



(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)



1-0024510

(51)⁷ C07K 7/06; A61K 38/08; A61P 35/00

(13) B

(21) 1-2012-00438

(22) 12/02/2010

(86) PCT/KR2010/000907 12/02/2010

(87) WO2011/019123 17/02/2011

(30) 10-2009-0075142 14/08/2009 KR

(45) 27/07/2020 388

(43) 25/05/2012 290A

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

Techno 10-ro 51, Yuseong-gu, Daejeon 305-510, Republic of Korea

(72) KIM, Hae Jin (KR); MOON, Eun Joung (KR); KIM, Yang Seon (KR); KWON, Young Joon (KR).

(74) Công ty TNHH Trường Xuân (AGELESS CO.,LTD.)

(54) PEPTIT VÀ CHẾ PHẨM CHỨA PEPTIT NÀY

(57) Sáng chế đề xuất peptit chỉ chứa trình tự axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và muối được dụng của peptit này. Pepit theo sáng chế và muối được dụng của peptit này có hiệu quả trong điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh thoái hóa đĩa đệm, điều trị bệnh xơ hóa các cơ quan trong cơ thể, điều trị bệnh ung thư và/hoặc điều trị bệnh xơ cứng tiểu cầu thận, và có hiệu quả ức chế sự phát tín hiệu TGF-beta 1. Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất chế phẩm dùng để điều trị và phòng ngừa bệnh thoái hóa đĩa đệm, bệnh xơ hóa các cơ quan trong cơ thể, bệnh ung thư, hoặc bệnh xơ cứng tiểu cầu thận chứa peptit hoặc muối được dụng của peptit theo sáng chế.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến peptit có hiệu quả điều trị và/hoặc phòng bệnh thoái hóa đĩa đệm, điều trị bệnh xơ hóa các cơ quan cơ thể, điều trị ung thư, điều trị bệnh xơ cứng tiểu cầu thận, hoặc các bệnh tương tự. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chứa peptit này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh thoái hóa đĩa đệm (Degenerative disc disease - DDD), nguyên nhân gây đau thắt lưng mạn tính, là tình trạng bệnh lý kèm theo đau thắt lưng gây ra từ sự nứt và phân cắt của đĩa đệm do sự thoái hóa đĩa đệm hoặc giảm chiều cao đĩa đệm khi đĩa đệm bị mất nước (đặc biệt là phần nhân nhầy) cùng với sự lão hóa. Đĩa đệm bị thoái hóa được đặc trưng bởi sự hình thành mạch và thần kinh bất thường tăng lên và thay đổi số lượng và chức năng của các tế bào (sự tạo cụm, chết hoại, chết theo chương trình, v.v.). Một trong số các đặc trưng phân tử của đĩa đệm bị thoái hóa là giảm aggrecan. Sự mất đi aggrecan, đóng vai trò chủ yếu đối với sự chịu tải của đĩa, dẫn đến sự giảm áp suất thẩm thấu đĩa đệm, do đó có khả năng giữ nước không lâu, sau đó đẩy nhanh sự thoái hóa đĩa đệm hiện tại bao gồm sợi vòng hiện tại, và có ảnh hưởng đáng kể lên các cấu trúc xương sống khác và các chức năng, chẳng hạn như thoái hóa và phì đại mặt khớp và dây chằng vòng.

Với các liệu pháp điều trị hiện nay đối với chứng đau thắt lưng mạn tính bệnh lý bao gồm thoái hóa đĩa đệm, có các liệu pháp điều trị y khoa bao gồm dùng thuốc giảm đau, thực hiện các liệu pháp điều trị phục hồi chức năng, và tương tự. Tuy nhiên, với các hướng điều trị này thì bệnh thường xuyên tái phát, do đó cần có một thời gian dài và nỗ lực điều trị bệnh liên quan, và cũng có nguy cơ biến chứng do dùng thuốc kéo dài.

Khi không có kết quả thuận lợi ngay cả sau khi điều trị với liệu pháp thận trọng trong một thời gian dài, người bệnh chắc chắn sẽ phải phẫu thuật. Các cách điều trị bằng phẫu thuật tiêu biểu bao gồm phẫu thuật làm cứng khớp đốt sống lưng thông thường liên quan đến việc loại bỏ hoàn toàn các mô đĩa đệm có bệnh và chèn mô xương ghép vào vị trí thương tổn đích, và chèn đĩa nhân tạo mới tạo ra. Tuy nhiên, các

phương pháp này có nhiều nhược điểm khác nhau chẳng hạn như chi phí tương đối đắt và cũng có các nguy cơ tiềm ẩn là các biến chứng xảy ra sớm hoặc muộn sau khi phẫu thuật. Ví dụ, phẫu thuật làm cứng khớp đốt sống lưng thường yêu cầu phẫu thuật lặp lại định kỳ do sự thoái hóa của các đĩa đệm liên kề. Đĩa đệm nhân tạo được phát triển để giảm bớt nhược điểm này không có kết quả thỏa đáng khi nghiên cứu bám sát một thời gian dài. Do đó, phẫu thuật thay thế đĩa đệm nhân tạo không được thực hiện thường xuyên hiện nay. Như được mô tả ở trên, có một khó khăn lớn trong điều trị bệnh đau thắt lưng mạn tính do thoái hóa đĩa đệm. Để đối phó với các tình thế như vậy, như một hướng tiếp cận khác để điều trị thận trọng và phẫu thuật, các liệu pháp điều trị thực nghiệm đã được thử để đạt được sự tái tạo đĩa đệm trong khi hạn chế sự tự thoái hóa của đĩa đệm đến mức tối thiểu.

Trong những năm gần đây, đã có một vài liệu pháp điều trị sinh học được thử nghiệm để điều trị sự thoái hóa đĩa đệm, ví dụ, phương pháp điều chỉnh tăng sự tạo ra các protein gian bào quan trọng (ví dụ, aggrecan), phương pháp điều chỉnh giảm sự dị hóa gây ra bởi các cytokin gây viêm (ví dụ, interleukin-1 (IL-1), nhân tố gây chết hoại khối u -alpha (TNF- α)) (Ahn, SH et al., Spine 27:911-917, 2002; Burke JG et al., Spine 28:2685-2693, 2003; Kang JD et al., Spine 21:271-277, 1996; Weiler C et al., Spine 30:44-53, 2005; Igarashi T et al., Spine 25:2975-2980, 2000; Olmarker K et al., Spine 23:2538-2544, 1998; Le Maitre CL et al., Arthritis Res Ther 7:R732R745, 2005; và Seguin CA et al., Spine 30:1940-1948, 2005).

Các phương pháp điều trị sinh học này đã được thực hiện rộng rãi trên thế giới. Phương pháp phổ biến thu hút rất nhiều sự quan tâm là tiêm trực tiếp nhân tố tăng trưởng xương (protein tạo hình xương (Bone morphogenetic protein- BMP)) vào đĩa đệm hoặc cấy các tế bào đĩa đệm được tiêm gen vào (Masuda K et al., Spine 31:742-745, 2006; Imai Y et al., Spine 32: 1197-1205, 2007; Zhang Y et al., Spine 33:831-838, 2008). Tuy nhiên, phương pháp này chỉ đơn thuần là phương pháp thu được các thay đổi vật lý của cấu trúc đĩa thông qua sự thoái hóa tự nhiên, không tạo cảm giác giảm đau cho bệnh nhân, và đĩa đệm phát triển quá mức, nếu có, có thể gây ra các tình trạng trầm trọng do chèn ép dây thần kinh.

