



(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)



1-0027006

(51)⁷ C12N 1/14; C07K 1/30; C07K 14/39

(13) B

(21) 1-2013-03210

(22) 16/09/2011

(86) PCT/US2011/052022 16/09/2011

(87) WO 2012/128786 27/09/2012

(30) 13/051,646 18/03/2011 US

(45) 25/01/2021 394

(43) 25/03/2014 312A

(73) ALLTECH, INC. (US)

3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, Kentucky 40356, United States of America

(72) KWIATKOWSKI, Stefan (US); POWER, Ronan (IE); MATNEY, Clayton (US);
GHOROGHCHIAN, Paiman, P. (US); OSTERTAG, Eric, M. (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CHẾ PHẨM CHỨA SELENOGLYCOPROTEIN HÒA TAN VÀ PHƯƠNG PHÁP
ĐIỀU CHẾ SELENOGLYCOPROTEIN HÒA TAN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm selen hòa tan và phương pháp sản xuất, tách và tinh chế chế phẩm này. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế selenoglycoprotein tan được trong nước (ví dụ, bằng cách chiết selenoglycoprotein từ nấm men được làm giàu selen), phương pháp bổ trợ chế phẩm thiếu hụt selen bằng cách trộn selenoglycoprotein tan được trong nước với chế phẩm thiếu hụt selen này, chế phẩm chứa selenoglycoprotein tan được trong nước và phương pháp sử dụng chế phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm selen hòa tan và phương pháp sản xuất, tách và tinh chế chế phẩm này. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế selenoglycoprotein tan được trong nước (ví dụ, bằng cách chiết selenoglycoprotein từ nấm men được làm giàu selen), phương pháp bổ trợ chế phẩm thiếu hụt selen bằng cách trộn selenoglycoprotein tan được trong nước với chế phẩm thiếu hụt selen này, chế phẩm chứa selenoglycoprotein tan được trong nước và các phương pháp sử dụng chế phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Selen là yếu tố lượng vết quan trọng để thực hiện đúng chức năng sinh lý ở người. Selen được tiêu thụ thông qua khẩu phần ăn và có hàm lượng selen khác nhau.

Selen được biết là đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì sự trao đổi chất của cơ thể, sự sinh trưởng, sức khỏe sinh sản, và tính miễn dịch. Selen được kết hợp vào các phân tử hữu cơ khác nhau bao gồm, ví dụ, các axit amin như 1-selenomethionin, selenoxystein, và selenoxystin. Như vậy, selen có thể là bộ phận cấu thành của protein, nhiều trong số các protein này có tầm quan trọng về mặt cấu trúc đối với cơ thể. Ngoài ra, selen là thành phần quan trọng trong nhiều enzym mà ảnh hưởng đến sự trao đổi chất, sinh sản, phòng ngừa ung thư, và hàng rào miễn dịch ở người (xem, Rayman, M, Lancet 356:233-241 (2000)).

Nhiều nghiên cứu đã cố gắng phát hiện các lợi ích sức khỏe tiềm năng tạo ra từ sự tiêu hóa mức thấp của selen. Ví dụ, nồng độ thấp của dạng selen vô cơ, đã cho thấy một số lợi ích sức khỏe tiềm năng (xem, Furnsinn et al., Int. J of Obesity and Related Metab. Dis., 19, 458- 463 (1995)). Tuy nhiên, ở mức liều lượng cao, tác dụng có lợi bị làm đảo ngược và biểu lộ đặc tính độc nguy hiểm.

Nghiên cứu trong hai thập kỷ trước đây đã cho thấy rằng selen có hiệu quả làm giảm tỷ lệ mắc ung thư khi được cung cấp cho động vật ở các liều lượng chỉ lớn hơn 5 đến 10 lần so với yêu cầu dinh dưỡng (xem El-Bayoumy, The role of selenium in cancer

prevention, Philadelphia, Lippincott, 1-15, 1991). Các nghiên cứu hóa học ngăn ngừa với selen trong các hệ thống mô hình thử nghiệm ở động vật đã cho thấy rằng nguyên tố này là hiệu quả đối với hầu hết, nếu không nói là tất cả các hệ thống cơ quan và có tính bảo vệ chống lại các tác động sinh ung thư (xem, El-Bayoumy, The role of selenium in cancer prevention, Philadelphia, Lippincott, 1-15, 1991). Cả các nghiên cứu dịch tễ học và các thử nghiệm bổ sung cũng đã chứng tỏ công hiệu của nó trong việc làm giảm tỷ lệ mắc ung thư gan, ung thư ruột kết, ung thư tuyến tiền liệt và ung thư phổi (xem, Yu et al. Biol Trace Elem Res, 56: 117-124 (1997); Clark et al., J Am Med Assoc, 276: 1957-1963 (1996); Yoshizawa et al., J Natl Cancer Inst, 90: 1219-1224, (1998); Brooks, et al., J Urol, 166: 2034-2038, (2001)). Các nghiên cứu khác đã chứng tỏ không có tác dụng có lợi của selen đối với việc làm giảm ung thư (xem, Garland et al., J. Am. Coll Nutr., 12: 400-11 (1993); Ghadirian et al., Cancer Detect Prev, 24: 305-13 (2000)).

