SỰ XUẤT HUYẾT**

(57) Sáng chế đề cập đến tác nhân làm lành mô peptit có thể hấp thu sinh học mà có thể được phủ lên các động vật có vú lớn kể cả người, tác nhân làm lành mô peptit thu được bằng quá trình tổng hợp nhân tạo để tránh các vấn đề về nhiễm trùng bởi virus và tương tự. Tác nhân làm lành mô chứa peptit, trong đó peptit là amphiphil peptit có từ 8 đến 200 gốc axit amin với các axit amin ưa nước và các axit amin kỵ nước được liên kết luân phiên, và là peptit tự lắp ghép có cấu trúc β trong dung dịch chứa nước với sự có mặt của độ pH sinh lý và/hoặc cation.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến tác nhân làm lạnh mô chứa hydrogel peptit tự lắp ghép.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự làm lạnh mô nhằm ngăn chặn sự chảy các chất lưu trong cơ thể (máu, dịch mô và các thể tương tự khác) gây ra bởi sự tổn thương mô, chủ yếu trong các trường hợp lâm sàng, bao gồm cả phẫu thuật. Việc ngăn chặn một cách hữu hiệu sự chảy dịch cơ thể từ các vị trí tổn thương liên quan đến sự hỗ trợ cải thiện cuộc sống trong khi phẫu thuật và cải thiện chất lượng sống sau phẫu thuật (QOL).

Sự cầm máu là rất quan trọng trong lâm sàng vì các lý do sau đây:

1. Sự mất máu là nguyên nhân chính dẫn đến tử vong, với các nguyên nhân gây mất máu bao gồm chấn thương nghiêm trọng, phình mạch, loét dạ dày và thực quản, và đứt giãn tĩnh mạch thực quản. Khả năng tử vong là cao khi sự xuất huyết không được ngăn chặn ngay.

2. Sự xuất huyết trong khi phẫu thuật là mối quan tâm chính, vì sự xuất huyết có thể dẫn đến sự nhiễm trùng toàn thân hoặc loạn chức năng cơ quan. Sự xuất huyết không chỉ cản trở đối tượng phẫu thuật, mà việc loại bỏ máu xuất huyết cũng là yếu tố gây cản trở trong quá trình phẫu thuật.

3. Sự xuất huyết cũng là vấn đề với sự phẫu thuật gây tổn thương tối thiểu cho cơ thể (phẫu thuật nội soi và tương tự), và chuyển sang phẫu thuật cắt có thể là cần thiết khi sự xuất huyết không cầm máu kịp thời.

Các phương pháp sau đây dùng để cầm máu:

1. Phương pháp ép trực tiếp mạch máu ở vị trí xuất huyết (kẹp chặt). Nhược điểm của phương pháp này là thời gian và nỗ lực cần thiết để duy trì áp suất, trong khi bệnh nhân có nguy cơ tụ máu.

2. Các phương pháp ngăn chặn sự xuất huyết khác nhờ phương tiện vật lý, như các phương pháp kẹp hoặc ghim gần vị trí xuất huyết, hoặc các phương pháp đặt nút hoặc que bông lên vị trí xuất huyết. Nhược điểm của các phương pháp ngăn chặn sự xuất huyết này là khó khống chế khi sự xuất huyết xảy ra từ nhiều mạch máu nhỏ.

3. Các phương pháp làm đông máu nhờ nhiệt và đốt mạch máu xuất huyết (dao đốt điện). Nhược điểm của các phương pháp này là làm cho mô xung quanh bị tổn thương bởi nhiệt và bệnh nhân sẽ tổn thương nhiều hơn, trong khi các dụng cụ y học được sử dụng đòi hỏi các chuyên gia có trình độ cao (phương pháp không được sử dụng ngoài tổ chức y tế).

Các tác nhân sau đây có tác dụng cầm máu.

1. Axit alginic
2. Que bông gelatin
3. Các sợi collagen
4. Bột dẻo fibrin

Các sợi collagen và bột dẻo fibrin thường được sử dụng trong lâm sàng làm vật liệu ngăn chặn sự xuất huyết hữu hiệu, nhưng trong thực tế chúng có nhược điểm là (1) các sợi gelatin và collagen là collagen của động vật và bột dẻo fibrin là sản phẩm có nguồn gốc từ động vật thu được bằng cách sử dụng chế phẩm máu và trombin của bò, và do vậy có nguy cơ nhiễm trùng, và (2) chúng không trong suốt và do vậy có thể che khuất vị trí phẫu thuật.

Heparin huyết có thể được gây ra, trong đó chức năng làm đông máu của bệnh nhân bị giảm trong khi phẫu thuật. Heparin được sử dụng để kìm hãm sự đông máu trong khi phẫu thuật khi sử dụng máy tim-phổi nhân tạo. Máy tim phổi nhân tạo là vật thể lạ đối với cơ thể, và khi máu được tuần hoàn qua máy tim phổi nhân tạo, máu đông ngay và gây tắc mạch máu, đến mức cần sử dụng heparin trong máu trước khi tuần hoàn ngoài thân.

Các sợi collagen và bột dẻo fibrin sử dụng hệ thống gây đông máu của cơ thể để cầm máu, và do vậy có tác dụng cầm máu thấp hơn đối với heparin huyết.

Tác dụng cầm máu thấp hơn có xu hướng gây ra sự xuất huyết lớn hơn và như vậy gia tăng nhu cầu truyền máu trong thời gian lâu hơn cũng cần thiết để cầm máu hoàn toàn khi kết thúc quá trình tuần hoàn ngoài thân. Như vậy, nhu cầu về chất liệu ngăn chặn sự xuất huyết có hiệu quả không thấp hơn heparin huyết và không sử dụng tác nhân gây đông máu đã được mong muốn.

Chỉ khâu mạch máu không chỉ cần thiết dùng trong phẫu thuật tim mạch, mà còn cần thiết để phẫu thuật trong màng bụng nói chung. Do có một lượng nhỏ máu chảy ra từ đường khâu mạch máu sau khi phẫu thuật, nên cần có vật liệu ngăn chặn sự xuất huyết có tác dụng cầm máu lâu dài.

Việc chảy dịch mật hoặc tuyến tụy là triệu chứng mà trong đó dịch mật hoặc dịch tuyến tụy bị chảy do phẫu thuật hệ thống mật hoặc do viêm tụy hoặc phẫu thuật tuyến tụy mà tác động bất lợi đến các cơ quan khác. Hiện nay, chưa có chất nào được biết là có tác dụng kìm hãm hữu hiệu sự chảy dịch mật hoặc tuyến tụy và có thể được ứng dụng trong lâm sàng, và do vậy cần có phương pháp ngăn chặn an toàn và hiệu quả sự chảy dịch mật hoặc tuyến tụy.

Ngoài ra, việc thoát khí trong phổi được coi là triệu chứng của sự tràn khí màng phổi tự phát liên quan đến sự vỡ nang phế nang, hoặc tràn khí màng phổi do chấn thương xảy do bị gãy xương sườn hoặc chọc ống thông đường tiêu. Tùy vào các triệu chứng mà có thể cần phải chờ để lên da non tự nhiên, và phương pháp đơn giản là tạo ra một lớp phía trên ở vùng bị tác động và dính nó vào mô phổi nhằm bít kín lỗ hở của nang được cho là phương pháp điều trị chứng tràn khí màng phổi đơn giản và có an toàn cao.

Các kỹ thuật cắt nội soi các vết thương liên tục được phát triển cùng với các tiến bộ trong công nghệ nội soi. Cụ thể, các phương pháp phẫu thuật đang được hoàn thiện để cắt nội soi các vết thương của các polyp hoặc ung thư giai đoạn sớm ở đường ruột-dạ dày, bao gồm thực quản, dạ dày và ruột (ung thư bề mặt được cho là không có sự di căn hạch bạch huyết). Trong quá trình tách niêm mạc bằng cách nội soi, thường sử dụng dung dịch muối ưu trương hoặc tương tự tiêm vào lớp dưới niêm mạc bao gồm vị trí thương tổn đến vị trí thương tổn bị

sung phòng, và vị trí cắt bỏ được giữ trong khi cắt vị trí thương tổn chứa mô, chẳng hạn, bằng dao đốt điện.

Trong kỹ thuật này, dung dịch như dung dịch muối ưu trương được tiêm vào lớp dưới niêm mạc để tách vị trí thương tổn khỏi lớp cơ chính, nhưng các dung dịch có độ nhớt thấp như dung dịch muối không thể duy trì sự căng phòng tại vị trí tổn thương trong quá trình phẫu thuật, và do vậy sử dụng việc truyền dung dịch sẽ cho phép làm duy trì sự căng phòng các vùng vị tác động trong suốt thời gian phẫu thuật là được mong muốn.

Các phương pháp kìm hãm sự xuất huyết từ các vị trí cắt bỏ tổn thương bằng cách tiêm tác nhân gây co mạch như trombin qua ống thông cũng được sử dụng, nhưng chưa hình thành được các phương thức hữu hiệu để cầm máu hoàn toàn, và do vậy phương pháp chặn đứng nhanh chóng sự xuất huyết sau khi cắt cũng được mong muốn.

Các sự tiến bộ trong quá trình xử lý ống thông đã dẫn đến sự hình thành các phương pháp phẫu thuật để tiêu diệt khối u hoặc các u cơ bằng cách bít động mạch dẫn vào các vị trí tổn thương, theo đó không chế dòng máu chảy vào khối u và các u cơ. Cụ thể, các phương pháp này gồm bít động mạch gan, bít động mạch buồng trứng và bít động mạch não.

Trong các kỹ thuật này, collagen được chiết từ động vật khác nguồn gốc, hoặc chất lỏng như rượu etylen-vinyl, được truyền để bít động mạch, nhưng điều này làm nảy sinh các vấn đề liên quan đến nguy cơ nhiễm trùng và tính độc. Do vậy, cần phát triển về dung dịch truyền không có nguy cơ nhiễm trùng và độc tính thấp.

Dung dịch truyền mà có thể chứa tác nhân điều trị ung thư được bổ sung hoặc thuốc tương phản cũng được mong muốn.

Các peptit tự lắp ghép có đặc tính nhờ đó các phân tử peptit tạo ra các sự tự lắp ghép được bố trí cân đối theo trình tự axit amin của chúng. Trong những năm gần đây, các peptit này có hướng được sử dụng làm vật liệu mới bởi vì các đặc tính lý, hoá và sinh học của chúng.

Các peptit tự lắp ghép có cấu trúc thay thế giữa các axit amin ưa nước được tích điện và các axit amin kỵ nước trung hoà điện, và việc thay thế phân bố điện tích dương và điện tích âm, nhờ đó chúng có cấu trúc β ở độ pH và nồng độ muối sinh lý.

Các axit amin ưa nước mà có thể được sử dụng bao gồm axit amin có tính axit như axit aspartic và axit glutamic, và axit amin có tính kiềm như arginin, lysin, histidin và ornithin. Về các axit amin kỵ nước có thể được sử dụng là alanin, valin, leucin, isoleucin, methionin, phenylalanin, tyrosin, tryptophan, serin, threonin hoặc glyxin.

Tính tự lắp ghép của các peptit xảy ra trong các điều kiện sau đây.

(1) Các phân tử peptit có cấu trúc β trong dung dịch chứa nước, trong đó các axit amin ưa nước có điện tích và các axit amin kỵ nước trung hoà điện được phân bố không đều ở hai phía của các phân tử peptit.

(2) Cấu trúc β dẫn đến sự phân bố điện tích bổ sung giữa các phân tử liên kề.

(3) Cấu trúc β dẫn đến liên kết kỵ nước đầy đủ giữa các phân tử liên kề.

(4) Điện tích của các mạch nhánh axit amin được chặn bởi các muối vô cơ hoá trị một.

(5) Các phân tử là trung hoà tĩnh điện gần với điểm đẳng điện của peptit.

Người ta cho rằng sự tự lắp ghép xảy ra bởi cơ chế sau đây khi các điều kiện này được thoả mãn.

(1) Sự phân bố thay thế điện tích dương và điện tích âm trong các phân tử peptit gây ra lực hút giữa các phân tử.

(2) Các liên kết kỵ nước được tạo ra giữa các mạch nhánh axit amin trung tính của các phân tử liên kề.

(3) Sự phân bố điện dương/âm dẫn đến sự sắp thẳng hàng hỗ trợ giữa các phân tử liên kề, và lực liên kết giữa các phân tử được tăng cường.

(4) Phân tử tập hợp dần dần đến mức, tạo ra các sợi nano.

Các sợi nano là các sợi siêu nhỏ có độ dày nằm trong khoảng từ khoảng 10nm đến 20nm, và đã có báo cáo rằng chúng tự tập để tạo ra lưới và có dạng giống như có thể nhìn bằng mắt thường.

Cấu trúc lưới gel khá giống với nền ngoại bào tự nhiên (extracellular matrix: ECM) về kích cỡ sợi và kích cỡ lỗ của nó, và sử dụng làm dàn khung để nuôi cấy tế bào đang được nghiên cứu.

Vì hydrogel peptit có thể phân huỷ sinh học và sản phẩm phân huỷ của nó không gây ảnh hưởng bất lợi đến mô, đồng thời nó cũng có khả năng hấp thu sinh học cao, nên thích hợp cho sự cấy ghép và sinh trưởng tế bào.