Đồng thời, cần hiểu rằng việc phát tín hiệu TGF-beta 1 có liên quan trong bệnh xơ hóa, sự chết theo chương trình, sự hình thành mạch, sự xâm lấn của tế bào khối u và sự chuyển hóa, và sự ức chế phát tín hiệu TGF-beta 1 có thể đo được để điều trị

bệnh xơ hóa các cơ quan của cơ thể, bệnh ung thư, và/hoặc bệnh xơ cứng tiểu cầu thận (Prud'homme GJ, Lab Invest 87:1077-1091, 2007).

Với mục đích này, cần phát triển vật liệu sinh học mới có hiệu quả đối với bệnh thoái hóa đĩa đệm bằng cách thúc đẩy sự tái tạo đĩa đệm trong khi hạn chế sự tự thoái hóa đĩa đến mức tối thiểu, và có khả năng điều trị các bệnh xơ hóa các cơ quan trong cơ thể, bệnh ung thư, xơ cứng tiểu cầu thận, hoặc tương tự, thông qua ức chế sự phát tín hiệu TGF-beta 1.

US 6,277,812 đã đề cập đến phương pháp ức chế TGF- β với sự trợ giúp của trình tự axit amin của vùng liên kết TGF- β của thành viên của siêu họ decorin của proteoglycan ở động vật có vú có protein lõi có kích thước khoảng 40 kDa.

A. G. Nerlin và cộng sự (Eur. Spine J. 2005, 14: 17-26) đề cập đến nghiên cứu về sự phân bố của fibronectin và TGF- β 1 trong mô đĩa đệm từ các cá thể ở các độ tuổi khác nhau và bằng chứng mô học khác nhau cho sự thoái hóa mô.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất peptit có khả năng thúc đẩy sự tái tạo đĩa đệm trong khi hạn chế được sự tự thoái hóa đĩa đệm đến mức tối thiểu.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chế phẩm có hiệu quả trong điều trị bệnh xơ hóa các cơ quan, bệnh ung thư hoặc xơ cứng tiểu cầu thận.

Sáng chế đề xuất peptit chỉ chứa trình tự axit amin (LQVVYLH) có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, hoặc muối dược dụng của peptit này.

Trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.1 có L, Q, V, Y, và H lần lượt là leuxin (Leu), glutamin (Gln), valin (Val), tyrosin (Tyr), và histidin (His).

Mỗi axit amin cấu thành peptit có thể ở dạng L, dạng D, và/hoặc dạng D, tất cả các dạng này đều được bao gồm trong các axit amin cấu thành peptit theo sáng chế.

Các ví dụ về muối dược dụng có thể bao gồm hydroclorit, sulfat, phosphat, lactat, maleat, fumarat, oxalat, methanesul fonat, p-toluenesulfonat, và tương tự.

Ngoài ra, sáng chế mô tả cách sử dụng peptit hoặc thể biến dị, hoặc muối dược dụng của peptit đó theo sáng chế làm dược phẩm. Cách sử dụng làm dược phẩm bao gồm dùng để điều trị và/hoặc phòng ngừa các bệnh thoái hóa đĩa đệm, sử dụng để điều

trị bệnh xơ hóa các cơ quan trong cơ thể, sử dụng để điều trị bệnh ung thư, và sử dụng để điều trị bệnh xơ cứng tiểu cầu thận. Việc điều trị các bệnh xơ hóa các cơ quan trong cơ thể, bệnh ung thư, hoặc bệnh xơ cứng tiểu cầu thận là nhờ ức chế sự phát tín hiệu nhân tố sinh trưởng chuyển hóa beta 1 (Transforming Growth Factor-beta1 - TGF- β 1).

TGF- β được biết đến là cytokin nhiều tác động đóng vai trò quan trọng trong kiểm soát sự chết tế bào theo chương trình, sự hình thành mạch, sự lên da non của vết thương, sự điều chỉnh miễn dịch, và sinh học khối u. TGF- β tồn tại trong ba đồng phân: TGF- β 1, TGF- β 2, và TGF- β 3. Tất cả ba TGF- β đều sử dụng cùng một thụ thể. Thụ thể TGF- β có ba hợp phần: loại I (RI hoặc ALK5), loại II (RII), và loại III (RIII hoặc betaglycan). TGF- β (tất cả các đồng phân) liên kết với RIII và phức hợp RII, sau đó phosphorylat RI thành dạng phức chất heterotetrameric serin/threonin kinaza. Nói cách khác, RI phosphorylat Smad2 và Smad3 (các Smads kết hợp với thụ thể (R-Smads)), và phần còn lại tạo phức heteromeric với Smad4, hoán vị với nhân tế bào, liên kết với DNA và điều chỉnh sự sao chép (Prud'homme GJ, Lab Invest 87:1077-1091, 2007).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 minh họa hình ảnh chụp sau khi nhuộm màu mô đĩa đệm bình thường, mô đĩa đệm bị thoái hóa được dùng DMSO, và mô đĩa đệm bị thoái hóa được dùng peptit theo ví dụ 1;

Fig.2 minh họa đồ thị thể hiện các mức biểu hiện gen aggrecan của nhóm đĩa đệm được dùng DMSO và nhóm đĩa đệm được dùng peptit theo ví dụ 1 trong mẫu thoái hóa đĩa đệm, so với nhóm đĩa đệm bình thường làm đối chứng; và

Fig.3 minh họa các kết quả phân tích thẩm tách Western để xác nhận Smad2 phosphorylat được biểu hiện trong các tế bào HepG2 không điều trị, các tế bào được điều trị với TGF-beta 1, các tế bào được điều trị với TGF-beta 1/SB431542, các tế bào được điều trị với TGF-beta 1/peptit theo ví dụ 1, và các tế bào được điều trị với TGF-beta 1/DMSO.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo theo sáng chế, thuật ngữ “ức chế sự phát tín hiệu TGF-beta 1” chỉ TGF- β 1 bị lỗi khi liên kết với thụ thể, sau đó Smad2 và Smad3 bị lỗi khi trải qua quá trình

phosphorylat hóa, do đó có lỗi khi tạo phức với Smad4, và kết quả là, phức chất bị lỗi khi hoán vị với nhân tế bào và điều chỉnh sự sao chép.

Theo đó, sáng chế mô tả chế phẩm dùng để điều trị và/hoặc phòng ngừa thoái hóa đĩa đệm, bao gồm peptit hoặc muối được dụng của peptit đó theo sáng chế.

Ngoài ra, sáng chế mô tả chế phẩm dùng để điều trị các bệnh xơ hóa các cơ quan trong cơ thể, bao gồm peptit hoặc muối được dụng của peptit đó theo sáng chế.