Nhiều dạng selen đã được nghiên cứu. Các dạng này bao gồm selen vô cơ như natri selenit, và các nguồn hữu cơ, bao gồm selen nấm men. Có sự khác biệt đáng kể giữa tính độc của selen vô cơ và selen hữu cơ, hợp chất vô cơ thường được hấp thụ và được sử dụng ít hiệu quả hơn và cũng độc hơn so với các nguồn selen hữu cơ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chế phẩm selen hòa tan và phương pháp sản xuất, tách và tinh chế chế phẩm này. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế selenoglycoprotein tan được trong nước (ví dụ, bằng cách chiết selenoglycoprotein từ nấm men được làm giàu selen), phương pháp bổ trợ chế phẩm thiếu hụt selen bằng cách trộn selenoglycoprotein tan được trong nước với chế phẩm thiếu hụt selen này, chế phẩm chứa selenoglycoprotein tan được trong nước và các phương pháp sử dụng chế phẩm này.

Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế selenoglycoprotein hòa tan bao gồm các bước: cung cấp nấm men được làm giàu selen, cho nấm men được làm giàu selen tiếp xúc với điều kiện axit sau đó là ly tâm để tạo ra i) viên tròn chứa nguyên liệu không tan được trong axit; và ii) pha lỏng chứa chất chiết của nấm men được làm giàu selen hòa tan trong điều kiện axit; kết tủa selenoglycoprotein từ pha lỏng chứa chất chiết của nấm men được làm giàu selen hòa tan trong điều kiện axit bằng cách tăng độ pH của pha lỏng, và (d) tách

selenoglycoprotein đã kết tủa khỏi pha lỏng. Theo một số phương án, việc cho nấm men được làm giàu selen tiếp xúc với điều kiện axit xảy ra ở nhiệt độ lớn hơn nhiệt độ trong phòng (ví dụ, lớn hơn khoảng 20-25°C). Sáng chế không bị giới hạn bởi nhiệt độ lớn hơn nhiệt độ trong phòng trong đó nấm men được làm giàu selen được tiếp xúc với điều kiện axit. Trên thực tế, nhiều nhiệt độ có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, khoảng 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 90, 95, 97, 99°C, hoặc nóng hơn). Tương tự, sáng chế không bị giới hạn bởi điều kiện axit trong đó nấm men được làm giàu selen được tiếp xúc. Theo một số phương án, nấm men được làm giàu selen được tiếp xúc với điều kiện trong đó độ pH là khoảng 6,5, khoảng 6, khoảng 5,5, khoảng 5, khoảng 4,5, khoảng 4, khoảng 3,5, khoảng 3, khoảng 2,5, khoảng 2, khoảng 1,5, khoảng 1, hoặc thấp hơn. Theo một phương án được ưu tiên, việc cho nấm men được làm giàu selen tiếp xúc với điều kiện axit bao gồm việc cho nấm men được làm giàu selen tiếp xúc với độ pH bằng 1,5. Theo một số phương án, việc cho nấm men được làm giàu selen tiếp xúc với điều kiện axit xảy ra trong một khoảng thời gian nhất định. Sáng chế không bị giới hạn bởi khoảng thời gian trong đó nấm men được làm giàu selen được tiếp xúc với điều kiện axit. Theo một số phương án, nấm men được làm giàu selen được tiếp xúc với điều kiện axit trong khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 giờ hoặc lớn hơn 24 giờ. Theo một số phương án, nấm men được làm giàu selen được tiếp xúc với điều kiện axit trong khoảng từ 1 đến 24 giờ. Theo một số phương án, nấm men được làm giàu selen được tiếp xúc với điều kiện axit trong khoảng từ 5 đến 10 giờ. Theo một phương án được ưu tiên, nấm men được làm giàu selen được tiếp xúc với điều kiện axit trong khoảng 8 giờ. Theo một số phương án, điều kiện axit được tạo ra và/hoặc được duy trì bằng cách sử dụng dung dịch đệm axit và/hoặc bổ sung axit. Sáng chế không bị giới hạn bởi loại axit được sử dụng. Trên thực tế, axit bất kỳ có thể được sử dụng. Theo một số phương án, axit là axit clohydric, mặc dù axit bất kỳ có thể được sử dụng. Theo một số phương án, selenoglycoprotein được kết tủa từ pha lỏng chứa chất chiết của nấm men được làm giàu selen hòa tan trong điều kiện axit bằng cách tăng độ pH của pha lỏng. Theo một số phương án, selenoglycoprotein đã kết tủa được tách riêng khỏi pha lỏng bằng cách ly tâm để tạo ra viên tròn của selenoglycoprotein đã kết tủa sau đó loại bỏ pha lỏng khỏi selenoglycoprotein đã kết tủa. Sáng chế không bị giới hạn bởi lượng hoặc mức độ mà độ pH của chất chiết được làm tăng để kết tủa selenoglycoprotein từ pha lỏng. Theo một số phương án, độ pH của pha lỏng được tăng