Bởi vì các peptit tự lắp ghép là các sản phẩm hoá học tổng hợp thu được bằng cách tổng hợp pha rắn và không gây ra nguy cơ về bệnh truyền nhiễm từ động vật, tạo thành các vấn đề liên quan đến virus từ động vật và các tác nhân truyền nhiễm chưa biết khác như bệnh bò điên trong những năm gần đây, nên chúng thậm chí còn được cho là chất liệu thay thế cho collagen và các chất liệu tương tự khác.

Ứng dụng của các peptit tự lắp ghép để cầm máu được đề cập trong tài liệu patent 1, nhưng đoạn video thể hiện sự cầm máu ở vị trí rạch gan, được đưa ra ở các tài liệu trích dẫn trong các ví dụ, đã cho thấy có sự chảy máu lâu dài từ phần cuối của vị trí rạch, và không thu được sự cầm máu hoàn toàn. Giả định đưa đối với việc không cầm máu hoàn toàn là do có sự kết dính không đầy đủ giữa peptit gel tự lắp ghép với mô. Như vậy, cần cải thiện hơn nữa để đạt được tác dụng cầm máu có lợi của các peptit tự lắp ghép đến mức cho phép ứng dụng lâm sàng.

Tài liệu patent 1: Công bố đơn quốc tế số WO2006-116524.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề cần được giải quyết bởi sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất tác nhân làm lành mô peptit tự lắp ghép mà có thể làm lành hữu hiệu các vị trí tổn thương mô ở các động vật có vú lớn

bao gồm cả người và không gây ra nguy cơ nhiễm trùng bởi virus và tương tự, cũng như phương pháp sử dụng chúng.

Phương thức giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã hoàn thành sáng chế dựa vào việc phát hiện rằng tác dụng làm lành mô tương đương với hoặc lớn hơn so với tác dụng của các tác nhân làm lành mô hiện có được biểu hiện khi hydrogel peptit tự lắp ghép được sử dụng làm dàn khung để nuôi cấy tế bào được sử dụng để làm lành mô. Đã được thông báo rằng việc phủ đơn giản dung dịch peptit vào các vị trí rò dịch cơ thể không tạo ra tác dụng làm lành mô đầy đủ. Tuy nhiên, nhờ sự nghiên cứu sâu rộng, đã nhận thấy rằng tác dụng làm lành mô đầy đủ và tính an toàn sinh học có thể đạt được bằng cách loại bỏ dịch cơ thể dư thừa ra khỏi các vị trí rò dịch cơ thể.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến tác nhân làm lành mô chứa peptit, trong đó peptit là amphiphil peptit có từ 8 đến 200 gốc axit amin với các axit amin ưa nước và các axit amin kỵ nước được liên kết luân phiên, và là peptit tự lắp ghép có cấu trúc β trong dung dịch chứa nước với sự có mặt của độ pH sinh lý và/hoặc cation.

Trong tác nhân làm lành mô này, peptit tốt hơn là peptit tự lắp ghép có trình tự lắp là trình tự bao gồm arginin, alanin, axit aspartic và alanin, trình tự bao gồm isoleuxin, axit glutamic, isoleuxin và lysin, hoặc trình tự bao gồm lysin, loxin, axit aspartic và loxin, và tốt hơn nữa là peptit tự lắp ghép bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 3.

Tốt hơn là, tác nhân làm lành mô còn bao gồm các thuốc chứa phân tử nhỏ để phòng ngừa sự tan huyết, viêm và nhiễm trùng.

Tốt hơn là, các thuốc chứa phân tử nhỏ được chọn từ nhóm bao gồm glucoza, sacaroza, sacaroza được tinh chế, lactoza, maltoza, trehaloza, dextran, iot, lysozym clorua, dimetylisopropylazulen, tretinoin tocoferil, povidon iot, alprostadi alfadex, rượu aniza, isoamyl salixylat, rượu α,α -dimetylphenyletyl,

bacdanol, helional, sulfazin bạc, bucladesin natri, alprostadil alfadex, gentamycin sulfat, tetracyclin hydroclorua, natri fusidat, mupirocin canxi hydrat và isoamyl benzoat.

Sáng chế cũng đề cập đến các tác nhân bao gồm tác nhân làm lạnh mô nêu trên, là các tác nhân cầm máu cho sự xuất huyết mà giảm được bột gây đông do có sự bổ sung các tác nhân chống đông, các tác nhân cầm máu cho các bề mặt vết thương xuất huyết ở các tổ chức nhu mô, các tác nhân cầm máu cho sự xuất huyết động mạch và xuất huyết tĩnh mạch, các tác nhân ức chế sự chảy máu từ túi mật hoặc ống mật, các tác nhân ức chế sự xuất huyết hoặc sự thoát khí từ phổi, các tác nhân cầm máu hoặc ứng dụng qua ống thông trong khi lược bỏ niêm mạc bằng cách nội soi, truyền vào mô niêm mạc để làm căng phồng các vị trí cắt bỏ, các tác nhân ức chế sự xuất huyết và sự chảy dịch cơ thể từ các vị trí cắt bỏ trong các phương pháp cắt bỏ mô niêm mạc mà đã được làm căng phồng bằng cách truyền chất lỏng vào trong mô niêm mạc, hoặc các tác nhân làm lạnh động-tĩnh mạch trong quá trình làm lạnh động-tĩnh mạch hoặc các tác nhân xơ hoá giãn tĩnh mạch được sử dụng trong quá trình xơ hoá giãn tĩnh mạch. Các tác nhân điều trị ung thư và/hoặc các thuốc tương phản cũng có thể được bổ sung vào tác nhân làm lạnh động-tĩnh mạch hoặc tác nhân xơ hoá giãn tĩnh mạch.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Peptit tự lắp ghép là thành phần chính trong tác nhân làm lạnh mô của sáng chế cũng có thể đóng vai trò là dàn khung để di trú tế bào ngoài vai trò là tác nhân làm lạnh, như vậy cho phép có hiệu quả trị liệu cao hơn thay vì sự làm lạnh đơn giản. Ngoài ra, tác nhân làm lạnh mô theo sáng chế đã cải thiện tính kết dính với mô do loại bỏ được dịch cơ thể thừa khỏi vị trí rò dịch cơ thể (chẳng hạn như, khi nó đã được phủ lên vị trí để ngăn chặn xuất huyết khiến tình trạng xuất huyết ngừng lại), và như vậy thể hiện tác dụng làm lạnh mô đầy đủ có độ an toàn sinh học.

Peptit tự lắp ghép là thành phần chính của tác nhân làm lạnh mô theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách tổng hợp, và do vậy không mang đến nguy cơ

nhễm virus hoặc nhiễm trùng so với các sinh chất có nguồn gốc từ mô bình thường, và có khả năng tự hấp thu sinh học, loại bỏ các vấn đề về viêm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sự so sánh giữa tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước 1% và dung dịch peptit chứa nước 3% ở mẫu bị cầm kim tiêm vào động mạch chủ ở bụng, (a) Sự xuất huyết được xác nhận sau khi chọc vào động mạch chủ, xuất huyết quanh mạch (đầu mũi tên; nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước 1%), (b) phủ dung dịch peptit chứa nước (nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước 1%), (c) không thể phân biệt được mạch máu do xuất huyết sau khi bỏ kẹp (đầu mũi tên; nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước 1%), (d) sự xuất huyết được xác nhận sau khi chọc vào động mạch chủ, xuất huyết quanh mạch (đầu mũi tên; nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước 3%), (e) phủ dung dịch peptit chứa nước (nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước 3%), (f) sau khi rửa bằng dung dịch nước muối sinh lý, mạch máu hoàn toàn ngừng xuất huyết có thể thấy được ở phần giữa của bức ảnh (đầu mũi tên; nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước 3%).

Fig.2 thể hiện sự so sánh giữa tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước 1% và dung dịch peptit chứa nước 3% trong mẫu bị cắt bỏ một phần gan. (a) Sự xuất huyết được xác nhận sau khi cắt gan (nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước 1%), (b) phủ dung dịch peptit chứa nước (nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước 1%), (c) không thấy có sự xuất huyết từ bề mặt cắt sau khi rửa bằng dung dịch nước muối sinh lý (đầu mũi tên; nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước 1%), (d) sự xuất huyết được xác nhận sau khi cắt bỏ gan, (nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước 3%), (e) phủ dung dịch peptit chứa nước (nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước 3%), (f) thấy có sự xuất huyết từ bề mặt cắt sau khi rửa bằng dung dịch nước muối sinh lý (đầu mũi tên; nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước 3%).

Fig.3 thể hiện sự so sánh mô bệnh học của các bề mặt cắt của gan ngừng xuất huyết nhờ sử dụng dung dịch peptit chứa nước và gan từ nhóm đối ứng (dung dịch muối sinh lý), (a) Mô học nội mạch (nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước), (b) mô học nội mạch (nhóm được xử lý bằng dung dịch muối sinh lý), (c) mô học nội mạch (nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước), (d) mô học nội mạch (nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước), (e) mô học nội mạch (nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước), (f) mô học nội mạch (nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước).

Fig.4 thể hiện tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước 3% trong mẫu xuyên kim tiêm vào động mạch chủ ở bụng của thỏ với chức năng gây đông máu bị kìm hãm, (a) Tình trạng trước khi chọc vào động mạch chủ, (b) quan sát thấy có sự xuất huyết quanh mạch sau khi chọc vào động mạch chủ (đầu mũi tên), (c) phủ dung dịch peptit chứa nước, (d) sự xuất huyết quanh mạch của (b) không thấy có sau khi bỏ kẹp (đầu mũi tên).

Fig.5 thể hiện tác dụng cầm máu của dung dịch peptit 3% chứa sacaroza trong mẫu xuyên kim tiêm vào động mạch chủ ở bụng, (a) Tình trạng trước khi chọc vào động mạch chủ, (b) thấy có sự xuất huyết quanh mạch sau khi chọc vào động mạch chủ (đầu mũi tên), (c) phủ dung dịch peptit chứa nước, (d) sự xuất huyết quanh mạch của (b) không quan sát thấy sau khi bỏ kẹp (đầu mũi tên).

Fig.6 thể hiện sự so sánh về tác dụng cầm máu và tác dụng bít sự rò ở phổi của dung dịch peptit 3% chứa sacaroza và dung dịch muối sinh lý ở mẫu rò phổi, (a) Sự xuất huyết được xác nhận trong phổi (đầu mũi tên; nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit 3% chứa sacaroza), (b) phủ dung dịch peptit chứa nước (đầu mũi tên; nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit 3% chứa sacaroza), (c) vị trí tổn thương được ngâm trong dung dịch muối sinh lý để xác nhận sự rò không khí, nhưng không quan sát thấy sự rò không khí hoặc sự xuất huyết (đầu mũi tên; nhóm được xử lý bằng dung dịch peptit 3% chứa sacaroza), (d) sự xuất

huyết được xác nhận trong phổi (đầu mũi tên; nhóm được xử lý bằng dung dịch muối sinh lý), (e) phủ dung dịch muối sinh lý (đầu mũi tên; nhóm được xử lý bằng dung dịch muối sinh lý), (f) không phân biệt được sự xuất huyết vì vị trí tổn thương được ngâm trong dung dịch muối sinh lý để xác nhận sự rò không khí, nhưng quan sát thấy có sự xuất huyết liên tục (đầu mũi tên; nhóm được xử lý bằng dung dịch muối sinh lý).

Fig.7 tác dụng nút vách ống mật của dung dịch peptit chứa nước 3% ở mẫu xuyên qua vách ống mật, (a) Tình trạng trước khi chọc ống mật, (b) sự rò mật được xác nhận sau khi chọc ống mật (đầu mũi tên), (c) phủ dung dịch peptit chứa nước (đầu mũi tên), (d) sự rò mật của (b) không quan sát thấy quanh ống mật sau khi rửa bằng dung dịch nước muối sinh lý (đầu mũi tên).

Fig.8 thể hiện sự tạo phòng niêm mạc và tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước 3% ở khối u trong bàng quang, (a) Trước khi truyền dung dịch peptit chứa nước, (b) làm phòng vùng được tác động được xác nhận sau khi truyền dung dịch peptit chứa nước, (c) không có sự xuất huyết ở vị trí cắt bỏ trong khi cắt bỏ khối u bằng dao đốt điện, (d) không có sự xuất huyết ở vị trí cắt bỏ sau khi cắt bỏ khối u bằng dao đốt điện.

Fig.9 thể hiện tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước 2% trong mẫu rách niêm mạc dạ dày, (a) sự xuất huyết được xác nhận sau khi rách gan (mép mũi tên), (b) phủ dung dịch peptit chứa nước 2% (đầu mũi tên), (c) không có sự xuất huyết từ vị trí rách sau khi rửa bằng dung dịch nước muối sinh lý (đầu mũi tên).

Fig.10 thể hiện tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước 1% ở mẫu cắt ngang gan, (a) Sự xuất huyết được xác nhận sau khi rách gan (đầu mũi tên), (b) phủ dung dịch peptit chứa nước IEIK9 1% (đầu mũi tên), (c) thấy có sự xuất huyết từ vị trí rách sau khi rửa bằng dung dịch nước muối sinh lý (đầu mũi tên), (d) sự xuất huyết được xác nhận sau khi rách gan (đầu mũi tên), (e) phủ dung dịch peptit chứa nước IEIK13 1% (đầu mũi tên), (f) không thấy có sự xuất huyết từ vị trí rách sau khi rửa bằng dung dịch nước muối sinh lý (đầu mũi

tên), (g) sự xuất huyết được xác nhận sau khi rạch gan (đầu mũi tên), (h) phủ dung dịch peptit chứa nước KLD 1% (đầu mũi tên), (i) không thấy có sự xuất huyết từ vị trí rạch sau khi rửa bằng dung dịch nước muối sinh lý (đầu mũi tên).