Ngoài ra, sáng chế mô tả chế phẩm dùng để trị bệnh ung thư, bao gồm peptit hoặc muối được dụng của peptit đó theo sáng chế.

Ngoài ra, sáng chế mô tả chế phẩm dùng để điều trị bệnh xơ cứng tiểu cầu, bao gồm peptit hoặc muối được dụng của peptit đó theo sáng chế.

Peptit theo sáng chế có thể được điều chế bằng các quy trình thông thường được sử dụng trong tổng hợp peptit. Ví dụ, peptit có thể được điều chế bằng các quy trình được mô tả trong tài liệu Schroder và Lubke, Peptit, Vol. 1, Academic Press, New York, 1965, và tương tự, và có thể được điều chế bằng phương pháp tổng hợp pha lỏng hoặc tổng hợp pha rắn.

Các ví dụ về các phương pháp tạo ra các liên kết peptit bao gồm phương pháp azid, phương pháp axit clorid, phương pháp anhydrid đối xứng, phương pháp carbodiimid, phương pháp bổ sung carbodiimid, phương pháp este được kích hoạt, phương pháp carbodiimidazol, phương pháp oxy hóa – khử, và phương pháp sử dụng thuốc thử Woodward K. Trong tổng hợp peptit, nửa cystin có thể được tạo ra bằng cách sử dụng dẫn xuất của cystin hoặc bằng cách chuyển hóa nửa cystein của chuỗi peptit thành nửa cystin sau khi tạo ra chuỗi peptit, bằng phương pháp thông thường.

Trước khi thực hiện phản ứng ghép cặp, nhóm cacboxyl, nhóm amin, nhóm guanidino, nhóm hydroxyl, và tương tự, không tham gia phản ứng, có thể được bảo vệ, và nhóm cacboxyl và nhóm amin, tham gia phản ứng ghép cặp, có thể được hoạt hóa bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực tương ứng.

Các ví dụ về nhóm bảo vệ cho nhóm cacboxyl có thể bao gồm các nhóm tạo este như metyl, etyl, benzyl, p-nitrobenzyl, t-butyl và cyclohexyl.

Các ví dụ về các nhóm bảo vệ cho nhóm amin có thể bao gồm benzyloxycarbonyl, t-butoxycarbonyl, isobornyloxycarbonyl, và/hoặc 9-fluorenylmethyloxycarbonyl.

Các ví dụ về các nhóm bảo vệ cho nhóm guanidino có thể bao gồm nitro, benzyloxycarbonyl, tosyl, p-metoxybenzenesulfonyl và/hoặc 4-metoxy- 2,3,6-trimethylbenzenesulfonyl .

Các ví dụ về các nhóm bảo vệ cho nhóm hydroxyl có thể bao gồm t- butyl , benzyl, tetrahydropyranyl và/hoặc axetyl.

Các ví dụ về các dạng hoạt hóa của nhóm cacboxyl có thể bao gồm anhydrid đối xứng, azid và este hoạt tính (este với rượu, ví dụ, pentaclorophenol, 2,4-dinitrophenol, cyanometyl alcohol, p-nitrophenol, N- hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboximid, N-hydroxysuccinimid, N- hydroxyphtalimid và 1-hydroxybenzotriazol).

Một ví dụ về nhóm amin hoạt hóa là amit phosphat.

Phản ứng được thực hiện trong dung môi như clorofom, diclorometan, etyl axetat, N,N-dimetylformamit, dimetylsulfoxit, pyridin, dioxan, tetrahydrofuran, nước, metanol hoặc hỗn hợp của chúng.

Nhiệt độ phản ứng có thể nằm trong phạm vi từ khoảng -30 đến 50°C, đây là phạm vi nhiệt độ thường được sử dụng cho sáng chế.

Phản ứng để loại bỏ nhóm bảo vệ của peptit theo sáng chế có thể thay đổi phụ thuộc vào loại nhóm bảo vệ, nhưng có thể chỉ là một phương pháp duy nhất mà có thể loại bỏ nhóm bảo vệ mà không gây ảnh hưởng đến liên kết peptit.

Nhóm bảo vệ có thể được loại bỏ nhờ xử lý axit, ví dụ, xử lý với axit clohydric, axit bromhydric, axit flohydric, axit methansulfonic, axit trifloromethansulfonic, axit trifloroaxetic hoặc hỗn hợp của các axit này. Ngoài ra, sự khử với kim loại natri trong dung dịch amoniac hoặc khử nhờ xúc tác trên hệ palladi-cacbon có thể được sử dụng.

Để thực hiện phản ứng loại bỏ nhóm bảo vệ bằng xử lý axit nói trên, chất phụ trợ như anisol, phenol hoặc thioanisol có thể được chấp nhận.

Sau khi phản ứng kết thúc, peptit điều chế được theo sáng chế có thể được thu hồi bằng quy trình thông thường để tinh chế peptit, ví dụ, chiết, sắc ký phân đoạn, sắc ký trao đổi ion, kết tinh lại hoặc sắc ký cột.

Ngoài ra, peptit theo sáng chế có thể được chuyển hóa thành dạng muối được dụng của peptit đó như được mô tả ở trên theo cách thông thường.

Peptit theo sáng chế có thể được tổng hợp bằng thiết bị tổng hợp peptit tự động hoặc có thể được sản xuất bằng kỹ thuật thao tác gen. Ví dụ, peptit mong muốn có thể được tạo ra bằng cách điều chế gen dung hợp mã hóa protein dung hợp gồm có phần dung hợp và peptit theo sáng chế thông qua sự thao tác gen, biến đổi vi sinh vật chủ với gen dung hợp, biểu hiện peptit mong muốn ở dạng protein trong vi sinh vật chủ, và tách nhánh và phân tách peptit theo sáng chế ra khỏi protein dung hợp sử dụng proteaza hoặc hợp chất.

Các axit amin theo sáng chế được viết tắt theo danh pháp IUPAC_IUB như sau:

Axit amin	Viết tắt
Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Axit aspartic	E
Cystein	C
Axit Glutamic	D
Glutamin	Q
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Metionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

Liều peptit hoặc muối được dụng của peptit đó nằm trong khoảng từ 50 µg/ngày đến 1 mg/ngày, tốt hơn là từ 0,5 mg/ngày đến 1 mg/ngày khi dùng ngoài ruột. Đối với việc dùng thuốc theo đường miệng, liều dùng lớn hơn từ 1,2 đến 1,5 lần so với liều dùng ngoài ruột. Đối với cách đặt hậu môn, liều dùng lớn hơn từ 2 đến 5 lần so với liều dùng ngoài ruột. Peptit theo sáng chế được chỉ định dùng ở mức độ lớn theo đường dùng ngoài ruột, ví dụ tiêm tại chỗ (tiêm thuốc vào đĩa đệm đôi cột bệnh thoái hóa đĩa đệm, và tiêm thuốc tại chỗ vào vị trí thương tổn đối với các bệnh xơ cứng các cơ quan trong cơ thể khác và ung thư), tiêm tĩnh mạch/tiếp bắp hoặc tiêm dưới da, đưa thuốc vào não thất hoặc đưa thuốc vào trong cột sống hoặc dùng thuốc qua đường mũi và đưa thuốc vào trực tràng. Ngoài ra, dùng thuốc theo đường miệng cũng có thể được sử dụng nếu cần.