lên đến 1,85. Theo một số phương án, độ pH của pha lỏng được tăng lên đến 3,0. Theo một số phương án, độ pH của pha lỏng được tăng lên đến 4,0. Theo một số phương án, độ pH của pha lỏng được tăng lên đến 6,0. Theo một số phương án, selenoglycoprotein được kết tủa và được tách riêng khỏi pha lỏng ở các điều kiện pH khác nhau để tạo thành nhiều phân đoạn phụ thuộc pH của selenoglycoprotein hòa tan. Ví dụ, theo một số phương án, pha lỏng đơn bao gồm chất chiết của nấm men được làm giàu selen hòa tan trong điều kiện axit được sử dụng để tạo ra phân đoạn thứ nhất của selenoglycoprotein hòa tan kết tủa ở độ pH thứ nhất (ví dụ, độ pH bằng 1,85), phân đoạn thứ hai của selenoglycoprotein hòa tan kết tủa ở độ pH thứ hai (ví dụ, độ pH bằng 3,0), phân đoạn thứ ba của selenoglycoprotein hòa tan kết tủa ở độ pH thứ ba (ví dụ, độ pH bằng 4,0), và phân đoạn thứ tư của selenoglycoprotein hòa tan kết tủa ở độ pH thứ tư (ví dụ, độ pH bằng 6,0). Theo một số phương án, việc kết tủa selenoglycoprotein từ pha lỏng bằng cách tăng độ pH của pha lỏng bao gồm nhiều phản ứng kết tủa liên tiếp phụ thuộc pH của pha lỏng. Theo một số phương án, chế phẩm chứa selenoglycoprotein hòa tan chỉ chứa một phân đoạn phụ thuộc pH của selenoglycoprotein (ví dụ, selenoglycoprotein hòa tan từ pha lỏng chứa chất chiết của nấm men được làm giàu selen hòa tan trong điều kiện axit kết tủa ở độ pH 4,0). Theo một số phương án, chế phẩm chứa selenoglycoprotein hòa tan chứa hai hoặc nhiều phân đoạn phụ thuộc pH của selenoglycoprotein (ví dụ, selenoglycoprotein hòa tan từ pha lỏng chứa chất chiết của nấm men được làm giàu selen hòa tan trong điều kiện axit kết tủa ở hai hoặc nhiều giá trị pH khác nhau).

Theo một số phương án, nấm men được làm giàu selen được sấy khô, nấm men được làm giàu selen không còn sống chứa 2% selen vô cơ hoặc thấp hơn.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa selenoglycoprotein hòa tan được điều chế theo sáng chế. Ví dụ, theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm thiếu hụt selen chứa selenoglycoprotein hòa tan theo sáng chế. Theo một số phương án, selenoglycoprotein hòa tan theo sáng chế được bổ sung vào và/hoặc được trộn với chế phẩm thiếu hụt selen. Sáng chế không bị giới hạn bởi kiểu loại của chế phẩm hoặc nguyên liệu thiếu hụt selen mà selenoglycoprotein hòa tan theo sáng chế được bổ sung vào hoặc được trộn với, chế phẩm hoặc nguyên liệu như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất bổ sung cho thức ăn, thuốc, dược phẩm, thực phẩm, thức ăn cho động vật, và các loại nguyên liệu khác. Theo một số phương án, việc bổ sung hoặc trộn (ví dụ, phối trộn) selenoglycoprotein bao gồm phối trộn selenoglycoprotein và một hoặc

nhiều loại khác của selen vào chế phẩm. Theo một số phương án, selenoglycoprotein hòa tan theo sáng chế được bổ sung vào và/hoặc được trộn với chế phẩm chứa selen (ví dụ, để tăng thêm và/hoặc bổ sung tổng lượng của selen).