Fig.11 thể hiện tính tự lắp ghép của dung dịch peptit chứa nước 1,5% bởi mật, (a) dung dịch peptit chứa nước PuraMatrix 1,5% trước khi tự lắp ghép, (b) dung dịch peptit chứa nước PuraMatrix 1,5% sau khi phủ mật, (c) mật được loại bỏ, xác nhận sự tự lắp ghép, (d) sử dụng tác động vật lý để làm vỡ gel tự lắp ghép, (e) dung dịch peptit chứa nước IEIK9 1% trước khi tự lắp ghép, (f) dung dịch peptit chứa nước IEIK9 1% sau khi phủ mật, (g) không thấy có sự tự lắp ghép sau khi loại bỏ mật, (h) va chạm vật lý được áp dụng để làm vỡ gel tự lắp ghép, (i) dung dịch peptit chứa nước IEIK13 1% trước khi tự lắp ghép, (j) dung dịch peptit chứa nước IEIK13 1% sau khi phủ mật, (k) mật được loại bỏ, sự tự lắp ghép được xác nhận, (l) va chạm vật lý được áp dụng để làm vỡ gel tự lắp ghép, (m) dung dịch peptit chứa nước KLD 1% trước khi tự lắp ghép, (n) dung dịch peptit chứa nước KLD 1% sau khi phủ mật, (o) mật được loại bỏ, sự tự lắp ghép được xác nhận, (p) va chạm vật lý được áp dụng để phá vỡ gel tự lắp ghép.

Fig.12 thể hiện tác dụng làm nghẽn tĩnh mạch của bằng dung dịch peptit chứa nước 3%, (a), (b) Sự làm nghẽn tĩnh mạch của được xác nhận (đầu mũi tên).

Fig.13 thể hiện sự tự lắp ghép của dung dịch peptit chứa iopamidol. (a) Dung dịch peptit 3% chứa iopamidol trước khi tự lắp ghép, (b) dung dịch peptit 3% chứa iopamidol sau khi phủ môi trường nuôi cấy tế bào, (c) môi trường nuôi cấy tế bào được loại bỏ, sự tự lắp ghép được xác nhận, (d) dung dịch peptit 0,0468% chứa iopamidol trước khi tự lắp ghép, (e) dung dịch peptit 0,0468% chứa iopamidol sau khi phủ môi trường nuôi cấy tế bào, (f) môi trường nuôi cấy tế bào được loại bỏ, xác định có sự tự lắp ghép.

Fig.14 thể hiện sự tự lắp ghép của dung dịch peptit 3% chứa iopamidol sau khi truyền qua ống thông (đầu mũi tên).

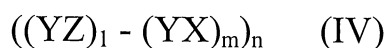
Mô tả chi tiết sáng chế

Tác nhân làm lạnh mô theo sáng chế sẽ được giải thích chi tiết.

Thành phần chính của tác nhân làm lạnh mô theo sáng chế là peptit tự lắp ghép, peptit này là amphiphil peptit có từ 8 đến 200 gốc axit amin với các axit amin ưa nước và các axit amin kỵ nước được liên kết luân phiên, và nó thể hiện cấu trúc β trong dung dịch chứa nước với sự có mặt của độ pH sinh lý và/hoặc cation.

Theo sáng chế, độ pH sinh lý là độ pH = 6-8, tốt hơn là độ pH = 6,5-7,5 và tốt hơn nữa là độ pH = 7,3-7,5. "Cation" theo sáng chế là, chẳng hạn như, ion natri hoặc ion kali 5mM-5M.

Các peptit tự lắp ghép được sử dụng cho sáng chế có thể được biểu hiện bằng 4 công thức chung sau đây.



(trong các công thức (I)-(IV), X là axit amin axit, Y là axit amin kỵ nước và Z là axit amin kiềm, và 1, m và n là các số nguyên ($n \times (1+m) < 200$)).

Đầu N có thể được axetyl hóa, và đầu C có thể được amit hóa.

Các axit amin ưa nước mà có thể được sử dụng bao gồm axit amin có tính axit như axit aspartic và axit glutamic, và axit amin có tính kiềm như arginin, lysin, histidin và omithin. Về các axit amin kỵ nước có thể được sử dụng là alanin, valin, leuxin, isoleuxin, methionin, phenylalanin, tyrosin, tryptophan, serin, threonin hoặc glyxin.

Trong số các peptit được ưu tiên này, các peptit tự lắp ghép là các peptit tự lắp ghép có trình tự lặp gồm arginin, alanin, axit aspartic và alanin (RADA), và các trình tự peptit này được thể hiện bởi $Ac-(RADA)_p-CONH_2$ ($p = 2-50$). Cũng có các peptit tự lắp ghép được ưu tiên có trình tự lặp bao gồm isoleuxin, axit

glutamic, isoloxin và lysin (IEIK), và các trình tự peptit được biểu hiện bởi Ac-(IEIK)_pI-CONH₂ (p = 2-50). Có các peptit tự lắp ghép được ưu tiên nữa có trình tự lắp gồm lysin, loxin, axit aspartic và loxin (KLDL), và các trình tự peptit này được biểu hiện bởi Ac-(KLDL)_p-CONH₂ (p = 2-50). Các peptit tự lắp ghép này có thể bao gồm từ 8 đến 200 gốc axit amin, có 8 đến 32 gốc peptit tự lắp ghép là được ưu tiên và các peptit tự lắp ghép có từ 12 đến 16 gốc là được ưu tiên hơn.

Về các ví dụ điển hình của các peptit tự lắp ghép theo sáng chế, có thể kể đến peptit RAD 16-1 có trình tự (Ac-(RADA)₄-CONH₂) (SEQ ID NO: 1), peptit IEIK13 có trình tự (Ac-(IEIK)₃I-CONH₂) (SEQ ID NO: 2) và peptit KLD có trình tự (Ac-(KLDL)₃-CONH₂) (SEQ ID NO: 3), và dung dịch chứa nước 1% của RAD16-I là sản phẩm PuraMatrix™ của 3D-Matrix Co., Ltd. PuraMatrix™ chứa 1% peptit có trình tự (Ac-(RADA)₄-CONH₂) (SEQ ID NO: 1), có ion hydrogen và ion clorua.

PuraMatrix™, IEIK13 và KLD là các oligopeptit có từ 12 đến 16 gốc axit amin và có độ dài khoảng 5nm, và mặc dù các dung dịch của chúng là chất lỏng ở độ pH axit, các peptit có sự tự tổ chức vào lúc thay đổi đến độ pH trung tính, tạo ra các sợi nano có đường kính khoảng 10nm, gây ra sự keo hóa cho dung dịch peptit.

PuraMatrix™ là amphiphil peptit có trình tự axit amin có các đoạn lặp luân phiên của arginin có điện tích dương và axit aspartic có điện tích âm làm các axit amin ưa nước, và alanin làm axit amin kỵ nước, IEIK13 là amphiphil peptit có trình tự axit amin có các đoạn lặp luân phiên gồm lysin có điện tích dương và axit glutamic có điện tích âm làm các axit amin ưa nước và isoloxin làm axit amin kỵ nước, và KLD là amphiphil peptit có trình tự axit amin với các đoạn lặp luân phiên gồm lysin có điện tích dương và axit aspartic có điện tích âm làm các axit amin ưa nước và loxin làm axit amin kỵ nước; tính tự lắp ghép của peptit là do liên kết hydro và liên kết kỵ nước giữa các phân tử peptit bởi các axit amin cấu thành peptit.

Trong các peptit tự lắp ghép được sử dụng cho sáng chế, trung bình, đường kính sợi nano nằm trong khoảng từ 10 đến 20nm và kích cỡ lỗ nằm trong khoảng từ 5 đến 200nm. Các khoảng trị số này là giống với collagen, là nền ngoại bào tự nhiên.

Độ pH sinh lý và nồng độ muối là các điều kiện để tự lắp ghép của các peptit tự lắp ghép theo sáng chế. Sự có mặt của ion kim loại kiềm hóa trị một là đặc biệt quan trọng. Tức là, ion natri và ion kali có mặt với lượng lớn trong cơ thể giúp thúc đẩy sự keo hóa. Một khi xảy ra sự keo hóa, gel không phân hủy thậm chí dưới các điều kiện suy thoái protein bình thường như nhiệt độ cao hoặc với các tác nhân làm biến chất như axit, kiềm, proteaza, ure, guanidin hydroclorua hoặc các chất tương tự khác.

Các peptit tự lắp ghép này, như PuraMatrix™, là các trình tự peptit không có motif hoạt hóa sinh lý riêng, và do vậy chức năng tế bào thực không được sửa chữa. Các motif hoạt hóa sinh lý điều chỉnh nhiều kiểu hình nội bào như sự phiên mã, và sự có mặt của các motif hoạt hóa sinh lý có thể dẫn đến sự phosphoryl hóa của nội chất tế bào hoặc các protein bề mặt tế bào bởi các enzym xác nhận các motif. Khi motif hoạt hóa sinh lý có trong tác nhân làm lành mô peptit, sự phiên mã của các protein có các chức năng khác nhau có thể được hoạt hóa hoặc bị kìm hãm. Các peptit tự lắp ghép, như PuraMatrix⁷, không có các motif hoạt hóa sinh lý và do vậy không gây nguy hiểm.

Vì peptit tự lắp ghép được sử dụng cho sáng chế được tạo ra bởi quá trình tổng hợp hóa học, nó không chứa các thành phần không được nhận biết thu được từ chất nền ngoại bào của động vật khác. Do vậy, đặc tính này loại bỏ các nguy cơ về nhiễm trùng, bao gồm BSE, tạo ra peptit có độ an toàn cao khi sử dụng trong y học.

Hơn nữa, peptit tự lắp ghép bao gồm các axit amin tự nhiên cũng thỏa mãn tính tương thích sinh học và khả năng phân hủy sinh học, và đã có báo cáo rằng việc truyền PuraMatrix™ vào trong cơ tim chuột, chẳng hạn, dẫn đến sự thâm tế bào vào trong PuraMatrix™ và hình thành mô bình thường. Thời gian phân hủy

thay đổi tùy thuộc vào các điều kiện như vị trí truyền, nhưng các sợi phân hủy và được tiết ra vào khoảng từ 2 đến 8 tuần sau khi truyền.

Tác nhân làm lạnh mô theo sáng chế có thể còn chứa các thuốc có phân tử nhỏ được bổ sung. Không có giới hạn cụ thể về các thuốc có phân tử nhỏ, và có thể được kể đến là glucoza, sacaroza, sacaroza được tinh chế, lactoza, maltoza, trehaloza, dextran, iot, lysozym clorua, dimetylisopropylazulen, tretinoin tocoferil, povidon iot, alprostadii alfadex, rượu aniza, isoamyl salixylat, rượu α,α -dimetylphenyletyl, bacdanol, helional, sulfazin bạc, bucladesin natri, alprostadil alfadex, gentamycin sulfat, tetracyclin hydroclorua, natri fusidat, mupirocin canxi hydrat và isoamyl benzoat.

Đường có thể được bổ sung vào tác nhân làm lạnh mô theo sáng chế để cải thiện áp suất thẩm thấu của dung dịch từ nhược trương đến đẳng trương mà không làm giảm tác dụng làm lạnh mô, nhờ đó cho phép gia tăng độ an toàn sinh học.

Tác nhân làm lạnh mô theo sáng chế có thể là dạng bột, dung dịch, gel, hoặc dạng tương tự khác. Vì gelatin peptit tự lắp ghép có thể làm thay đổi độ pH dung dịch và nồng độ muối, nó có thể được phân bố dưới dạng dung dịch thuốc mà keo hóa khi tiếp xúc với cơ thể trong quá trình phủ.

Các kiểu sử dụng trong lâm sàng bao gồm ống tiêm có xilanh hoặc các ống pipet mà nạp trước với dung dịch hóa chất chứa các thành phần như các peptit tự lắp ghép (các ống tiêm được nạp trước), hoặc các phương pháp cung cấp dung dịch hóa chất vào ống tiêm hoặc chip pipet nhờ đó cung cấp các thành phần đi qua lỗ hở của ống tiêm hoặc chip pipet (thiết bị hút hoặc van), và phủ nó vào vùng được tác động qua phân xả. Cấu trúc có hai hoặc nhiều ống tiêm hoặc pipet thỉnh thoảng được sử dụng.

Các thành phần có thể được sử dụng dưới dạng tác nhân phủ lên dụng cụ như stent hoặc ống thông, để kìm hãm sự chảy dịch cơ thể.

Ngoài ra, các thành phần có thể được giữ trên nền như gạch hoặc băng, hoặc lớp vải lót, mà thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Các thành phần cũng có thể được tẩm vào trong que bông để sử dụng.