Peptit hoặc chế phẩm theo sáng chế, kết hợp với chất mang được dụng, có thể được tạo công thức thành các dạng liều dùng mong muốn như thuốc tiêm, thuốc đạn, thuốc bột, thuốc nhỏ mũi, thuốc hạt, viên nén, v.v.

Chất mang được dụng có thể được điều chế theo số lượng nhân tố đã biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực tương ứng, ví dụ, xem xét đến các nhân tố không hạn chế dưới đây: vật liệu kích hoạt sinh lý cụ thể được dùng, và nồng độ, độ ổn định và tính khả dụng sinh học mong muốn của vật liệu đó; bệnh, rối loạn hoặc tình trạng đang được điều trị; đối tượng đang được điều trị, và tuổi của họ, kích thước và điều kiện chung; và đường dùng chế phẩm mong muốn, ví dụ qua đường mũi, qua đường miệng, tra mắt, dùng tại chỗ, dán lên da và tiêm bắp. Thông thường, các ví dụ về chất mang được dụng được sử dụng để đưa vật liệu kích hoạt sinh lý vào cơ thể, ngoài đường dùng qua miệng, có thể bao gồm D5W (5% glucosơ trong nước), dung dịch nước chứa 5% dextrosơ theo thể tích hoặc nhỏ hơn, và nước muối sinh lý. Trong trường hợp tiêm tại chỗ vào thương tổn, các gel nước (hydrogel) có thể tiêm khác nhau có thể được sử dụng để tăng cao hiệu quả chữa bệnh và tăng thời gian hiệu lực của thuốc. Ngoài ra, chất mang được dụng có thể chứa các thành phần phụ có thể nâng cao độ ổn định của các thành phần hoạt động, như các chất bảo quản và các chất chống oxy hóa. Peptit hoặc chế phẩm theo sáng chế thích hợp là có thể được tạo công thức thành dạng liều dùng mong muốn, phụ thuộc vào bệnh cần được điều trị và các thành phần, sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, như

được bộc lộ trong "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA (tái bản gần đây nhất).

Peptit theo sáng chế có thể được bảo quản trong dung dịch nước muối sinh lý và có thể được làm đông khô trong ống thuốc tiêm sau khi thêm mannitol hoặc sorbitol. Peptit đông khô có thể được hòa tan trong nước muối sinh lý hoặc tương tự để hoàn nguyên trước khi sử dụng.

Ngoài ra, sáng chế mô tả peptit hoặc muối được dụng của peptit đó theo sáng chế để dùng làm thuốc.

Ngoài ra, sáng chế mô tả cách sử dụng peptit hoặc muối được dụng của peptit đó theo sáng chế để sản xuất thuốc dùng để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh thoái hóa đĩa đệm, xơ hóa các cơ quan trong cơ thể, ung thư, và/hoặc xơ cứng tiểu cầu thận.

Ngoài ra, sáng chế mô tả phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh thoái hóa đĩa đệm, xơ hóa các cơ quan trong cơ thể, ung thư, và/hoặc xơ cứng tiểu cầu thận, bao gồm dùng peptit hoặc thể biến dị hoặc muối được dụng của peptit đó theo sáng chế cho đối tượng cần điều trị (động vật có vú bao gồm con người).

Việc điều trị bệnh xơ hóa các cơ quan trong cơ thể, ung thư, và/hoặc xơ cứng tiểu cầu thận có thể đạt được bằng cách ức chế phát tín hiệu TGF-beta 1.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn cùng với các ví dụ thực hiện. Các ví dụ này được cung cấp chỉ nhằm minh họa sáng chế chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi và nguyên lý của sáng chế.

Ví dụ 1: Điều chế peptit

Peptit (LQVVYLH: SEQ ID NO.1) có trình tự axit amin là SEQ ID NO.1 được điều chế bởi Peptron Inc. (Hàn Quốc), theo yêu cầu của các tác giả sáng chế. Cụ thể, các đơn vị axit amin được ghép cặp lần lượt từ Oterminal, bằng Fmoc SPPS (tổng hợp peptit pha rắn 9-fluorenylmethoxycarbonyl) sử dụng thiết bị tổng hợp peptit tự động (ASP48S, Peptron Inc.).

Nhựa NH₂-His(Trt)-2-clo-Trityl được sử dụng trong đó axit amin thứ nhất của đầu C của peptit được gắn vào nhựa. Tất cả các axit amin được sử dụng trong tổng hợp peptit được bảo vệ bởi Trityl (Trt), t-butylloxycarbonyl (Boc), t-butyl (t-Bu) và tương

tự, nhờ đó đầu N được bảo vệ bởi Fmoc, và các gốc được loại bỏ hoàn toàn trong axit. Đối với chất ghép đôi, 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroni hexafluorophosphat (HBTU)/hydroxybenzotriazol (HOBt)/N-metylmorpholin (NMM) được sử dụng. (1) Axit amin được bảo vệ (8 đương lượng) và chất ghép đôi HBTU (8 đương lượng)/HOBt (8 đương lượng)/NMM (16 đương lượng) được hòa tan trong dimethyl formamit (DMF) và tiếp tục được bổ sung nhờ phản ứng ở nhiệt độ phòng trong thời gian 2 giờ. (2) Việc loại bỏ Fmoc được thực hiện bằng cách thêm 20% piperidin trong DMF, tiếp tục thực hiện 2 lần nhờ phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Các phản ứng (1) và (2) được lặp lại để điều chế bộ khung peptit cơ bản, và peptit được tách ra khỏi nhựa sử dụng axit trifluoroaxetic (TFA)/1,2-etanedithiol (EDT)/thioanisol/triisopropylsilan (TIS)/H₂O với tỷ lệ 90/2,5/2,5/2,5/2,5. Peptit được tinh sạch bằng HPLC pha đảo sử dụng cột Vydac Everest C18 (250 mm, 22 mm, 10 µm), và sau đó được tách rửa bằng hệ dung môi nước –axetonitril có tỷ lệ thay đổi tuyến tính (từ 10 đến 75% (thể tích/thể tích) axetonitril) chứa 0,1% (thể tích/thể tích) axit trifluoroaxetic. Trọng lượng phân tử của peptit tinh sạch được xác định sử dụng sắc ký lỏng khối phổ (LC/MS) (Agilent HP1100), sau đó được đông khô.

Ví dụ 2: Xác nhận hiệu quả tái tạo đĩa đệm

2-1. Chuẩn bị động vật mẫu bị thoái hóa đĩa đệm và thu gom đĩa đệm làm thử nghiệm

Chuẩn bị 30 cá thể thỏ (Thỏ trắng New Zealand; Orient Bio Inc.), nặng từ 3 đến 3,5 kg, không quan tâm đến giới tính.

