



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0002333

(51)⁷ **A61K 38/00**

(13) **Y**

(21) 2-2017-00073

(22) 20/03/2017

(45) 25/06/2020 387

(43) 25/09/2018 366A

(73) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội (VN)
334 Nguyễn Trãi, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Hồng Loan (VN); Phan Tuấn Nghĩa (VN).

(54) **CƠ CHẤT PEPTIT ĐẶC HIỆU ĐỂ XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ PROTEAZA HIV-1**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến cơ chất peptit đặc hiệu để xác định hoạt độ của proteaza, trong đó cơ chất này là đoạn peptit có trình tự bao gồm: Arg-Lys-Ile-Nle-Nph-Leu-Asp-Gly-Nle, trình tự này được nhận biết đặc hiệu bởi enzym proteaza HIV-1 tại vị trí Nle-Nph, hấp thụ cực đại tại bước sóng tử ngoại. Cơ chất peptit đặc hiệu theo giải pháp hữu ích còn được axetyl hóa tại đầu Arg cũng như bổ sung Gly-Nle-NH₂ tại đầu Asp để tăng cường độ ổn định của cơ chất.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực sinh hóa, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến cơ chất peptit đặc hiệu để xác định hoạt độ proteaza HIV-1 và phương pháp xác định hoạt độ của proteaza HIV-1 bằng cơ chất này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Virut typ 1 gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV-1) là tác nhân chính gây nên hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải ở người (AIDS). Trong chu trình tái bản của virut, proteaza có vai trò quan trọng trong việc phân cắt các polyprotein tiền thân gag và gag-pol thành những protein cấu trúc và chức năng cần thiết cho quá trình trưởng thành của virut. Vì vậy, proteaza của HIV-1 (protease HIV-1) được xem như một trong các đích quan trọng nhất cho liệu pháp dùng thuốc ức chế proteaza (PI) kháng HIV-1. Cho đến nay, việc sử dụng các chất ức chế enzym của HIV-1 trong đó có proteaza vẫn là phương thức điều trị phổ biến cho người bị nhiễm HIV/AIDS.

Khác với các proteaza khác, proteaza HIV-1 có tính đặc hiệu cao trong nhận biết và phân cắt các cơ chất, enzym chỉ thủy phân các cơ chất có liên kết đặc hiệu tương tự như các vị trí cắt của nó trong cấu trúc của protein gag và gag-pol trong HIV-1. Vì vậy, phần lớn cơ chất của proteaza HIV-1 là các chuỗi peptit gồm từ 7 axit amin P4-P3' có trình tự giống với một trong các vị trí cắt đặc hiệu của proteaza HIV-1 trên các chuỗi polyprotein này. Mặt khác, các nghiên cứu cũng cho thấy kích thước, trình tự và đặc tính của các axit amin đều ảnh hưởng đến cấu hình của cơ chất với trung tâm hoạt động của proteaza HIV-1, qua đó ảnh hưởng đến ái lực của cơ chất với enzym. Hiện nay, có nhiều loại cơ chất huỳnh quang hoặc cơ chất cải biến tại vị trí phân cắt khác nhau cho xác định hoạt độ của proteaza HIV-1 đã được thương mại hóa. Tuy nhiên, trình tự axit amin của các cơ chất này thường không được công bố. Ngoài ra, giá thành của các cơ chất này khá cao và cần có trang thiết bị máy móc phù hợp. Trong đó, cơ chất peptit cải biến là cơ chất có axit amin tại vị trí P1-P1' bị biến đổi so với trình tự nguyên bản ban đầu của HIV; P1 luôn là Leu hoặc Nle và P1' là Nph để tạo liên kết hấp thụ cực đại tại bước sóng tử ngoại. Hoạt độ của proteaza HIV-1 được đánh giá dựa trên sự giảm độ hấp

thụ của cơ chất theo thời gian trên máy quang phổ thông thường và có thể phù hợp với nhiều phòng xét nghiệm.