Ngoài ra, máy phun mù được nạp bột hoặc dung dịch gồm các thành phần có thể được điều chế. Khi máy phun này được sử dụng để phun lên vùng được tác động, độ pH và nồng độ muối gia tăng khi tiếp xúc với cơ thể gây ra sự keo hóa, và do vậy dạng này có thể được phủ cho nhiều vị trí lớn hơn và thích hợp hơn so với dạng gel.

Tác nhân làm lạnh mô theo sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn nhờ các ví dụ sau đây, nhưng sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này miễn là bản chất của nó và khoảng ứng dụng được giữ nguyên.

Ví dụ 1. Tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước 1% và dung dịch peptit chứa nước 3% ở mẫu chọc kim tiêm vào động mạch chủ ở bụng/cuống tĩnh mạch cửa của thỏ.

Mẫu chọc kim tiêm vào động mạch chủ ở bụng và cuống tĩnh mạch cửa của thỏ được điều chế dưới điều kiện kẹp mạch, và tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước 1% và dung dịch peptit chứa nước 3% được đánh giá.

Nguyên liệu

- Dung dịch peptit chứa nước

1. Dung dịch peptit chứa nước 1% (trình tự peptit: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc; nồng độ: trọng lượng/thể tích)

2. dung dịch peptit chứa nước 3% (trình tự peptit: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc; nồng độ: trọng lượng/thể tích)

- Động vật

Thỏ trắng Nhật Bản (3,0-4,0kg, Japan White, bình thường, bán tại Funabashi Farm Co., Ltd.). Động vật được nuôi bằng các viên thức ăn dành cho vật nuôi (JA Higashinohon Kumiai Shiryou) được cấp trong buồng nuôi động vật được điều chỉnh ở nhiệt độ trong phòng 25°C, độ ẩm 65% và thời gian chiếu

sáng 12 giờ (7:00-19:00), và nước được cung cấp thoải mái bằng chai nước. Cho nhịn ăn từ sáng ngày thử nghiệm, chỉ được cho dùng nước.

Phương pháp

- Thỏ được tiêm dưới da Celactar 2% (3mg/kg) (2,0g xylazin trong 100mL, sản phẩm của Bayer Ltd.), và sau đó là ketamin (50mg ketamin trong 1mL, sản phẩm của Fuji Chemical Industries, Ltd.) được tiêm vào trong tĩnh mạch (10mg/kg) để gây mê.

- Thỏ mổ bụng bằng cách cắt giữa bụng. Khoảng 10cm động mạch chủ ở bụng và cuống tĩnh mạch cửa lộ ra, từng mạch máu được cắt khỏi mô xung quanh, và động mạch chủ ở bụng được chọc với kim tiêm 23G (Terumo Corp.) trong khi cuống tĩnh mạch cửa được chọc bằng kim tiêm 23G (Terumo Corp.).

- Khi xác nhận sự xuất huyết, dòng máu ở đầu mạch ngoại biên và đầu giữa được kẹp bằng kẹp cầm máu, và sau khi loại bỏ máu chảy ra bằng dung dịch muối sinh lý và gạc, nó được xử lý ngay bằng dung dịch peptit chứa nước.

- Sau 1-2 phút xử lý, dòng máu được lấy ra và sự có mặt của sự xuất huyết từ vị trí chọc được đánh giá bằng mắt thường.

Kết quả

Fig.1 thể hiện tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước đối với sự xuất huyết từ mạch máu trong ví dụ này. Như được thể hiện ở bảng 1, hai mẫu chọc vào động mạch chủ ở bụng thỏ đã giải thích sự cầm máu hoàn toàn bằng dung dịch peptit chứa nước 3%. Tuy nhiên, với dung dịch peptit chứa nước 1%, cả hai thỏ có thể xuất huyết sau khi bỏ kẹp, và do vậy sự cầm máu là sự cầm máu không hoàn toàn. Trong mẫu chọc vào cuống tĩnh mạch cửa, cả hai trường hợp đều được cầm máu hoàn toàn bằng dung dịch peptit chứa nước 3%, nhưng có xuất huyết tĩnh mạch lâu dài với dung dịch peptit chứa nước 1%.

Bảng 1

Số	Dung dịch peptit chứa nước	Vị trí chọc	Thời gia của quá trình	Kết quả	Đánh giá
----	----------------------------	-------------	------------------------	---------	----------

1	3%	Động mạch chủ bụng	1:00	G	Cầm máu hoàn toàn
2	3%	Động mạch chủ bụng	1:00	G	Cầm máu hoàn toàn
3	1%	Động mạch chủ bụng	2:00	P	Xuất huyết từng đợt sau khi tháo vật phong bế
4	1%	Động mạch chủ bụng	2:00	P	Xuất huyết từng đợt sau khi tháo vật phong bế
5	3%	Cuống tĩnh mạch cửa	2:00	G	Cầm máu hoàn toàn
6	3%	Cuống tĩnh mạch cửa	1:00	G	Cầm máu hoàn toàn
7	1%	Cuống tĩnh mạch cửa	2:00	P	Xuất huyết liên tục sau khi tháo vật phong bế

Ví dụ 2. Tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước 1% và dung dịch peptit chứa nước 3% trong mẫu cắt một phần gan thỏ.

Mẫu cắt một phần gan thỏ được chuẩn bị và tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước 1% và dung dịch peptit chứa nước 3% được đánh giá.

Nguyên liệu

- Dung dịch peptit chứa nước

1. Dung dịch peptit chứa nước 1% (trình tự peptit: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

2. Dung dịch peptit chứa nước 3% (trình tự peptit: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

- Động vật

Thỏ trắng Nhật Bản (3,0-4,0kg, Japan White, bình thường, bán tại Funabashi Farm Co., Ltd.). Động vật được nuôi bằng các viên thức ăn dành cho vật nuôi (JA Higashinohon Kumiai Shiryou) được cấp trong buồng nuôi động vật được điều chỉnh đến nhiệt độ trong phòng 25°C, độ ẩm 65% và thời gian chiếu sáng 12 giờ (7:00-19:00), và nước được cung cấp thoải mái bằng chai nước. Cho nhin ăn từ buổi sáng của ngày thử nghiệm, chỉ được cho dùng nước.

Phương pháp

- Thỏ được tiêm dưới da Celactar 2% (3mg/kg) (2,0g xylazin trong 100mL, sản phẩm của Bayer Ltd.), và sau đó là ketamin (50mg ketamin trong 1mL, sản phẩm của Fuji Chemical Industries, Ltd.) được tiêm vào trong tĩnh mạch (10mg/kg) để gây mê.

- Thỏ được mở bụng bằng cách cắt giữa bụng, và thùy trái hoặc thùy phải của gan được cắt đến kích cỡ với chiều rộng khoảng 5cm x 3cm chiều dài từ từ mép bằng cách sử dụng dao mổ, để chuẩn bị phần gan thử nghiệm.

- Sau khi xác nhận sự xuất huyết từng đợt từ bề mặt cắt, nhu mô gan gồm động mạch, tĩnh mạch cửa và tĩnh mạch được kẹp chặt để chặn ngay dòng máu, và máu chảy ra được loại bỏ bằng dung dịch muối sinh lý và gạc, sau đó bề mặt gan đã cắt đã được chuẩn bị được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước.

- Dòng máu được hút ra 1-2 phút sau khi xử lý, dung dịch peptit chứa nước mà được keo hóa được loại bỏ bằng dung dịch muối sinh lý, và sự có mặt của bất kỳ sự xuất huyết từ bề mặt gan được cắt được xác nhận bằng mắt thường.

- Bề mặt gan được cắt trong đó tác dụng cầm máu được quan sát được cố định bằng 20% formalin và được đánh giá mô bệnh học bằng cách nhuộm HE.

Kết quả

Fig.2 thể hiện tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước đối với sự xuất huyết từ bề mặt gan được cắt trong ví dụ này. Như được thể hiện ở bảng 2, hai trong số các con thỏ thử nghiệm thể hiện sự cầm máu hoàn toàn bằng dung dịch peptit chứa nước 1%, nhưng sự cầm máu hoàn toàn được quan sát thấy ở chỉ 1 trong số 4 con thỏ với dung dịch peptit chứa nước 3%. Theo sự đánh giá mô bệnh học, sự nút mạch máu được xác nhận ở bề mặt mạch do sự tiếp xúc kín của dung dịch peptit chứa nước được keo hóa với bề mặt gan được cắt (Fig.3).

Bảng 2

Số	Nồng độ	Thời gia của quá trình	Kết quả	Đánh giá
1	3%	2:00	P	Xuất huyết liên tục từ động mạch
2	3%	2:00	G	Cầm máu hoàn toàn

3	3%	1:00	F	Rỉ máu
4	3%	2:00	P	Xuất huyết liên tục từ động mạch
5	1%	2:00	G	Cầm máu hoàn toàn
6	1%	2:00	G	Cầm máu hoàn toàn

Ví dụ 3. Tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước ở mẫu xuyên kim tiêm vào động mạch chủ ở bụng của thỏ với chức năng gây đông máu bị kìm hãm

Tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước ở thỏ được sử dụng chất chống đông (heparin) được đánh giá ở mẫu xuyên kim tiêm vào động mạch chủ ở bụng.

Nguyên liệu

- Dung dịch peptit chứa nước

Dung dịch peptit chứa nước 3% (trình tự peptit: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

- Động vật

Thỏ trắng Nhật Bản (3,0-4,0 kg, Japan White, bình thường, bán tại Funabashi Farm Co., Ltd.). Động vật được nuôi bằng các viên thức ăn dành cho vật nuôi (JA Higashinohon Kumiai Shiryou) được cấp trong buồng nuôi động vật được điều chỉnh đến nhiệt độ trong phòng 25°C, độ ẩm 65% và thời gian chiếu sáng 12 giờ (7:00-19:00), và nước được cung cấp thoải mái bằng chai nước. Cho nhin ăn từ buổi sáng của ngày thử nghiệm, chỉ được cho dùng nước.

Phương pháp

- Thỏ được tiêm dưới da Celactar 2% (3mg/kg) (2,0g xylazin trong 100mL, sản phẩm của Bayer Ltd.), và then ketamin (50mg ketamin trong 1mL, sản phẩm của Fuji Chemical Industries, Ltd.) được tiêm vào trong tĩnh mạch (10mg/kg) để gây mê.

- 1000 đơn vị heparin (Novo-Heparin để tiêm, 5000 đơn vị, Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.) được tiêm vào tĩnh mạch chủ dưới để làm giảm chức năng gây đông máu.

- Thở được mở bụng bằng cách cắt giữa bụng. Khoảng 10cm động mạch chủ ở bụng lộ ra, mạch máu được cắt khỏi mô xung quanh, và mạch được chọc bằng kim tiêm 26G, 25G hoặc 23G (Terumo Corp.).

- Trong khi xác nhận sự xuất huyết, dòng máu ở đầu mạch ngoại biên và đầu trung tâm được kẹp bằng kẹp cầm máu, và sau khi loại bỏ máu chảy ra bằng dung dịch muối sinh lý và gạc, nó được xử lý ngay bằng dung dịch peptit chứa nước.

- Sau 1-2 phút xử lý, dòng máu được cho chảy thoát và sự xuất huyết được đánh giá bằng mắt thường.

Kết quả

Fig.4 thể hiện tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước đối với sự xuất huyết từ động mạch chủ ở bụng của thỏ có chức năng gây đông máu được giảm trong ví dụ này. Như được thể hiện ở bảng 3, sự cầm máu hoàn toàn được quan sát thấy với dung dịch peptit chứa nước 3% ở các mẫu chọc kim tiêm 26G, 25G và 23G.

Bảng 3

Số	Cỡ kim tiêm (G)	Thời gian của quá trình	Kết quả	Đánh giá
1	23G	1:00	G	Cầm máu hoàn toàn
2	25G	1:00	G	Cầm máu hoàn toàn
3	25G	1:00	G	Cầm máu hoàn toàn
4	26G	2:00	G	Cầm máu hoàn toàn

Ví dụ 4. Tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa đường ở mẫu chọc kim tiêm vào động mạch chủ ở bụng thỏ/cuống tĩnh mạch cửa.

Tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa đường được đánh giá bằng cách sử dụng mẫu chọc kim tiêm vào động mạch chủ ở bụng/cuống tĩnh mạch cửa.

Nguyên liệu

- Dung dịch peptit chứa nước

1. Dung dịch peptit chứa sacaroza (trình tự peptit: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc; nồng độ: 2% và 3%, sacaroza: Wako Pure Chemical Industries, Ltd., nồng độ 10%)

2. Dung dịch peptit 2% chứa glucoza (trình tự peptit: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc; glucoza: Wako Pure Chemical Industries, Ltd., nồng độ 5%)

3. Dung dịch peptit 2% chứa trehaloza (trình tự peptit: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc; trehaloza: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. nồng độ 5%)

4. Dung dịch peptit chứa nước 3% (trình tự peptit: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

5. Dung dịch peptit chứa nước 2% (trình tự peptit: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

- Động vật

Thỏ trắng Nhật Bản (3,0-4,0 kg, Japan White, bình thường, bán tại Funabashi Farm Co., Ltd.). Động vật được nuôi bằng các viên thức ăn dành cho vật nuôi (JA Higashinihon Kumiai Shiryou) được cấp trong buồng nuôi động vật được điều chỉnh đến nhiệt độ trong phòng 25°C, độ ẩm 65% và thời gian chiếu sáng 12 giờ (7:00-19:00), và nước được cung cấp thoải mái bằng chai nước. Cho nhin ăn từ buổi sáng của ngày thử nghiệm, chỉ được cho dùng nước.