Các cá thể thỏ được gây tê nhờ tiêm bắp 5 mg/kg xylazin (Rompun, Bayer) và 35 mg/kg ketamin hydroclorid (Ketalar, Pfizer). Trước thủ tục này, phim X quang nghiêng sử dụng thiết bị huỳnh quang nghiệm (ModelVPX-200; Toshiba Co.) được chụp lại để thiết lập độ cao ranh giới trước khi tiêm của đĩa đệm giữa các đốt sống. Sự điều kiện ranh giới là sự chuẩn hóa đối với kích thước của không gian đĩa đệm. Sau khi các cá thể thỏ được đặt lên bàn thí nghiệm, các đĩa đệm đốt sống L23, L34, L45, và L56 được xác định bằng máy, và các vòng sợi bọc ngoài đĩa đệm được đâm cấy vào phía sau-bên của đĩa đệm ở các đốt sống L23, L45, và L56, sử dụng kim 18G. Sau khi hồi phục sau gây tê, các động vật được đưa vào chuồng dưới các điều kiện gây giống sau đây: nhiệt độ 20-25°C, độ ẩm 10%- 50%, và chu kỳ sáng/tối (L/D): (sáng từ 8giờ:00 sáng đến 8giờ:00 tối). Tất cả các động vật được cho ăn một lần một ngày.

Thực hiện chụp X-quang vào 2 và 4 tuần sau khi đâm cấy vòng sợi ban đầu. Thực hiện chụp X-quang sau khi gây tê. Dựa vào các kết quả trên phim X-quang, độ cao đĩa đệm (độ cao IVD) được đo lại. Từ các kết quả đo, độ thoái hóa đĩa được xác định nhờ sự thay đổi của phương pháp được bộc lộ trong tài liệu Lu và cộng sự, Spine. 22:1828-34, 1997.

Sau đó, các thử nghiệm được thực hiện đối với hai nhóm riêng biệt, nhóm đối chứng dùng DMSO và nhóm thử nghiệm dùng peptit theo ví dụ 1, và các cá thể thử được gây mê nhẹ nhàng nhờ tiêm ketamin (25 mg/kg) và natri pentobarbital (1,2 g/kg, Nembutal, Ovation) theo lộ trình được tính toán trước, sau đó tách lấy đĩa đệm để lần lượt phân tích mô học và hóa sinh.

2-2. Đo hiệu quả tái tạo đĩa đệm bằng cách nhuộm màu mô đĩa đệm.

Các cá thể thử bị thoái hóa đĩa đệm từ mục 2-1 được chia thành 2 nhóm. Mỗi nhóm được cho dùng dimethyl sulfoxid (DMSO) và peptit theo ví dụ 1 (0,5 mM/cá thể) theo đường tiêm tại chỗ vào đĩa đệm hai lần. Thời điểm tiêm đối với mỗi nhóm là 4 tuần sau khi xảy ra thoái hóa đĩa đệm và 2 tuần sau đó. Sau khi tiêm lần thứ hai, các động vật lần lượt được thức tỉnh vào 2, 4, và 8 tuần. Ở các tuần 4, 6, và 10 sau khi tiêm lần thứ nhất của mỗi nhóm dùng peptit theo ví dụ 1 và DMSO, các mô đĩa đệm tương ứng được tách ra và được cố định trong formalin. Các mô đĩa đệm được cố định được nhúng vào trong paraffin, và các phần nối tiếp có độ dày 4 mm dọc theo mặt đối xứng dọc được chuẩn bị. Trong các phần này, hai phần dọc giữa được nhuộm màu với hematoxylin và eosin (H&E). Để so sánh với mô đĩa đệm bình thường, đĩa đệm của các cá thể thử không bị thoái hóa được tách ra, được xử lý và nhuộm màu theo phương pháp tương tự được mô tả ở trên.

Fig.1 minh họa các kết quả vi đồ hóa của các mô đĩa đệm cụ thể, được tách ra và nhuộm màu ở tuần 10. A và B: mô đĩa đệm bình thường, C và D: mô đĩa đệm thoái hóa dùng DMSO, và E và F: mô đĩa đệm thoái hóa dùng peptit theo ví dụ 1. A, C và E: phóng to 40 lần, và B, D và F: phóng to 400 lần. Trong các ảnh phóng to 400 lần, mũi tên chỉ vào nhân tế bào đĩa đệm.

Kết quả là, có thể quan sát được phần nhân nhầy và sợi bọc ngoài đĩa đệm có thể phân biệt được rạch ròi giữa chúng và dư các hợp phần gian bào được trong mô đĩa đệm bình thường (các bản A và B trên Fig.1). Ngoài ra, sự nhuộm màu đặc biệt của

nhân tế bào được quan sát trong phần nhân nhầy của mô đĩa đệm bình thường (dải B trên Fig.1).

Mặt khác, mô đĩa đệm dùng DMSO biểu hiện giảm kích thước đĩa, sự mập mờ giữa phần nhân nhầy và sợi bọc ngoài đĩa đệm, và thiếu hợp phần gian bào (các dải C và D trên Fig.1). Hơn nữa, khó khăn trong việc tìm nhân tế bào được nhuộm màu trong vùng nhân nhầy (dải D trên Fig.1). Tức là, các kết quả này chỉ ra cái chết của các tế bào, điều đã được thể hiện trong phần nhân nhầy. Tế bào bị chết do sự thoái hóa đĩa như đã biết, và sự không có các tế bào dẫn đến không tạo ra hợp phần gian bào, do đó sự thoái hóa đĩa đệm tiếp tục xấu đi.

Mô đĩa đệm dùng peptit theo ví dụ 1 biểu hiện tăng kích thước đĩa so với mô đĩa đệm dùng DMSO, có thể thấy rõ giữa phần nhân nhầy và sợi bọc ngoài đĩa đệm, và sự nhiều hợp phần gian bào (các dải E và F trên Fig.1). Ngoài ra, sự nhuộm màu mạnh của nhân tế bào được quan sát trong vùng nhân nhầy (dải F trên Fig.1).

Từ các kết quả này, chúng minh được rằng peptit theo ví dụ 1 có tác dụng điều trị bệnh đĩa đệm bằng cách ngăn sự giảm hợp phần gian bào và sự chết tế bào do thoái hóa đĩa đệm.

Ví dụ 3: Xác nhận sự tăng biểu hiện gen aggrecan trong các mô đĩa đệm

PCR thời gian thực được thực hiện để xác định mức độ biểu hiện gen của aggrecan, thể hiện hợp phần gian bào trong các mô đĩa đệm.

Theo cách tương tự như ở ví dụ 2-1, các động vật được chuẩn bị và chia thành hai nhóm. Mỗi nhóm được cho dùng DMSO và peptit theo ví dụ 1 (0,5 mM/cá thể) theo đường tiêm tại chỗ vào đĩa đệm. Thời điểm tiêm đối với mỗi nhóm là 4 tuần sau khi xảy ra thoái hóa đĩa đệm và 2 tuần sau đó. Sau khi tiêm lần thứ hai, các động vật lần lượt được thức tỉnh vào 2, 4, và 8 tuần. Ở các tuần 4, 6, và 10 sau khi tiêm lần thứ nhất của mỗi nhóm dùng peptit theo ví dụ 1 và DMSO, các mô đĩa đệm tương ứng được tách ra và phần nhân nhầy và sợi bọc ngoài đĩa đệm được tách ra và cho vào ống, sau đó đông khô trong nitơ lỏng và được bảo quản ở máy ướp lạnh nhiệt độ rất thấp pử 70°C.