Do đó, cần có cơ chất đặc hiệu có ái lực cao đối với proteaza HIV-1 sử dụng trong phân tích hoạt độ của enzym này để sàng lọc và phát hiện các chất ức chế proteaza HIV-1. Cơ chất cần ổn định, đặc hiệu và có thể sử dụng được trong các phòng xét nghiệm có máy quang phổ thông thường. Qua đó, góp phần tạo cơ sở cho các nghiên cứu nhằm phát triển các thuốc ức chế proteaza HIV-1.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để giải quyết vấn đề nêu trên, giải pháp hữu ích đề xuất cơ chất để xác định hoạt độ của proteaza HIV-1 và phương pháp xác định hoạt độ của proteaza HIV-1 dựa trên cơ chất này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề xuất cơ chất để xác định hoạt độ của proteaza HIV-1, trong đó cơ chất này là đoạn peptit có trình tự bao gồm: Arg-Lys-Ile-Nle-Nph-Leu-Asp.

Theo một phương án ưu tiên, cơ chất theo giải pháp đã được cải biến tại vị trí Nle-Nph để được nhận biết đặc hiệu bởi enzym proteaza HIV-1, có ái lực cao với enzym và hấp thụ cực đại tại bước sóng A_{300} nm; được axetyl hóa tại đầu Arg và gắn thêm trình tự Gly-Nle-NH₂ vào đầu Asp, theo đó cơ chất có trình tự bao gồm: Ac-Arg-Lys-Ile-Nle-Nph-Leu-Asp-Gly-Nle-NH₂.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp xác định hoạt độ của enzym proteaza HIV-1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị hỗn hợp phản ứng cách ủ 50-60 μ M cơ chất theo điểm 1 hoặc 2 ở 37°C với 300 μ l đệm 2X bao gồm Na-acetat 200 mM, pH 4,7, EDTA 8 mM, β -mecaptoethanol 10 mM, NaCl 1,8 M, CaCl₂ 10 mM để hoạt hóa cơ chất;

b) phân cắt cơ chất bởi enzym bằng cách bổ sung 300 ng proteaza HIV-1 vào hỗn hợp phản ứng đã hoạt hóa cơ chất thu được từ bước a) và trộn đều; và

c) xác định hoạt độ của enzym proteaza HIV-1 bằng cách đo mật độ quang của hỗn hợp phản ứng ở bước sóng A_{300} trong 5 phút ở 37°C và xác định đơn vị hoạt độ của enzym proteaza theo hàm lượng cơ chất bị phân hủy.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Biểu đồ khảo sát về ảnh hưởng của lượng proteaza HIV-1 (A) và nồng độ cơ chất theo giải pháp hữu ích (peptit CH) (B) đến tốc độ phản ứng thủy phân bởi proteaza HIV-1.

Hình 2. Biểu đồ so sánh tốc độ thủy phân cơ chất theo giải pháp hữu ích (peptit CH) với sản phẩm thương mại L6525 (Sigma Aldrich).

Hình 3: Biểu đồ khảo sát ảnh hưởng của pepstatin (A) và saquinavir (B) đến hoạt tính của proteaza HIV-1.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích mô tả chi tiết các phương án cụ thể, các phương án này chỉ nhằm mục đích nhằm bộc lộ giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi của giải pháp hữu ích.

Theo đó, giải pháp hữu ích đề xuất cơ chất để xác định hoạt độ của proteaza HIV-1 và phương pháp xác định hoạt độ của proteaza HIV-1 dựa trên cơ chất này.