Phương pháp

- Thỏ được tiêm dưới da Celactar 2% (3mg/kg) (2,0g xylazin trong 100mL, sản phẩm của Bayer Ltd.), và sau đó là ketamin (50mg ketamin trong 1mL, sản phẩm của Fuji Chemical Industries, Ltd.) được tiêm vào trong tĩnh mạch (10mg/kg) để gây mê.

- Thỏ được mở bụng bằng cách cắt giữa bụng. Khoảng 10cm động mạch chủ ở bụng và cuống tĩnh mạch cửa lộ ra, từng mạch máu được cắt khỏi mô xung quanh, và động mạch chủ ở bụng được chọc bằng kim tiêm 26G, 25G hoặc 23G (Terumo Corp.) trong khi cuống tĩnh mạch cửa được chọc bằng kim tiêm 23G (Terumo Corp.).

- Trong khi xác nhận sự xuất huyết, dòng máu ở đầu mạch ngoại biên và đầu trung tâm được kẹp bằng kẹp cầm máu, và sau khi loại bỏ máu chảy ra bằng dung dịch muối sinh lý và gạt, nó được xử lý ngay với dung dịch peptit chứa nước.

- Sau 1-2 phút xử lý, dòng máu được hút ra và sự có mặt của sự xuất huyết được đánh giá bằng mắt thường.

Kết quả

Fig.5 thể hiện tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa đường đối với sự xuất huyết từ mạch máu trong ví dụ này. Như được thể hiện ở bảng 4, tác dụng cầm máu của dung dịch peptit 3% chứa sacaroza tương đương với tác dụng của dung dịch peptit chứa nước 3% ở các mẫu chọc kim tiêm 23G, 25G và 23G vào động mạch chủ ở bụng.

Như được thể hiện ở bảng 5, tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước 2%, dung dịch peptit 2% chứa sacaroza, dung dịch peptit 2% chứa glucoza và dung dịch peptit 2% chứa trehaloza là tương đương ở mẫu chọc kim tiêm 23G vào cuống tĩnh mạch cửa.

Bảng 4

Số	Dung dịch peptit chứa nước	Vị trí chọc	Cỡ kim tiêm (G)	Thời gia của quá trình	Kết quả	Đánh giá
----	----------------------------	-------------	-----------------	------------------------	---------	----------

1	3%	Động mạch chủ ở bụng	23	1:00	G	Cầm máu hoàn toàn
2	3%	Động mạch chủ ở bụng	23	1:00	G	Cầm máu hoàn toàn
3	3%	Động mạch chủ ở bụng	25	1:00	G	Cầm máu hoàn toàn
4	3%	Động mạch chủ ở bụng	25	1:00	G	Cầm máu hoàn toàn
5	3%	Động mạch chủ ở bụng	25	1:00	G	Cầm máu hoàn toàn
6	3%	Động mạch chủ ở bụng	26	2:00	G	Cầm máu hoàn toàn
7	3% chứa sacaroza	Động mạch chủ ở bụng	23	2:00	G	Cầm máu hoàn toàn
8	3% chứa sacaroza	Động mạch chủ ở bụng	23	1:00	G	Cầm máu hoàn toàn
9	3% chứa sacaroza	Động mạch chủ ở bụng	23	2:00	G	Cầm máu hoàn toàn
10	3% chứa sacaroza	Động mạch chủ ở bụng	23	2:00	P	Xuất huyết từng đợt
11	3% chứa sacaroza	Động mạch chủ ở bụng	25	2:00	G	Cầm máu hoàn toàn
12	3% chứa sacaroza	Động mạch chủ ở bụng	26	1:00	G	Cầm máu hoàn toàn
13	3% chứa sacaroza	Động mạch chủ ở bụng	26	1:00	G	Cầm máu hoàn toàn
14	3% chứa sacaroza	Động mạch chủ ở bụng	26	2:00	G	Cầm máu hoàn toàn
15	3% chứa sacaroza	Động mạch chủ ở bụng	26	2:00	G	Cầm máu hoàn toàn
16	3% chứa sacaroza	Động mạch chủ ở bụng	26	2:00	G	Cầm máu hoàn toàn

Bảng 5

Số	Dung dịch peptit chứa nước	Vị trí chọc	Cỡ kim tiêm (G)	Thời gian của quá trình	Kết quả	Đánh giá
1	2%	Cuống tĩnh mạch cửa	26G	2:00	G	Cầm máu hoàn toàn
2	2%	Cuống tĩnh mạch cửa	26G	2:00	G	Cầm máu hoàn toàn
3	2% chứa glucoza	Cuống tĩnh mạch cửa	26G	2:00	G	Cầm máu hoàn toàn
4	2% chứa glucoza	Cuống tĩnh mạch cửa	26G	2:00	G	Cầm máu hoàn toàn
5	2% chứa glucoza	Cuống tĩnh mạch cửa	26G	2:00	P	Xuất huyết liên tục
6	2% chứa sacaroza	Cuống tĩnh mạch cửa	26G	2:00	G	Cầm máu hoàn toàn

7	2% chứa trehaloza	Cuồng tĩnh mạch cửa	26G	2:00	G	Cầm máu hoàn toàn
---	-------------------	---------------------	-----	------	---	-------------------

Ví dụ 5. Tác dụng chặn rò phổi của dung dịch peptit chứa sacaroza ở mẫu rò phổi thỏ

Mẫu rò phổi thỏ được điều chế, và tác dụng chặn rò phổi của dung dịch peptit 3% chứa sacaroza và dung dịch muối sinh lý được so sánh.

Nguyên liệu

- Dung dịch peptit chứa nước

1. Dung dịch peptit 3% chứa sacaroza (trình tự peptit: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc; sacaroza: Wako Pure Chemical Industries, Ltd., nồng độ: 10%)

2. Dung dịch muối sinh lý (sản phẩm của Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.)

- Động vật

Thỏ trắng Nhật Bản (3,0-4,0kg, Japan White, bình thường, bán tại Funabashi Farm Co., Ltd.). Động vật được nuôi bằng các viên thức ăn dành cho vật nuôi (JA Higashinohon Kumiai Shiryō) được cấp trong buồng nuôi động vật được điều chỉnh đến nhiệt độ trong phòng 25°C, độ ẩm 65% và thời gian chiếu sáng 12 giờ (7:00-19:00), và nước được cung cấp thoải mái bằng chai nước. Cho nhện ăn từ buổi sáng của ngày thử nghiệm, chỉ được cho dùng nước.

Phương pháp

- Thỏ được tiêm dưới da Celactar 2% (3mg/kg) (2,0g xylazin trong 100mL, sản phẩm của Bayer Ltd.), và then ketamin (50mg ketamin trong 1mL, sản phẩm của Fuji Chemical Industries, Ltd.) được tiêm vào trong tĩnh mạch (10mg/kg) để gây mê.

- Thỏ được mở ngực dưới sự trợ giúp hô hấp bằng máy hô hấp nhân tạo. Phổi lộ ra và được gây tổn thương bằng kẹp fooc-xép để tạo ra sự rò phổi có xuất huyết.

- Sau khi loại bỏ máu chảy ra bằng dung dịch muối sinh lý và gạc, bề mặt xuất huyết được xử lý bằng dung dịch peptit 3% chứa sacaroza và dung dịch muối sinh lý.

- Khoảng 30 giây sau khi xử lý, sự xuất huyết và sự rò không khí từ sự rò phổi trong dung dịch muối sinh lý được xác nhận bằng mắt thường.

Kết quả

Fig.6 thể hiện tác dụng chặn rò phổi của dung dịch peptit chứa sacaroza trong ví dụ này. Như được thể hiện ở bảng 6, sự cầm máu hoàn toàn và sự chặn rò phổi được xác nhận với dung dịch peptit 3% chứa sacaroza, nhưng sự xuất huyết kéo dài và sự rò không khí từ sự rò phổi được quan sát thấy với dung dịch muối sinh lý.

Bảng 6

Dung dịch	Thời gian của quá trình	Kết quả	Dấu hiệu
3% chứa sacaroza	0:30	G	Cầm máu hoàn toàn. Không có sự rò không khí từ phổi.
Dung dịch muối sinh lý	-	P	Xuất huyết liên tục và có sự rò không khí từ phổi.

Ví dụ 6. Tác dụng nút vách ống mật của dung dịch peptit chứa nước ở mẫu chọc kim tiêm vào ống mật thỏ

Mẫu chọc kim tiêm vào ống mật thỏ được điều chế, và tác dụng nút vách ống mật của dung dịch peptit chứa nước được đánh giá.

Nguyên liệu

- Dung dịch peptit chứa nước

Dung dịch peptit chứa nước 3% (trình tự peptit: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

- Động vật

Thỏ trắng Nhật Bản (3,0-4,0 kg, Japan White, bình thường, bán tại Funabashi Farm Co., Ltd.). Động vật được nuôi bằng các viên thức ăn dành cho vật nuôi (JA Higashinohon Kumiai Shiryō) được cấp trong buồng nuôi động vật được điều chỉnh đến nhiệt độ trong phòng 25°C, độ ẩm 65% và thời gian chiếu sáng 12 giờ (7:00-19:00), và nước được cung cấp thoải mái bằng chai nước. Cho nhin ăn từ buổi sáng của ngày thử nghiệm, chỉ được cho dùng nước.

Phương pháp

- Thỏ được tiêm dưới da Celactar 2% (3mg/kg) (2,0g xylazin trong 100mL, sản phẩm của Bayer Ltd.), và sau đó là ketamin (50mg ketamin trong 1mL, sản phẩm của Fuji Chemical Industries, Ltd.) được tiêm vào trong tĩnh mạch (10mg/kg) để gây mê.

- Thỏ được mở bụng bằng cách cắt giữa bụng. Khoảng 10cm ống mật lộ ra, và sau khi cắt khỏi mô bao quanh, ống mật được chọc bằng kim tiêm 23G.

Sau khi xác nhận sự tiết mật và liên tục chảy mật, dòng mật được chặn bằng kẹp cầm máu.

Mật rỉ ra được loại bỏ bằng dung dịch muối sinh lý và gạt, và sau đó được xử lý với dung dịch peptit chứa nước 3%.

Sau 2 phút xử lý, vật chặn dòng mật được tháo ra và sự có mặt của dòng mật từ vị trí chọc được đánh giá bằng mắt thường.

Kết quả

Fig.7 thể hiện tác dụng nút vách ống mật của dung dịch peptit chứa nước trong ví dụ này. Như được thể hiện ở bảng 7, tác dụng nút vách ống mật hoàn toàn được quan sát thấy với dung dịch peptit chứa nước 3%.

Bảng 7

Số	Cỡ kim tiêm (G)	Thời gia của quá	Kết quả	Đánh giá
1	26G	2:00	G	Dung dịch peptit chứa nước được keo hóa có mật, vị trí chọc ống mật được bít hoàn toàn

Ví dụ 7. Sự nâng cao liên tục vị trí cắt bỏ và tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước với khối u trong bàng quang chó.

Dung dịch peptit chứa nước được tiêm dưới niêm mạc vào trong bàng quang trong khi khối u trong bàng quang chó, và sự nâng cao liên tục và tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước ở vị trí cắt bỏ được đánh giá.

Nguyên liệu

- Dung dịch peptit chứa nước

Dung dịch peptit chứa nước 3% (trình tự peptit: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

- Động vật

Chó (đực)

Phương pháp

Khối u trong bàng quang chó được thực hiện trong điều kiện gây mê bình thường, bằng quy trình sau đây.

- Sau khi rạch vùng hạ vị bằng dao mổ đốt điện (Erbe, Inc.), dao mổ đốt điện được sử dụng để rạch bàng quang để lộ khối u trong bàng quang (khối u có cuống có đường kính vị trí nền khoảng 0,5cm mà được tách khỏi niêm mạc bàng quang).

- Dung dịch peptit chứa nước 3% được tiêm dưới niêm mạc quanh nền khối u ở 4 lần tiêm, mỗi lần tiêm là 0,5mL, và sự nâng cao khối u trên niêm mạc được xác nhận.

- Sau khi nâng cao khối u, khối u được cắt bằng dao mổ điện tử.

- Thời gian từ lúc tiêm dung dịch peptit chứa nước đến lúc hoàn thành việc cắt khối u là khoảng 2 phút.

Kết quả

Như được thể hiện trên Fig.8, khối u được nổi lên nhờ việc tiêm dung dịch peptit chứa nước vào trong niêm mạc bàng quang, và trạng thái nổi lên được duy

trì trong suốt quá trình cắt. Không thấy có sự xuất huyết trong khi hoặc sau khi cắt khối u.

Ví dụ 8. Tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước 2% ở mẫu mẫu rạch niêm mạc dạ dày thỏ

Mẫu xuất huyết do rạch niêm mạc dạ dày thỏ được điều chế, và tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước 2% được đánh giá.

Nguyên liệu

- Dung dịch peptit chứa nước

Dung dịch peptit chứa nước 1,2% (trình tự peptit: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

- Động vật

Thỏ trắng Nhật Bản (3,0-4,0kg, Japan White, bình thường, bán tại Funabashi Farm Co., Ltd.). Động vật được nuôi bằng các viên thức ăn dành cho vật nuôi (JA Higashinohon Kumiai Shiryō) được cấp trong buồng nuôi động vật được điều chỉnh đến nhiệt độ trong phòng 25°C, độ ẩm 65% và thời gian chiếu sáng 12 giờ (7:00-19:00), và nước được cung cấp thoải mái bằng chai nước. Cho nhện ăn từ buổi sáng của ngày thử nghiệm, chỉ được cho dùng nước.