Toàn bộ ARN được phân lập từ mô đĩa đệm được bảo quản và đông lạnh nhanh sử dụng hóa chất Trizol (Invitrogen). cDNA được tổng hợp sử dụng toàn bộ RNA phân lập được (2 μ g), oligo dT và Transcriptase MMLV-ngược (Invitrogen).

Khối lượng của mRNA của GAPDH và aggrecan được xác định bằng Prism 7900HT (ABI) sử dụng PowerSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc.). 25 ng cDNA, 3 μ l Primer 10 μ M s, và 2X PowerSYBR Green PCR Master Mix được trộn lẫn để tạo ra toàn bộ thể tích là 10 μ l. PCR thời gian thực được thực hiện dưới các điều kiện phản ứng sau đây: gây ra hoạt tính enzym ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 2 phút và ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 10 phút, và sau đó thực hiện 45 chu kỳ phản ứng với mỗi chu kỳ gồm có phản ứng ở nhiệt độ 95°C trong 15 giây và phản ứng ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 1 phút, và sau đó đo giá trị ngưỡng (CT) của mỗi chu kỳ. GAPDH được lựa chọn là gen tham khảo, và độ chênh lệch giá trị CT (Δ CT) giữa gen tham khảo và gen aggrecan được tính toán. Ngoài ra, độ chênh lệch giá trị CT ($\Delta\Delta$ CT)' giữa đĩa đệm bình thường và đĩa đệm dùng peptit theo ví dụ 1 (hoặc đĩa đệm dùng DMSO) được tính toán. Sau đó, $2^{-(\Delta\Delta$ CT)} được tính toán và được biểu hiện là tỷ lệ phần trăm cân xương với giá trị của đĩa đệm bình thường.

Các kết quả của PCR thời gian thực được cho trên Fig.2. Fig.2 là đồ thị thể hiện các mức độ biểu hiện gen aggrecan theo thời gian của nhóm có đĩa đệm dùng DMSO và nhóm có đĩa đệm dùng peptit theo ví dụ 1 trong mô hình thoái hóa đĩa đệm, so sánh với nhóm có đĩa đệm bình thường làm đối chứng. Như được thể hiện trong đồ thị ở trên, có thể thấy rằng ở tuần 4, nhóm mô đĩa đệm dùng peptit theo ví dụ 1 ức chế sự tăng biểu hiện gen aggrecan so với nhóm mô đĩa đệm dùng DMSO. Ở các tuần 6 và 10, nhóm mô đĩa đệm dùng peptit theo ví dụ 1 ức chế mức biểu hiện aggrecan tương tự nhóm mô đĩa đệm dùng DMSO. Vì peptit theo ví dụ 1 chỉ được dùng ở các tuần 0 và 2 và sau đó các động vật không dùng thêm nữa, nên có thể phát biểu rằng sự tăng biểu hiện gen aggrecan ở tuần 4 thu được nhờ hiệu lực của peptit theo ví dụ 1, mà tuy nhiên, không duy trì sự biểu hiện gen aggrecan ở các tuần 6 và 10. Từ các kết quả này, có thể nhận thấy rằng peptit theo sáng chế thể hiện hiệu quả tái tạo đĩa đệm bằng cách tăng sự biểu hiện gen của aggrecan, hợp phần gian bào biểu hiện cần thiết cho sự tái tạo đĩa đệm trong mô đĩa đệm, và thời hạn biểu hiện gen aggrecan nâng cao tác dụng của peptit không quá dài để nhờ đó có thể loại trừ các tác dụng phụ có thể do sự tăng quá mức biểu hiện gen aggrecan.

Ví dụ 4: Xác nhận sự ức chế phát tín hiệu TGF-beta 1

Sự ức chế phát tín hiệu TGF-beta 1 nhờ peptit theo ví dụ 1 được xác nhận theo phương pháp thử nghiệm sau đây:

Việc xử lý các tế bào HepG2 với TGF-beta1 được biết là gây ra cơ chế gây chết tế bào theo chương trình, trong suốt thời gian đó Smad2 được phosphorylat hóa đầu tiên (Park TJ. et al., *Mol Carcinog.* 47:784-796, 2008; và Gressner AM. et al., *J Hepatol.* 26:1079-1092, 1997). Sử dụng các tính chất này, thử nghiệm được thực hiện như sau: 1x10⁶ tế bào HepG2 (ATCC; Bộ sưu tập chủng giống gốc Hoa Kỳ -American Type Culture Collection) được kết hạt trong đĩa 60 mm, để ổn định qua đêm và sau đó được làm tiêu dịch các dưỡng chất bằng môi trường không có huyết thanh (SFM) trong thời gian 24 giờ. Trước khi xử lý các tế bào với peptit theo ví dụ 1, 5 ng/mL TGF-beta 1 (PromoKine, Germany) và peptit nêu trên (1, 5, và 25 μ M) được cho trải qua bước ủ sơ bộ ở 37°C trong 1 giờ. Ngoài ra, DMSO (2 μ l/mL) cũng được ủ sơ bộ với TGF-beta 1 (5 ng/mL) ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Sau đó các tế bào được xử lý với các dung dịch ủ sơ bộ trong 30 phút, sau đó chiết tách các protein. Ngoài ra, các tế bào được xử lý trước chỉ với 10 μ M SB431542 (TOCRIS, USA), chất ức chế thụ thể TGF-beta, sau đó ủ trong 1 giờ, và sau đó được xử lý với TGF-beta 1 (5 ng/mL) trong thời gian 30 phút. Sau đó, các tế bào được đồng nhất trên nước đá trong dung dịch đệm phân tích thử nghiệm kết tủa miễn dịch phóng xạ (Radioimmunoprecipitation assay - RIPA) (Millipore) { Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, axit deoxycholic 0,25%, NP-40 1%, axit etylen diamin tetraaxetic (EDTA) 1mM, phenylmetylsulfonyl florid (PMSF) 1 mM, NaF 40mM, Na₃VO₄ 1mM, dithiothreitol (DTT) 1mM}. Chất đồng nhất được tán siêu âm năm lần sử dụng máy tán siêu âm BRANSON SONIFIER 450 với mức điều khiển tín hiệu ra 2,56, độ rộng xung (Duty cycle) (%) 20, và định thời 6. Dịch thủy phân tế bào được ly tâm ở nhiệt độ 4°C và tốc độ 12.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút, và phần dịch nổi được sử dụng để phân tích thẩm tách Western. Nồng độ protein được xét nghiệm sử dụng phương pháp Bradford. 30 μ g protein được thêm vào mẫu dung dịch đệm SDS chứa 2-mercaptoetanol. Sau khi để yên ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, chiết phân đoạn được thực hiện bởi phép điện di 10% SDS-PAGE (Điện di trên polyacrylamit gel với sự có mặt của SDS (sodium dodecyl sulfate)), sau đó thẩm tách Western. Đối với phân tích thẩm tách Western, protein tách được được chuyển lên màng nitrocellulose (Bio-Rad Lab), và được khóa