Trừ khi có quy định khác, các ký hiệu được sử dụng trong bản mô tả đối với trình tự axit amin là ký hiệu chung đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được sử dụng theo quy tắc thông dụng theo thông lệ quốc tế, cụ thể là:

Viết tắt	Tên axit amin
Arg	Arginin
Lys	Lysin
Ile	Isoleuxin
Nph	4-NO ₂ -phenylalanin
Leu	Leuxin
Asp	Axit aspartic
Gly	Glyxin
Nle	Norleuxin

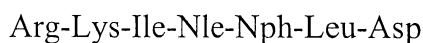
Trong quá trình nghiên cứu cơ chất của enzym proteaza HIV-1, các tác giả nhận thấy rằng cơ chất peptit cải biến với P1 luôn là Leu hoặc Nle và P1' là Nph để tạo liên kết

hấp thụ cực đại tại bước sóng tử ngoại. Cơ chất này thường được thiết kế tại vị trí p24/p2 trên polyprotein gag với trình tự Lys-Ala-Arg-Val-Leu*Ala-Glu-Ala-NH₂ (* là vị trí cắt của proteaza HIV-1), trong đó Leu thường được cải biến thành Nle, Ala được cải biến thành Nph. Cụ thể, Nle không có mạch bên R phân nhánh; Nph có chứa nhóm NO₂ là nhóm hút điện tử làm cho liên kết CO*NH giữa CO của Nle và NH của Nph trở nên lỏng lẻo hơn so với CO*NH của Leu và Nph, giúp tăng hiệu quả phân cắt cơ chất bởi enzyme. Bên cạnh đó, Nph có khả năng hấp thụ cực đại ánh sáng tại bước sóng 300 nm giúp xác định được hoạt tính của proteaza trên cơ sở giảm độ hấp thụ ánh sáng của cơ chất.

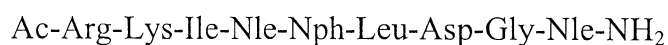
Tuy nhiên, trên chuỗi polyprotein gag-pol tiền thân, vị trí P^{6pol}-PR được phân cắt đầu tiên để giải phóng proteaza HIV-1 có hoạt tính cho các bước thủy phân tại gag-pol và gag tiếp theo tạo các protein cấu trúc và chức năng cần thiết cho HIV-1. Mặt khác, một số nghiên cứu cho thấy, cơ chất dựa trên trình tự cắt tại P^{6pol}-PR trên polyprotein gag-pol lại có hiệu quả nhất. Kích thước, trình tự và đặc tính các axit amin đều ảnh hưởng đến cấu hình và ái lực của cơ chất với trung tâm hoạt động của proteaza HIV-1. Do đó, có thể các trình tự phân cắt trên gag-pol tạo ra các enzyme (protease, reverse transcriptaza và integraza) có ái lực hơn so với các vị trí khác trên gag.

Vì vậy, các tác giả phát hiện ra rằng để hiệu quả cắt cao bởi proteaza HIV-1, vị trí cắt tại RT-IN của gag-pol với trình tự Arg-Lys-Ile-Leu*Phe-Leu-Asp trên gag-pol được lựa chọn để thiết kế cơ chất peptit cải biến. Trong đó, tại P1*P1' là Leu*Phe được biến đổi thành Nle*Nph làm cho liên kết không bị thay đổi nhiều so với cấu trúc tự nhiên. Ngoài ra, khi được gắn đoạn Gly-Nle-NH₂ vào đầu Asp sẽ giúp cơ chất ổn định hơn.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề xuất cơ chất để xác định hoạt độ của proteaza HIV-1, trong đó cơ chất này là đoạn peptit có trình tự như sau:



Theo một phương án ưu tiên, cơ chất theo giải pháp còn được axetyl hóa tại đầu Arg cũng như được gắn đoạn Gly-Nle-NH₂ vào đầu Asp và có trình tự như sau (peptit CH):



Cơ chất này có thể được tổng hợp bằng phương pháp tổng hợp hóa học hoặc được biểu hiện trong hệ sinh vật chủ bằng con đường chuyển gen.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp xác định hoạt độ của enzym proteaza HIV-1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) chuẩn bị hỗn hợp phản ứng; b) phân cắt cơ chất bởi enzym; và c) xác định hoạt độ của enzym proteaza HIV-1.