Phương pháp

- Thỏ được tiêm dưới da Celactar 2% (3mg/kg) (2,0g xylazin trong 100mL, sản phẩm của Bayer Ltd.), và sau đó là ketamin (50mg ketamin trong 1mL, sản phẩm của Fuji Chemical Industries, Ltd.) được tiêm vào trong tĩnh mạch (10mg/kg) để gây mê.

- Thỏ được mở bụng bằng cách cắt giữa bụng và dạ dày được rạch, sau đó niêm mạc dạ dày lộ ra và được rạch bằng dao mổ khoảng 1cm để gây ra sự xuất huyết.

- Sau khi xác nhận rỉ máu từ quá trình rạch, máu được hút bỏ càng nhiều càng tốt bằng gạc và niêm mạc dạ dày đã rạch được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước.

- Dung dịch peptit chứa nước được keo hóa được loại bỏ 1 phút sau khi xử lý nhờ sử dụng dung dịch muối sinh lý, và sự có mặt của bất kỳ sự xuất huyết từ việc rạch niêm mạc dạ dày được xác nhận bằng mắt thường.

Kết quả

Fig.9 thể hiện tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước đối với sự xuất huyết từ việc rạch niêm mạc dạ dày trong ví dụ này. Không thấy có sự xuất huyết sau khi sử dụng dung dịch peptit chứa nước.

Ví dụ 9. Tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước 1% ở mẫu cắt ngang gan thỏ

Mẫu xuất huyết do cắt ngang gan thỏ được chuẩn bị, và tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước 1% được đánh giá.

Nguyên liệu

- Dung dịch peptit chứa nước

1. Dung dịch peptit chứa nước 1% (trình tự peptit: IEIK9 (SEQ ID NO: 4), CPC Scientific, Inc)

2. Dung dịch peptit chứa nước 1% (trình tự peptit: IEIK13, CPC Scientific, Inc)

3. Dung dịch peptit chứa nước 1% (trình tự peptit: KLD, CPC Scientific, Inc)

Động vật

Thỏ trắng Nhật Bản (3,0-4,0kg, Japan White, bình thường, bán tại Funabashi Farm Co., Ltd.). Động vật được nuôi bằng các viên thức ăn dành cho vật nuôi (JA Higashinohon Kumiai Shiryō) được cấp trong buồng nuôi động vật được điều chỉnh đến nhiệt độ trong phòng 25°C, độ ẩm 65% và thời gian chiếu

sáng 12 giờ (7:00-19:00), và nước được cung cấp thoải mái bằng chai nước. Cho nhịn ăn từ buổi sáng của ngày thử nghiệm, chỉ được cho dùng nước.

Phương pháp

- Thỏ được tiêm dưới da Celactar 2% (3mg/kg) (2,0g xylazin trong 100mL, sản phẩm của Bayer Ltd.), và sau đó là ketamin (50mg ketamin trong 1mL, sản phẩm của Fuji Chemical Industries, Ltd.) được tiêm vào trong tĩnh mạch (10mg/kg) để gây mê.

- Thỏ được mở bụng bằng cách cắt giữa bụng và thùy trái gan lộ ra và cắt nhanh v=bằng dao mổ một khoảng 1cm để gây ra sự xuất huyết.

- Sau khi xác nhận có sự rỉ máu khi mổ, máu được loại bỏ càng nhiều càng tốt bằng gạc và vết rạch gan được xử lý bằng dung dịch peptit chứa nước.

- Dung dịch peptit chứa nước được keo hóa được loại bỏ 1 phút sau khi xử lý nhờ sử dụng dung dịch muối sinh lý, và sự có mặt của sự xuất huyết từ vết rạch gan được xác nhận bằng mắt thường.

Kết quả

Fig.10 thể hiện tác dụng cầm máu của dung dịch peptit chứa nước đối với sự xuất huyết từ vết rạch gan trong ví dụ này. Hoàn toàn không thấy có sự keo hóa và tác dụng cầm máu khi dung dịch peptit chứa nước IE1K9 được sử dụng làm lớp phía trên trên bề mặt tổn thương xuất huyết, nhưng dung dịch peptit chứa nước IEIK13 và dung dịch peptit chứa nước KLD được keo hóa sau khi phủ, và không thấy có sự xuất huyết.

Ví dụ 10. Sự tự lắp ghép của dung dịch peptit chứa nước có mật thỏ

Sự tự lắp ghép của dung dịch peptit chứa nước có mật thỏ được đánh giá với các dung dịch peptit chứa nước khác nhau.

Nguyên liệu

- Dung dịch peptit chứa nước

1. Dung dịch peptit chứa nước 1,5% (trình tự peptit: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

2. Dung dịch peptit chứa nước 1% (trình tự peptit: 1EIK9, CPC Scientific, Inc)

3. Dung dịch peptit chứa nước 1% (trình tự peptit: IEIK13, CPC Scientific, Inc)

4. Dung dịch peptit chứa nước 1% (trình tự peptit: KLD, CPC Scientific, Inc)

- Động vật

Thỏ trắng Nhật Bản (3,0-4,0 kg, Japan White, bình thường, bán tại Funabashi Farm Co., Ltd.). Động vật được nuôi bằng các viên thức ăn dành cho vật nuôi (JA Higashinihon Kumiai Shiryō) được cấp trong buồng nuôi động vật được điều chỉnh đến nhiệt độ trong phòng 25°C, độ ẩm 65% và thời gian chiếu sáng 12 giờ (7:00-19:00), và nước được cung cấp thoải mái bằng chai nước. Cho nhin ăn từ buổi sáng của ngày thử nghiệm, chỉ được cho dùng nước.

Phương pháp

- Thỏ được tiêm dưới da Celactar 2% (3mg/kg) (2,0g xylazin trong 100mL, sản phẩm của Bayer Ltd.), và sau đó là ketamin (50mg ketamin trong 1mL, sản phẩm của Fuji Chemical Industries, Ltd.) được tiêm vào trong tĩnh mạch (10mg/kg) để gây mê.

- Thỏ được mở bụng bằng cách cắt giữa bụng, và mật được lấy mẫu từ túi mật bằng cách sử dụng kim tiêm 23G (Terumo Corp.).

- Các giọt của từng dung dịch peptit chứa nước trước khi tự lắp ghép được tạo ra (đường kính: khoảng từ 5 đến 8mm), và mật đã lấy mẫu được nhỏ đều vào đó để bao phủ lấy dung dịch peptit chứa nước.

- Sau khoảng 30 giây, mật được loại bỏ và sự tự lắp ghép được xác nhận, và gel tự lắp ghép bị phá vỡ bằng kim tiêm 23G.

Kết quả

Fig.11 thể hiện ví dụ về sự tự lắp ghép của dung dịch peptit chứa nước của ví dụ này bởi mật. Sự tự lắp ghép được gây ra bởi mật được xác nhận trong tất cả các dung dịch peptit chứa nước trừ 1EIK9.

Ví dụ 11. Xác nhận tác dụng làm nghẽn mạch máu của dung dịch peptit chứa nước 3% trong quá trình làm nghẽn tĩnh mạch cửa của chuột

Dung dịch peptit chứa nước 3% được tiêm qua tĩnh mạch cửa của chuột, và tác dụng làm nghẽn mạch máu được đánh giá.

Nguyên liệu

- Dung dịch peptit chứa nước 3% (trình tự peptit: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

- Động vật

Chuột SD (250g, đực, bán tại Japan SLC, Inc.) được nuôi trong buồng nuôi động vật được điều chỉnh đến nhiệt độ/độ ẩm: 22±3°C/50±20%, tần suất thông khí: 10-15 lần/giờ, thời gian chiếu sáng: chiếu sáng nhân tạo trong 12 giờ (8:00-20:00), và được cho ăn thoải mái với sản phẩm dạng rắn CRF-1 (Oriental Yeast Co., Ltd.) bằng cách sử dụng thiết bị cấp thức ăn làm bằng kim loại, với sự cung cấp nước máy nhờ thiết bị cấp nước tự động.

Phương pháp

- Chuột được gây mê bằng diethyl ete (Kishida Chemical Co., Ltd.).

- Chuột được mổ bụng bởi nhát cắt giữa bụng và tĩnh mạch cửa lộ ra.

- 4mL dung dịch peptit chứa nước được tiêm qua cuống tĩnh mạch cửa bằng kim tiêm 23G (Terumo Corp.), và sự xuất huyết từ vị trí chọc được ngăn chặn lại ngay bằng dung dịch peptit chứa nước.

- Gan được tách ra 5 phút sau khi tiêm và được hãm ngay bằng 10% formalin (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

- Mô được nhuộm bằng haematoxylin eosin (HE) 1 tuần sau khi hãm.

Kết quả

Như được thể hiện trên Fig.12, sự làm nghẽn tĩnh mạch của với dung dịch peptit chứa nước được xác nhận.

Ví dụ 12. Xác nhận sự tự lắp ghép của dung dịch peptit chứa nước hoà tan iopamidol

Sự tự lắp ghép của dung dịch peptit chứa nước hoà tan iopamidol được đánh giá.

Nguyên liệu

- Dung dịch peptit chứa nước

Dung dịch peptit chứa nước 3% (trình tự peptit: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

- Môi trường nuôi cấy tế bào (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco)
- Iopamidol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

Phương pháp

- 306,2mg iopamidol được hoà tan trong 1mL dung dịch peptit chứa nước 3%.

- Dung dịch peptit 3% chứa iopamidol được pha loãng bằng nước MilliQ để điều chế dung dịch peptit chứa nước 0,0468%. 300µl môi trường nuôi cấy tế bào được bổ sung theo 6 phần, 50µl ở lần đầu, đến 100µl dung dịch peptit chứa iopamidol 3% và dung dịch peptit chứa iopamidol 0,0468%, bao quanh và tiếp xúc với dung dịch peptit chứa iopamidol 3% và dung dịch peptit chứa iopamidol 0,0468%. 15 phút sau khi bổ sung môi trường nuôi cấy, môi trường nuôi cấy xung quanh được loại bỏ và sự keo hoá được xác nhận bằng mắt thường.

Kết quả

Như được thể hiện trên Fig.13, sự tự lắp ghép được xác nhận với dung dịch peptit chứa iopamidol.

Ví dụ 13. Xác nhận sự tự lắp ghép của dung dịch peptit chứa iopamidol 3% sau khi đi qua ống thông nhỏ

Sự tự lắp ghép của dung dịch peptit chứa nước 3% hoà tan iopamidol được đánh giá.

Nguyên liệu

- Dung dịch peptit chứa nước

Dung dịch peptit chứa nước 3% (trình tự peptit: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc.)

- Môi trường nuôi cấy tế bào (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco)

- Iopamidol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

- Ống thông nhỏ (2.4 Fr, 150/20, *Boston Scientific*)

Phương pháp

- 306,2mg iopamidol được hoà tan trong 1mL dung dịch peptit chứa nước 3%.

- Dung dịch peptit 3% chứa opamidol được cho vào trong môi trường nuôi cấy tế bào qua ống thông.

Kết quả

Như được thể hiện trên Fig.14, sự tự lắp ghép được xác nhận với dung dịch peptit 3% chứa iopamidol.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Tác nhân làm lành mô bao gồm peptit, trong đó peptit này có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, tác nhân làm lành mô này khác biệt ở khả năng nút các vị trí tổn thương mô ở các động vật có vú, trong đó tác nhân làm lành mô này keo hóa bằng cách tự lắp ghép thành cấu trúc tấm β ở độ pH sinh lý với sự có mặt của các ion kim loại kiềm có hóa trị một.
2. Tác nhân làm lành mô theo điểm 1, trong đó tác nhân này còn bao gồm thuốc phân tử nhỏ.
3. Tác nhân làm lành mô theo điểm 2, trong đó thuốc phân tử nhỏ được chọn từ nhóm bao gồm glucoza, sacaroza, sacaroza được tinh chế, lactoza, maltoza, trehaloza, dextran, iot, lysozym clorua, dimetylisopropylazulen, tretinoin tocoferil, povidon iot, alprostadil alfadex, rượu aniza, isoamyl salixylat, rượu α, α -dimetylphenyletyl, bacdanol, helional, sulfazin bạc, bucladesin natri, alprostadil alfadex, gentamycin sulfat, tetracyclin hydroclorua, natri fusidat, mupirocin canxi hydrat và isoamyl benzoat.
4. Tác nhân cầm máu cho sự xuất huyết ở tình trạng chức năng gây đông máu bị giảm do sự bổ sung chất chống đông gây ra, trong đó tác nhân này bao gồm tác nhân làm lành mô theo điểm 1.
5. Tác nhân cầm máu cho bề mặt thương tổn xuất huyết của tổ chức nhu mô, trong đó tác nhân này bao gồm tác nhân làm lành mô theo điểm 1.
6. Tác nhân cầm máu đối với sự xuất huyết động mạch và xuất huyết tĩnh mạch, trong đó tác nhân này bao gồm tác nhân làm lành mô theo điểm 1.
7. Tác nhân ngăn chặn sự rò rỉ từ túi mật hoặc ống mật, trong đó tác nhân này bao gồm tác nhân làm lành mô theo điểm 1.
8. Tác nhân ngăn chặn sự xuất huyết hoặc sự rò rỉ không khí từ phổi, trong đó tác nhân này bao gồm tác nhân làm lành mô theo điểm 1.