với sữa tách bơ 5% trong PBS-T, sau đó phản ứng với dung dịch pha loãng 1:3000 của kháng thể chính trong sữa tách bơ 5% trong PBS-T, ở nhiệt độ 4°C để qua đêm. Tiếp theo, màng được rửa ba lần với PBS-T trong thời gian 5 phút, được xử lý với dung dịch pha loãng 1:5000 của kháng thể phụ kháng lại thỏ được tiếp hợp với peroxidaza cải ngựa (horseradish peroxidase - HRP) (Bio- Rad Lab, 1706515) trong sữa tách bơ 5% trong PBS-T ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 giờ, và được phát triển màu sử dụng ECL (Amersham Pharmacia). Do Smad 2 được phosphorylat hóa đầu tiên đồng thời với việc liên kết TGF-beta 1 với thụ thể TGF-beta, kháng thể phospho-Smad2 (ser465/467) (Cell Signaling, 3101, 8) có khả năng phát hiện Smad2 đã phosphorylat hóa được sử dụng Smad2 làm kháng thể chính.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.3. Fig.3 minh họa các kết quả thẩm tách Western (dải 1: các tế bào HepG2 chưa được xử lý, dải 2: các tế bào được xử lý với TGF-beta1, dải 3: các tế bào được xử lý với TGF-beta1/SB431542, các dải 4, 5 và 6: các tế bào lần lượt được xử lý với peptit/TGF-beta 1 1, 5, và 25 μ M, và dải T: các tế bào được xử lý với TGF-beta1/DMSO). Trên Fig. 3, dấu '+' thể hiện các tế bào được xử lý với chất xử lý, và '-' thể hiện không được xử lý với chất xử lý. Phần dưới của Fig.3 minh họa các kết quả nhuộm màu Xanh Coomassie của màng được sử dụng trong thẩm tách Western, thể hiện lượng protein giống nhau trong tất cả các dải.

Như được thể hiện trên Fig.3, có thể quan sát thấy dải 1 thể hiện sự phosphorylat hóa protein tách từ các tế bào HepG2 chưa được xử lý là rất ít, trong khi đó dải 2 thể hiện sự phosphorylat hóa protein bằng TGF-beta1 đáng kể. Ngoài ra, có thể quan sát thấy dải 3 thể hiện ức chế sự phosphorylat hóa hoàn toàn bởi SB431542. Nó cũng được xác nhận rằng độ phosphorylat hóa của protein được giảm xuống theo cách phụ thuộc liều dùng, khi peptit theo ví dụ 1 được xử lý ở nồng độ lần lượt là 1 μ M, 5 μ M, và 25 μ M. Dải 7 được xử lý với DMSO thể hiện sơ lược tương tự như xử lý với TGF-beta 1.

Từ các kết quả này, có thể thấy rằng do peptit theo sáng chế thể hiện sự ức chế phụ thuộc liều dùng của sự phát tín hiệu TGF-beta 1, các bệnh có thể chữa được nhờ sự ức chế phát tín hiệu TGF-beta 1 nêu trên, tức là, xơ hóa các cơ quan trong cơ thể, bệnh ung thư, và/hoặc bệnh xơ cứng tiểu cầu thận có thể được điều trị (Prud'homme GJ, Lab Invest 87:1077-1091, 2007). Ngoài ra, có thể thấy rằng peptit theo ví dụ 1 không hoàn toàn ức chế sự phát tín hiệu TGF-beta 1 không giống SB431542. Do sự

phát tín hiệu TGF-beta 1 là cơ chế điều chỉnh quan trọng trong cơ thể người, nên sự ức chế hoàn toàn sự phát tín hiệu TGF-beta 1, như bởi SB431542, có thể dẫn đến các tác dụng phụ. Tuy nhiên, peptit theo sáng chế làm giảm sự phát tín hiệu GF-beta 1 theo cách phụ thuộc liều dùng, nên nồng độ peptit có thể được điều chỉnh thuận tiện để nhờ đó có thể giảm các tác dụng phụ khi sử dụng để điều trị các bệnh liên quan.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Peptit theo sáng chế hoặc hoặc muối được dụng của peptit đó có tác dụng điều trị và/hoặc phòng ngừa các bệnh thoái hóa đĩa đệm, xơ hóa các cơ quan trong cơ thể, bệnh ung thư, và/hoặc xơ cứng tiểu cầu thận, và có tác dụng ức chế sự phát tín hiệu TGF-beta 1, và do đó có khả năng áp dụng công nghiệp.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Peptit theo sáng chế hoặc thể biến dị hoặc muối được dụng của peptit đó có hiệu quả trong điều trị và/hoặc phòng ngừa các bệnh thoái hóa đĩa đệm, bệnh xơ hóa các cơ quan trong cơ thể, ung thư, và/hoặc xơ cứng tiểu cầu thận, và có hiệu quả ức chế sự phát tín hiệu TGF-beta 1.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Peptit chỉ chứa trình tự axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc muối được dụng của peptit này.
2. Chế phẩm, trong đó chế phẩm này chứa peptit hoặc muối được dụng của peptit theo điểm 1 dùng để điều trị và phòng ngừa bệnh thoái hóa đĩa đệm hoặc điều trị bệnh xơ hóa các cơ quan trong cơ thể, bệnh ung thư, hoặc bệnh xơ cứng tiểu cầu thận.