Trong bước chuẩn bị hỗn hợp phản ứng, 50-60 μM cơ chất (peptit CH) theo giải pháp hữu ích được ủ ở 37°C với 300 μl đệm 2X bao gồm Na-acetat 200 mM, pH 4,7, EDTA 8 mM, β -mecaptoethanol 10 mM, NaCl 1,8 M, CaCl_2 10 mM để hoạt hóa cơ chất.

Trong bước phân cắt cơ chất bởi enzym, tiến hành bổ sung 300 ng proteaza HIV-1 vào hỗn hợp phản ứng đã hoạt hóa cơ chất và trộn đều.

Trong bước xác định hoạt độ của enzym proteaza HIV-1, hỗn hợp phản ứng được đo mật độ quang ở bước sóng A_{300} trong 5 phút ở 37°C , tiếp đó xác định đơn vị hoạt độ của enzym proteaza theo hàm lượng cơ chất bị phân hủy.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Xác định hoạt độ và ái lực của cơ chất theo giải pháp hữu ích đối với enzym proteaza HIV-1

Cơ chất (peptit CH) có trình tự Ac-Arg-Lys-Ile-Nle-Nph-Leu-Asp-Gly-Nle- NH_2 được đặt hàng tổng hợp bởi công ty Genscrip (Hoa Kỳ) với độ tinh sạch trên 95%, sản phẩm ở dạng bột trắng.

Chế phẩm enzym proteaza HIV-1 (HIV-PrHis) cần xác định hoạt độ là sản phẩm protein tái tổ hợp của Phòng protein tái tổ hợp, Phòng thí nghiệm Trọng điểm công nghệ enzym và protein, trường Đại học Khoa học Tự nhiên cung cấp.

Ủ 50 μM cơ chất ở 37°C với 300 μl đệm 2X bao gồm Na-acetat 200 mM, pH 4,7, EDTA 8 mM, β -mecaptoethanol 10 mM, NaCl 1,8 M, CaCl_2 10 mM để hoạt hóa cơ chất trong cuvet. Tiếp đó bổ sung 300 ng proteaza HIV-1 và trộn đều. Sau đó tiến hành đo mật độ quang của hỗn hợp phản ứng ở bước sóng A_{300} trong 5 phút ở 37°C trên máy

quang phổ khả biến DU800 của hãng Beckman Coulter. Số liệu được phân tích bằng phần mềm Origin Pro.

Để xác định tốc độ phản ứng thủy phân cơ chất (hoạt độ) bởi enzym proteaza HIV-1 thử nghiệm. Tiến hành các thử nghiệm như trên nhưng với các lượng proteaza HIV-1 (500 ng, 1000 ng, 1500 ng, 1700 ng, 2000 ng và 2500 ng proteaza) và nồng độ cơ chất khác nhau (từ 50 đến 400 μ M). Kết quả được thể hiện trên Hình 1. Theo đó nồng độ proteaza HIV-1 134 nM tương đương với 1 μ g trong thể tích phản ứng là 300 μ l là thích hợp nhất đối với phản ứng thủy phân cơ chất Peptit CH, đảm bảo sự biến đổi tuyến tính giữa mức độ chuyển hóa cơ chất theo thời gian phản ứng. Nồng độ cơ chất Peptit CH thích hợp nhất trong phản ứng trong khoảng 50-60 μ M đảm bảo mức độ tuyến tính của tốc độ hình thành sản phẩm. Phản ứng thủy phân cơ chất (peptit CH) bởi proteaza HIV-1 tối thích trong đệm Na-acetat 100 mM pH 4,7; NaCl 0,9 M, EDTA 4 mM, β -ME 5 mM, CaCl_2 5 mM.

Dựa trên kết quả Hình 1B và phương trình Michalis-Menten cũng tính toán được hoạt độ riêng và ái lực (K_m - hằng số Michalis-Menten) của peptit CH trong phản ứng bị thủy phân bởi proteaza HIV-1 tương ứng là 904,35 U/ μ g và 67,3 μ M.