9. Dịch truyền niêm mạc mô để nâng vị trí cắt bỏ trong quá trình hút niêm mạc nội soi, dịch truyền này bao gồm tác nhân làm lạnh mô theo điểm 1.

10. Tác nhân ngăn chặn sự xuất huyết và sự rò dịch cơ thể từ vị trí cắt theo phương pháp cắt phần mô niêm mạc mà đã được nâng lên bởi sự truyền chất lỏng vào trong mô niêm mạc, tác nhân này chứa tác nhân làm lạnh mô theo điểm 1.

11. Tác nhân cầm máu có thể dùng để truyền qua ống thông để cầm máu từ vị trí cắt trong quá trình hút niêm mạc nội soi, tác nhân này chứa tác nhân làm lạnh mô theo điểm 1.

12. Tác nhân nút động-tĩnh mạch để nút động-tĩnh mạch, trong đó tác nhân này chứa tác nhân làm lạnh mô theo điểm 1.

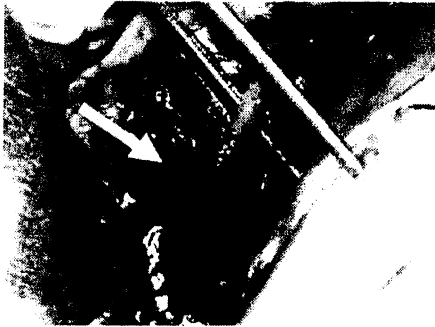
13. Tác nhân nút động-tĩnh mạch để nút động-tĩnh mạch theo điểm 12, trong đó tác nhân này còn chứa thuốc điều trị ung thư hoặc thuốc tương phản, hoặc thuốc điều trị ung thư và thuốc tương phản.

14. Tác nhân xơ hoá giãn tĩnh mạch để xơ hoá giãn tĩnh mạch, trong đó tác nhân này chứa tác nhân làm lạnh mô theo điểm 1.

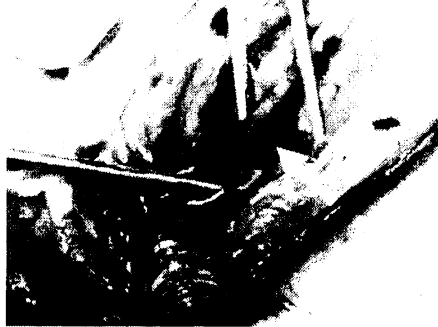
15. Tác nhân xơ hoá giãn tĩnh mạch để xơ hoá giãn tĩnh mạch theo điểm 14, trong đó tác nhân này còn chứa thuốc điều trị ung thư hoặc thuốc tương phản, hoặc thuốc điều trị ung thư và thuốc tương phản.

Fig. 1

a)



d)



b)



e)



c)



f)



Fig. 2

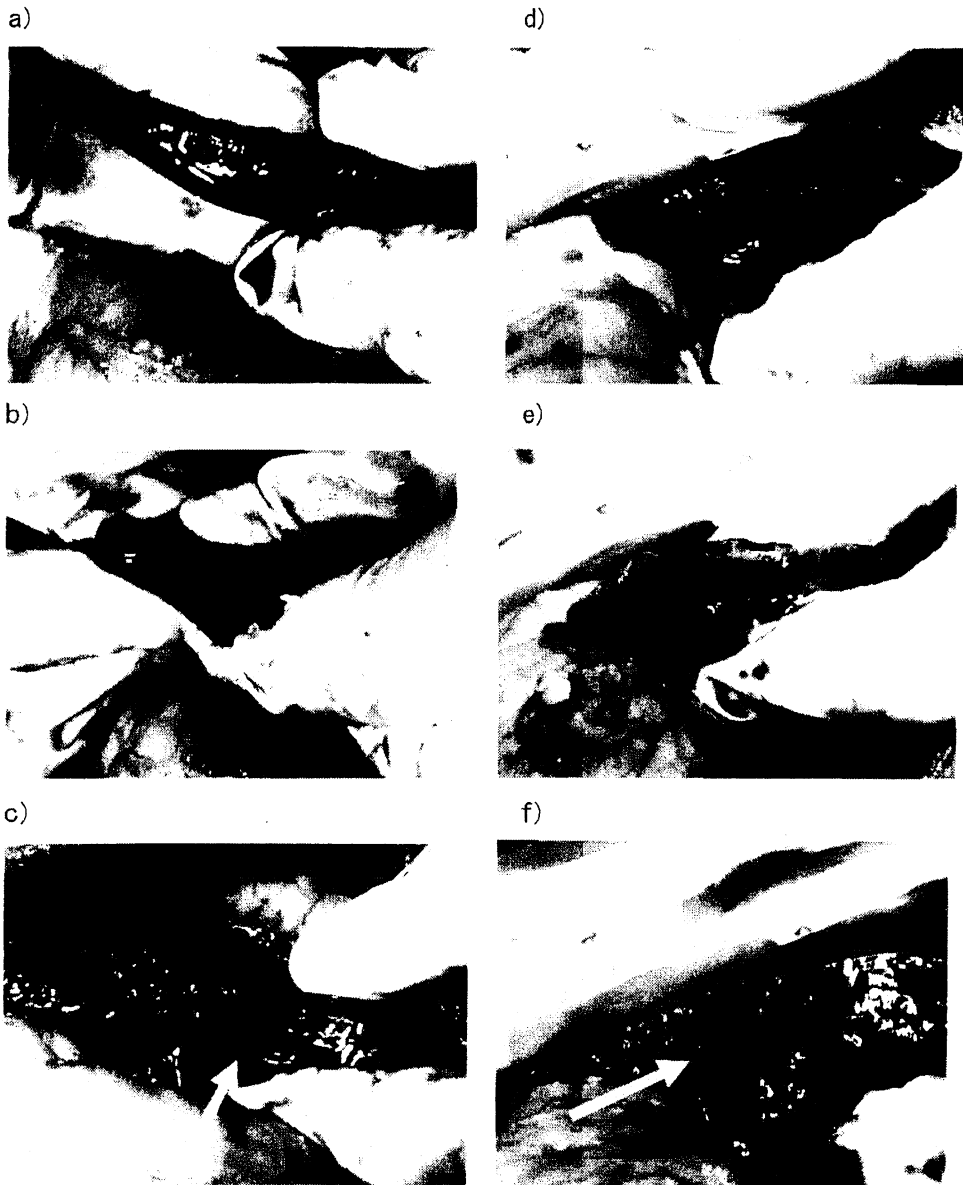
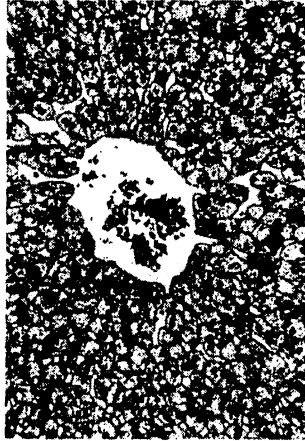


Fig. 3

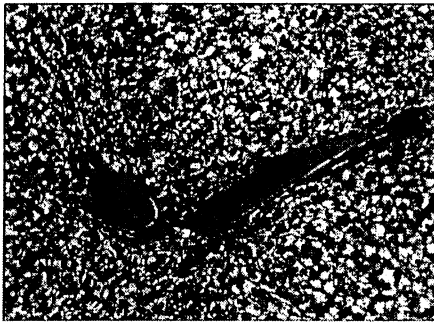
a)



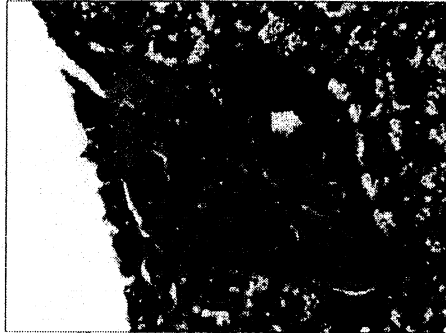
b)



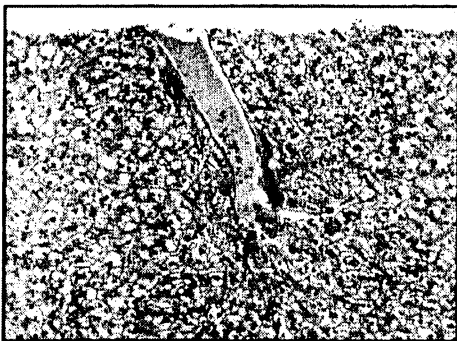
c)



d)



e)



f)



Fig. 4

a)



b)



c)



d)



Fig. 5

a)



b)



c)



d)



Fig. 6

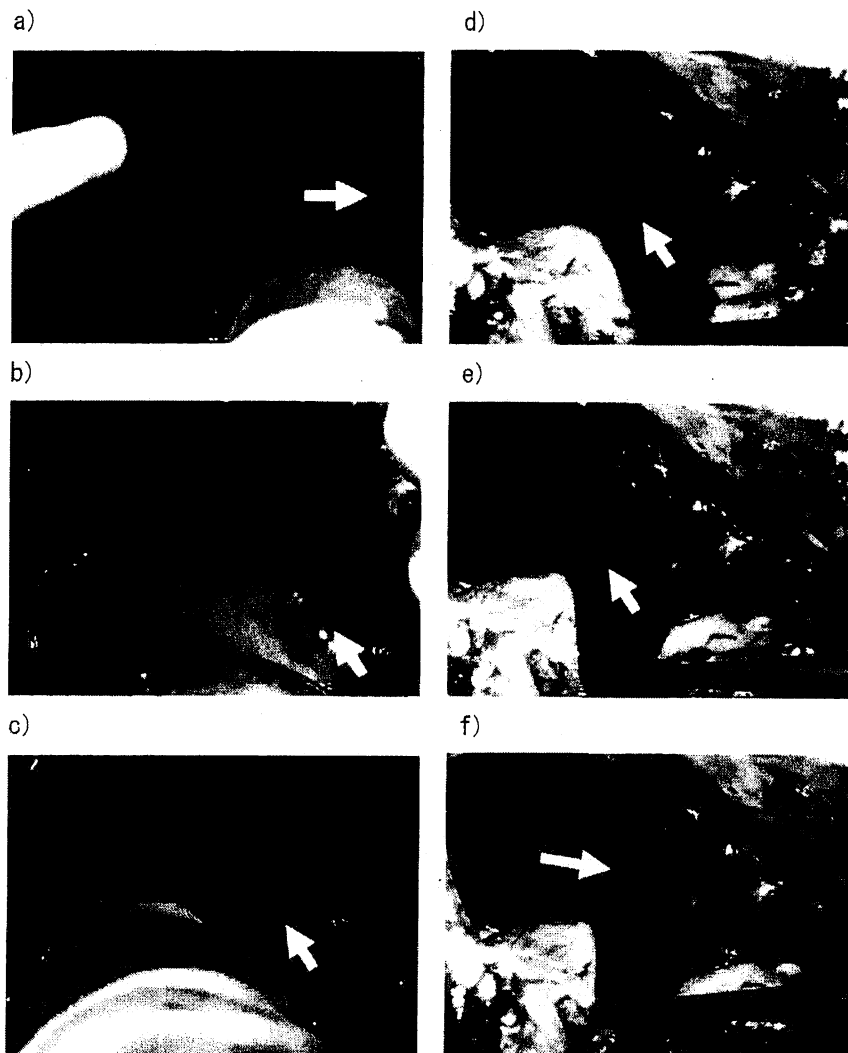
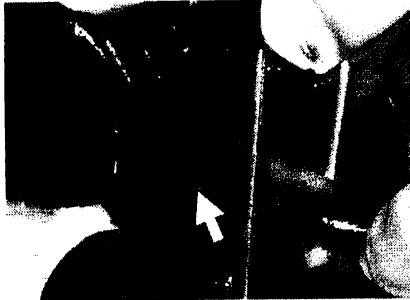


Fig. 7

a)



b)



c)

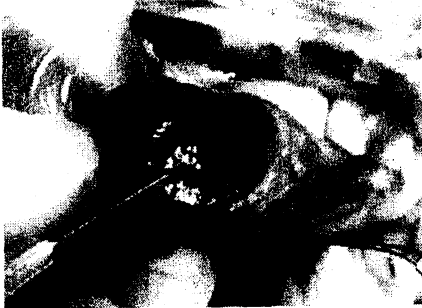


d)



Fig. 8

a)



b)



c)



d)