FIG.1

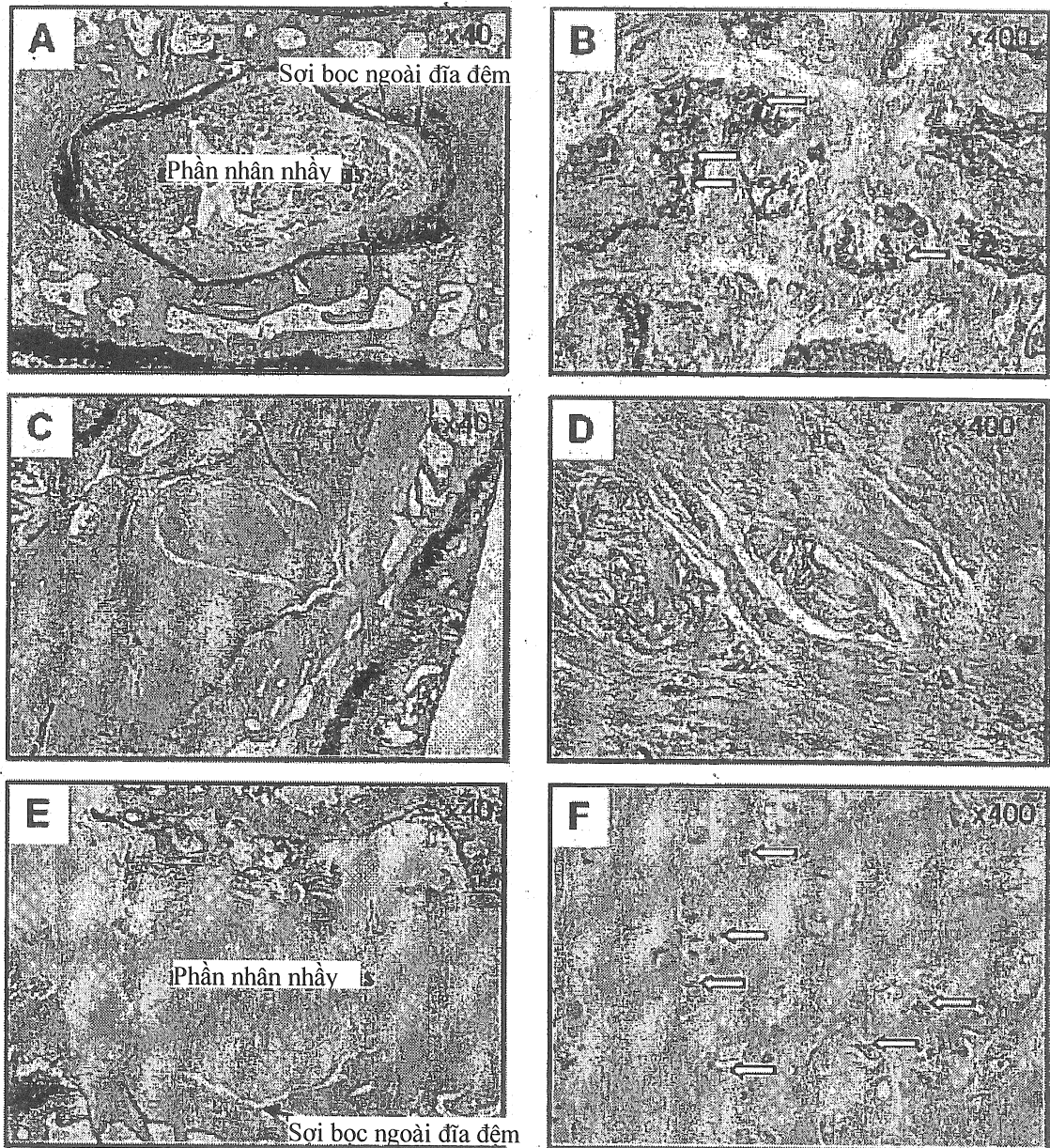


FIG.2

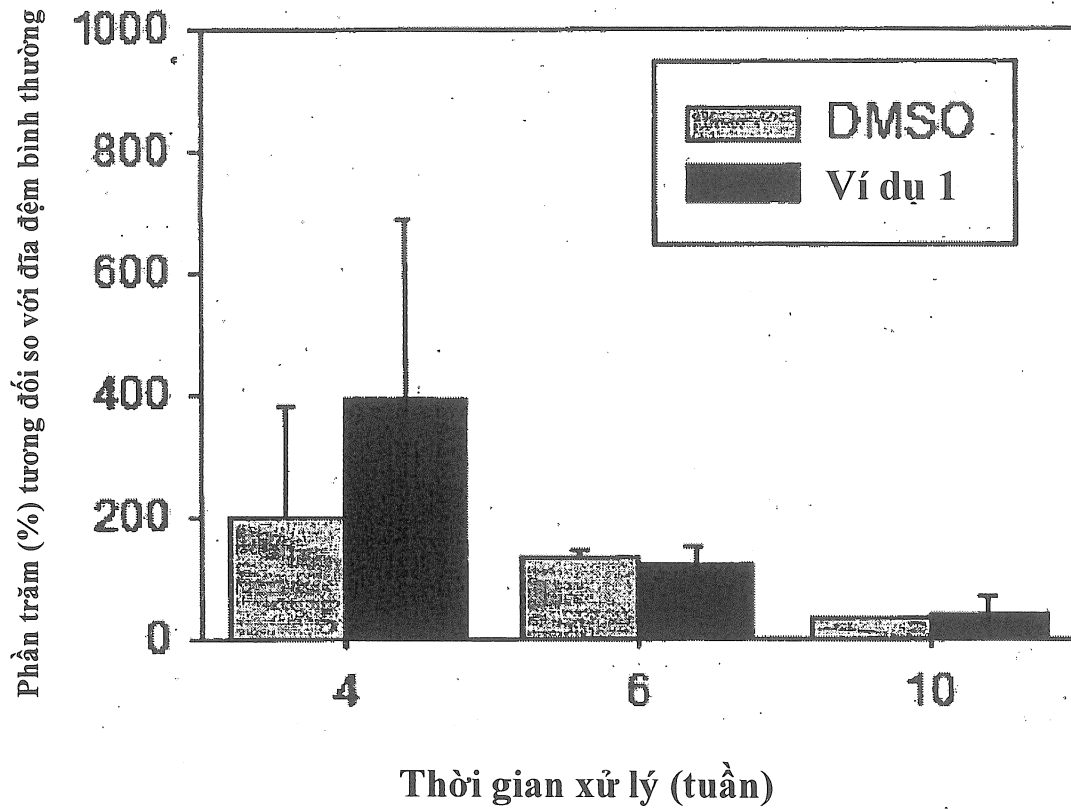
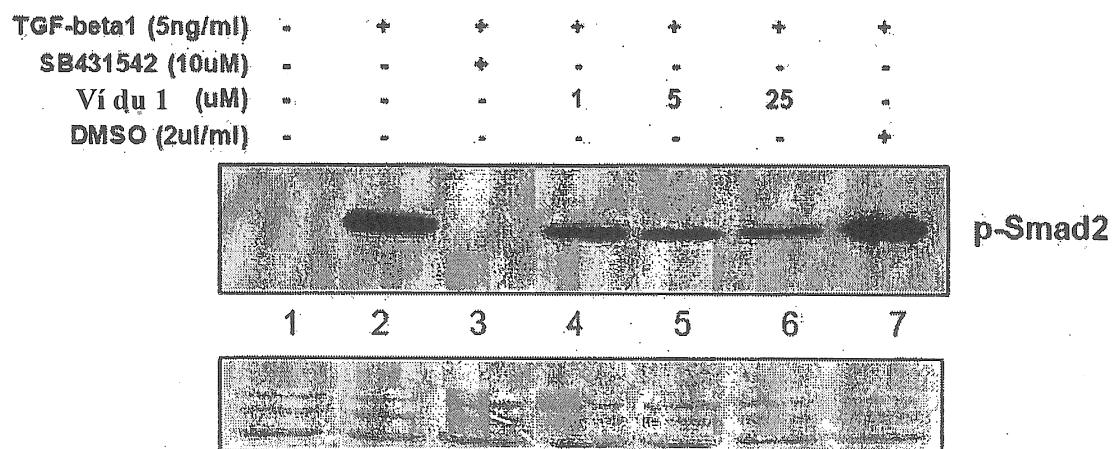


FIG.3



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Ensoltek Co., Ltd

<120> Peptit và chế phẩm chứa peptit này

<130> P09062-ENS

<150> KR10-2009-0075142

<151> 2009-08-14

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<201> 1

<221> 7

<212> PRT

<13> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit

<400> 1

Leu Gln Val Val Tyr Leu His

1

5