Ví dụ 2. Đánh giá tốc độ thủy phân cơ chất theo giải pháp hữu ích và sản phẩm thương mại L6525 bởi enzym proteaza HIV-1

Để đánh giá đặc tính của cơ chất theo giải pháp hữu ích (peptit CH) với sản phẩm thương mại có trên thị trường. Tiến hành thử nghiệm với cơ chất L6525 của hãng Sigma Aldric. Tiến hành thử nghiệm như trên với cơ chất theo giải pháp hữu ích (peptit CH) với cơ chất L6525. Kết quả được thể hiện trên Hình 2.

Kết quả cho thấy, hoạt độ riêng của proteaza HIV-1 trong phản ứng thủy phân hai cơ chất là tương đương nhau (904,35 U/ μ g của peptit CH và 1000,65 U/ μ g của L6525); trong khi đó ái lực của proteaza HIV-1 với L6525 cao gấp 3,2 so với cơ chất theo giải pháp (peptit CH), nhưng tốc độ cực đại của cơ chất theo giải pháp (peptit CH) cao gấp 3,9 lần tốc độ của L6525.

Ví dụ 3. Thử nghiệm về khả năng tác động của chất ức chế proteaza lên phản ứng thủy phân cơ chất theo giải pháp hữu ích

Để xác định khả năng sử dụng cơ chất theo giải pháp hữu ích (peptit CH) trong các phản ứng sàng lọc chất ức chế của proteaza HIV-1. Tiến hành thử nghiệm với hai chất ức chế đã biết pepstatin A và saquinavir trong điều kiện thử nghiệm như trên. Kết quả cho thấy các chất ức chế này đã ức chế phản ứng thủy phân cơ chất peptit CH của proteaza HIV-1 với các giá trị IC_{50} tương ứng là: 93,6 nM và 5,9 nM. Kết quả được thể hiện trên Hình 3. Theo đó cho thấy enzym proteaza HIV-1 có khả năng thủy phân đặc hiệu cơ chất theo giải pháp hữu ích (peptit CH). Kết quả này tương tự như các công bố trước đây về khả năng ức chế proteaza của peptatin A và saquinavir khi sử dụng các cơ chất thương mại. Qua đó cho thấy hoàn toàn có thể sử dụng cơ chất thiết kế Peptit CH cho các phản ứng sàng lọc chất ức chế của proteaza HIV-1.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Bằng cách thiết kế cơ chất đặc hiệu với enzym proteaza HIV-1, cơ chất theo giải pháp hữu ích có khả năng được thủy phân đặc hiệu bởi enzym proteaza HIV-1. Bằng cách thay thế vị trí cắt đặc hiệu Leu-Ala trong trình tự gốc bằng Nle-Nph cho phép cơ chất theo giải pháp hữu ích hấp phụ được ánh sáng ở bước sóng 300 nm, nhưng vẫn đặc hiệu với enzym proteaza HIV-1, điều này cho phép xác định được hoạt độ của enzym, trợ giúp cho quá trình sàng lọc các hợp chất có hoạt tính proteaza HIV-1 để ức chế quá trình phát triển của HIV.