Fig. 9

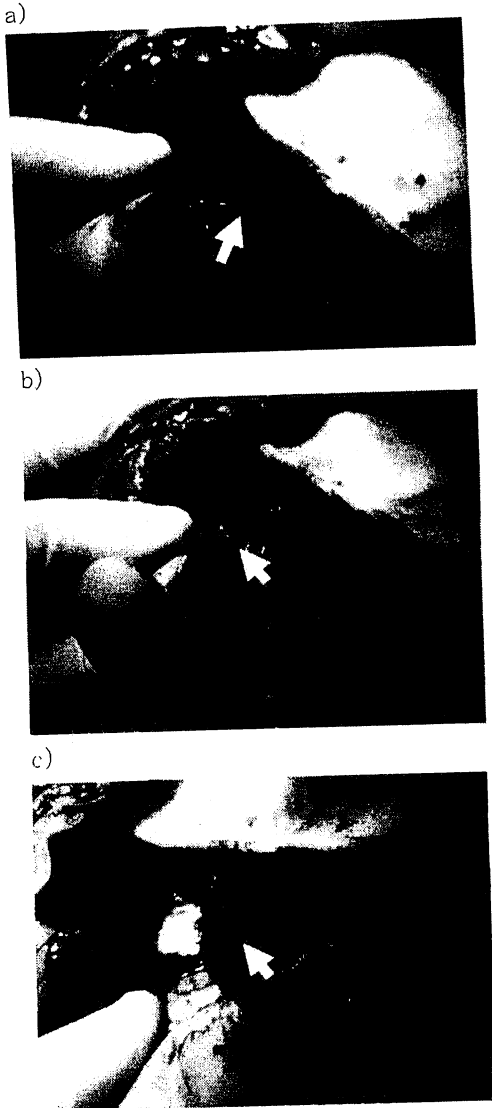


Fig. 10

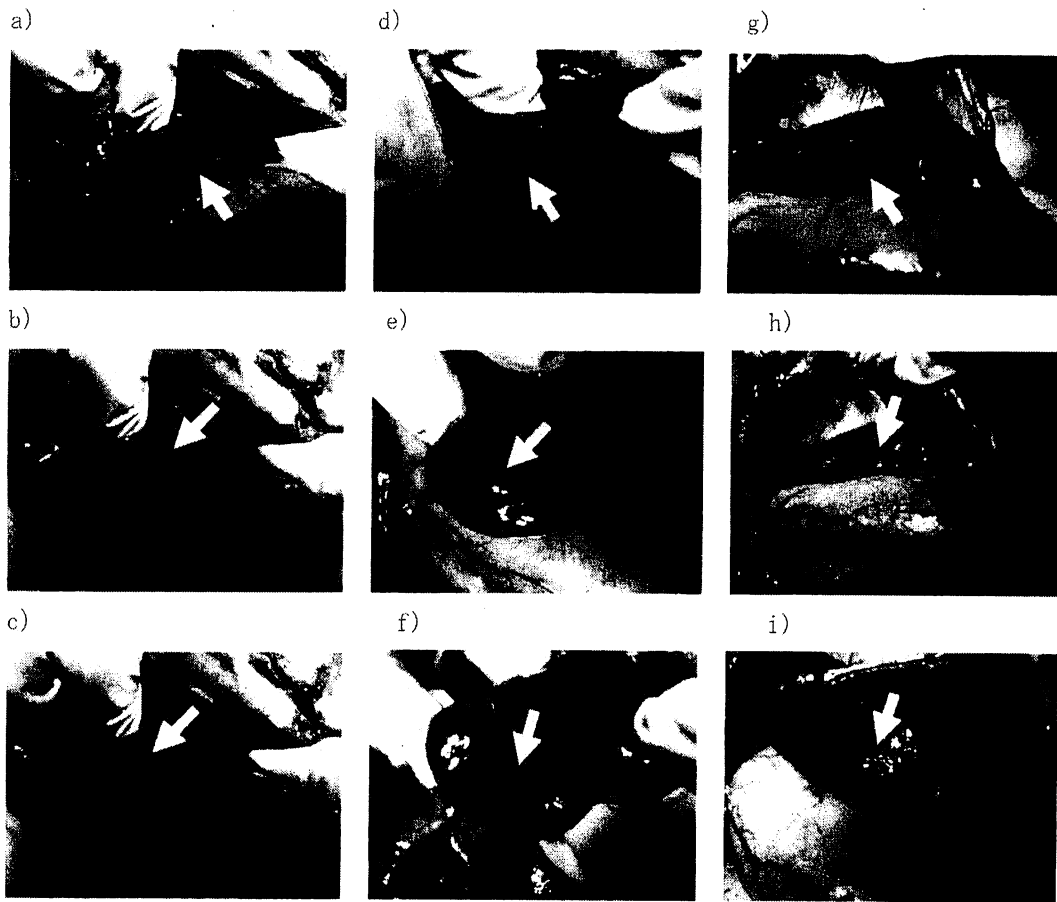


Fig. 11

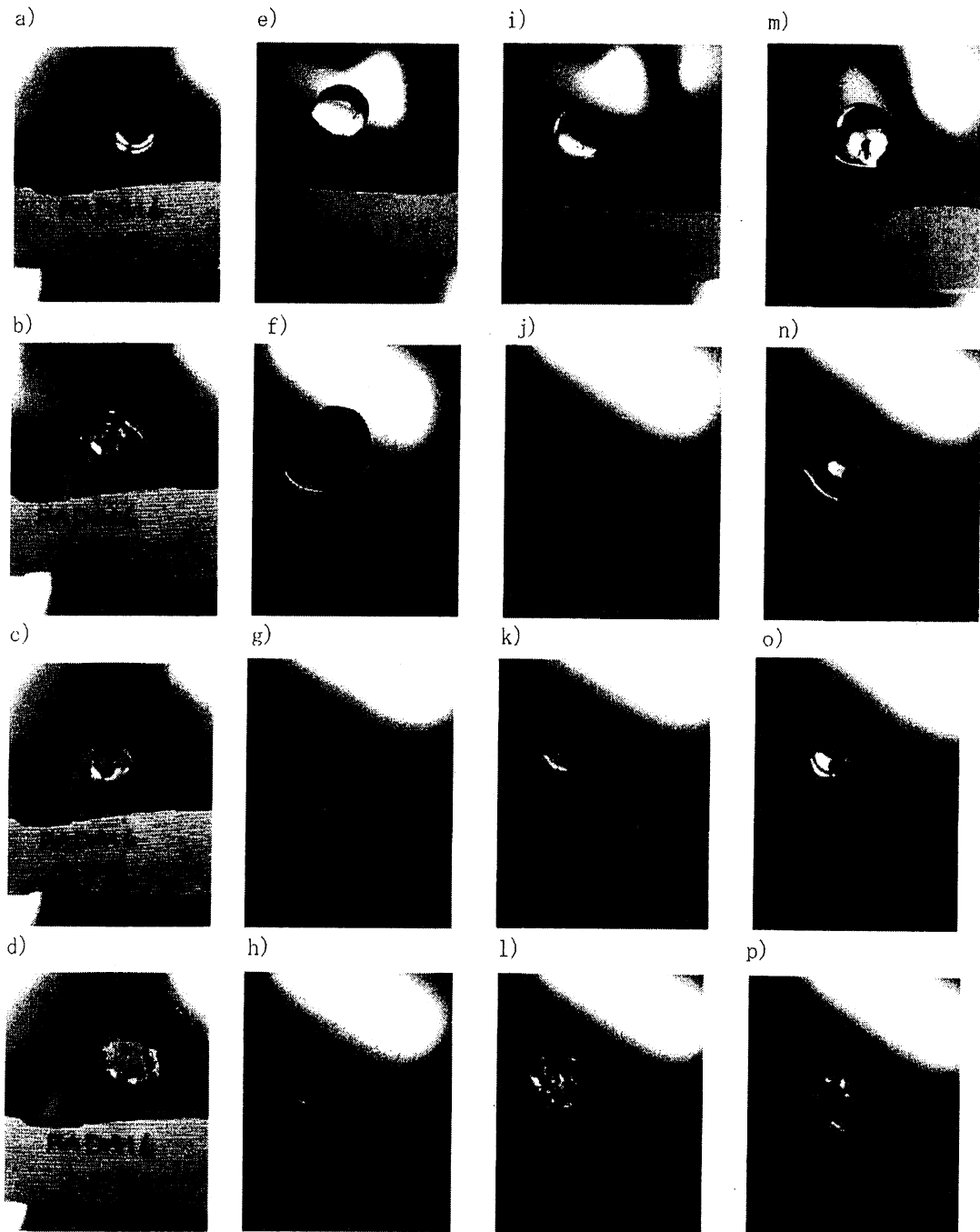


Fig. 12

a)



b)

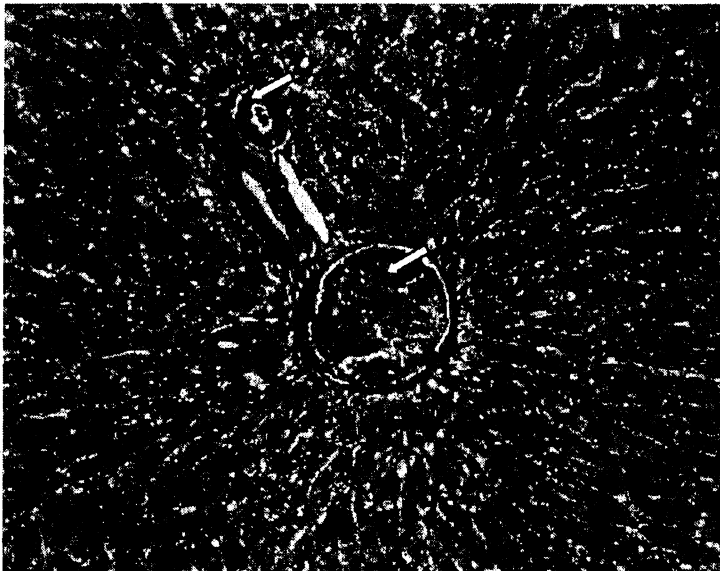


Fig. 13

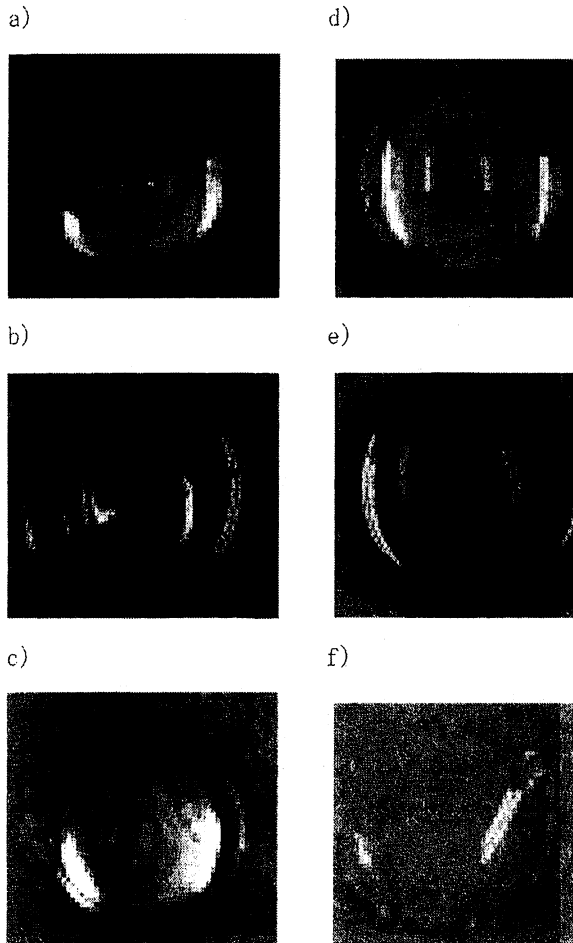
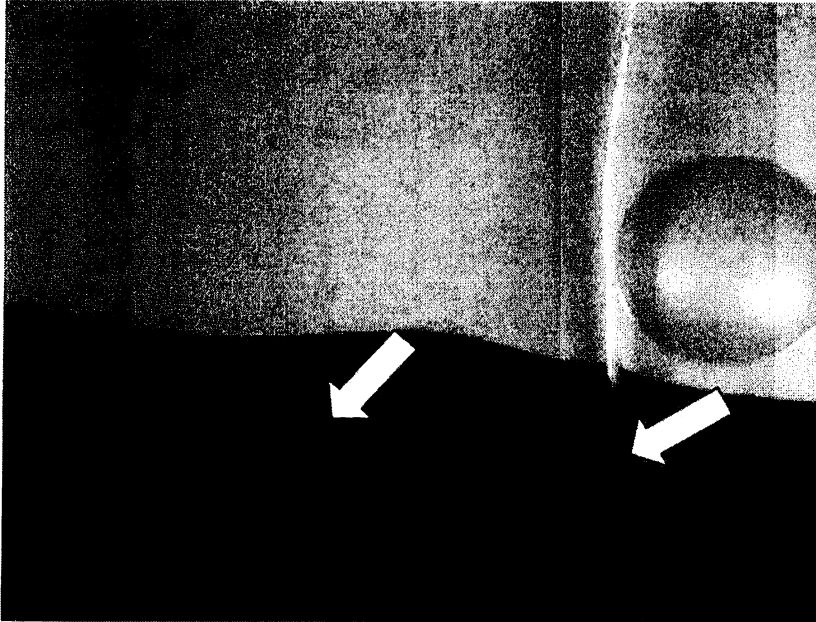


Fig. 14



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> 3-D Matrix, Ltd.

<120> Tác nhân làm lành mô, tác nhân cầm máu và tác nhân ngăn chặn sự xuất huyết

<130> FP-3240PCT

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit thiết kế

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Axetyl hóa

<400> 1

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
1 5 10 15

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit thiết kế

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Axetyl hóa

<400> 2

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile
1 5 10

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> peptit thiết kế

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)
<223> Axetyl hóa

<400> 3

Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu
1 5 10

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> peptit thiết kế

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Axetyl hóa

<400> 4

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile
1 5