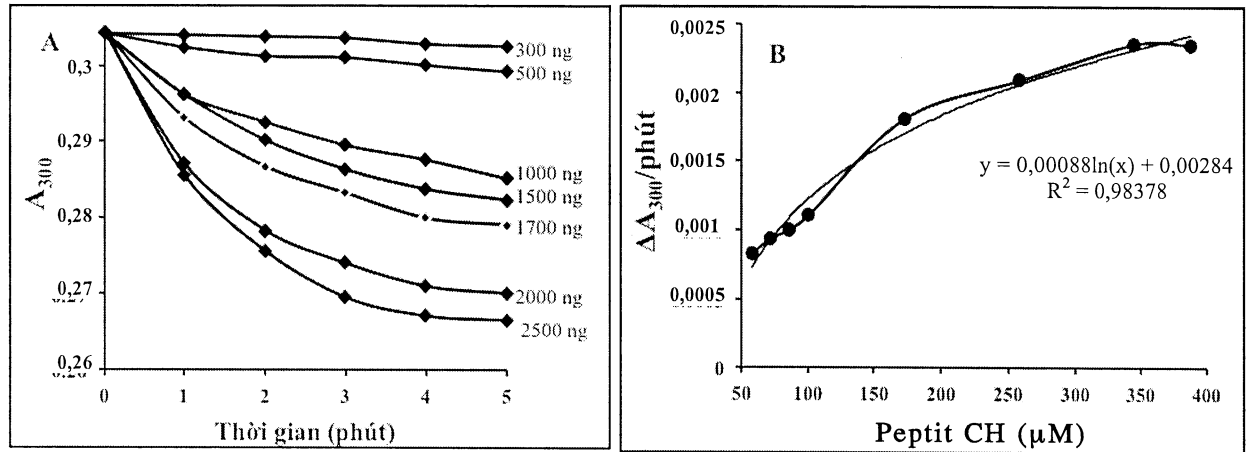
Phương pháp xác định hoạt độ của proteaza HIV-1 bằng cách sử dụng cơ chất theo giải pháp hữu ích được dựa trên cơ sở đo quang, hoạt độ của proteaza HIV-1 được xác định theo mật độ quang, do đó có khả năng ứng dụng trong các cơ sở thử nghiệm có thiết bị đo quang mà không cần các thiết bị đo phức tạp.

Bằng việc ứng dụng cơ chất và phương pháp xác định hoạt độ của proteaza HIV-1 mang lại khả năng phát triển thuốc điều trị HIV trên cơ sở phát triển, sàng lọc enzym proteaza HIV-1 mà không cần đầu tư các thiết bị chuyên dụng, giảm được chi phí thử nghiệm.

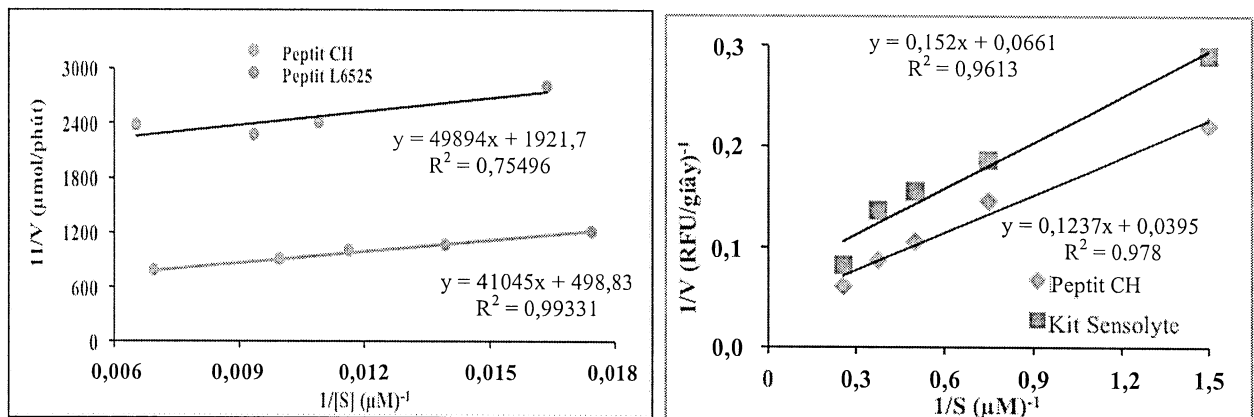
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cơ chất peptit đặc hiệu để xác định hoạt độ của proteaza HIV-1, trong đó cơ chất này là đoạn peptit có trình tự bao gồm: Arg-Lys-Ile-Nle-Nph-Leu-Asp.
2. Cơ chất theo điểm 1, trong đó cơ chất này còn được axetyl hóa tại đầu Arg cũng như được gắn đoạn Gly-Nle-NH₂ vào đầu Asp và có trình tự bao gồm: Ac-Arg-Lys-Ile-Nle-Nph-Leu-Asp-Gly-Nle-NH₂.

HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3