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa selenoglycoprotein hòa tan và chất mang. Theo một số phương án, selenoglycoprotein là phân đoạn phụ thuộc pH đặc trưng của selenoglycoprotein. Sáng chế không bị giới hạn bởi loại chất mang được sử dụng. Trên thực tế, nhiều chất mang khác nhau có thể được sử dụng, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dendrime, polymerosom, hạt nano, polyme giải phóng chậm, viên nang nano, và/hoặc polyme được khắc phân tử. Theo một phương án được ưu tiên, chất mang là polyme giải phóng chậm. Theo phương án được ưu tiên khác, chất mang là polyme được khắc phân tử. Theo phương án được ưu tiên khác nữa, chất mang là polymersom được sử dụng để bao nang selenoglycoprotein. Sáng chế không bị giới hạn bởi loại polymersom được sử dụng. Trên thực tế, polymersom bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng. Theo một số phương án, polymersom bao gồm copolyme khối poly(etylen oxit) (PEO). Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở copolyme khối này. Copolyme khối bất kỳ đã biết có thể được sử dụng, bao gồm, ví dụ, poly(etyetylen) (PEE), poly(butadien) (PB hoặc PBD), poly(styren) (PS), và poly(isopren) (PI). Theo một số phương án, polyme bao gồm copolyme hai khối poly(ϵ -caprolacton) (PCL). Theo một số phương án, polymersom bao gồm copolyme hai khối gốc poly(etylen oxit)-khối-poly(ϵ -caprolacton) (PEO-b-PCL). Theo một số phương án, polymersom bao gồm copolyme khối mà là copolyme khối ba khối, bốn khối, năm khối, hoặc ít nhất sáu khối. Theo một số phương án, polymersom thu được từ sự liên hợp của poly(axit lactic), poly(glycolit), poly(axit lactic-coglycolic) và/hoặc hoặc poly(3-hydroxybutyrat) với PEO. Sáng chế không bị giới hạn bởi kích thước của selenoglycoprotein được bao nang bằng polymersom. Nhiều kích thước được sử dụng trong chế phẩm và phương pháp theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, selenoglycoprotein được bao nang bằng polymersom có đường kính khoảng 50-300 nm mặc dù selenoglycoprotein được bao nang bằng polymersom lớn hơn (ví dụ, khoảng 350 nm, 400 nm, 500 nm hoặc lớn hơn) và nhỏ hơn (ví dụ, khoảng 40 nm, 30 nm, 20 nm, hoặc nhỏ hơn) có thể được sử dụng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện quy trình điều chế theo dây của selenoglycoprotein hòa tan (SGP) từ SEL-PLEX bằng cách chiết axit và các quy trình kết tủa tiếp theo theo một phương

án của sáng chế.

Fig.2 thể hiện quy trình kết tủa phụ thuộc pH của selenoglycoprotein theo một phương án của sáng chế.

Fig.3 thể hiện bản đồ nhiệt mô tả ảnh hưởng của các xử lý bổ sung selen khác nhau nêu trong các Bảng 3 và 4 của Ví dụ 3 đến mức biểu hiện gen ở cơ xương ức ở gà so với đối chứng cơ sở.

Fig.4 thể hiện biểu đồ Venn biểu thị các ảnh hưởng khác nhau của phân đoạn SGP pH 4,0 và SEL-PLEX đến sự biểu hiện gen được mô tả trong cơ ức.

Fig.5 thể hiện gen nêu làm ví dụ, được xác định là được điều hòa thông thường bởi natri selenit (SS), SEL-PLEX (SP) và phân đoạn selenoglycoprotein (SGP) pH 4,0.

Fig.6 thể hiện gen nêu làm ví dụ, được xác định là được điều hòa thông thường bởi SEL-PLEX (SP) và phân đoạn selenoglycoprotein (SGP) pH 4,0, nhưng không được điều hòa bởi natri selenit (SS).

Fig.7 thể hiện gen nêu làm ví dụ, được xác định là được điều hòa duy nhất bởi phân đoạn selenoglycoprotein (SGP) pH 4,0, và không được điều hòa bởi natri selenit (SS) hoặc SEL-PLEX (SP).

Fig.8 thể hiện gen nêu làm ví dụ, được xác định là được điều hòa duy nhất bởi phân đoạn selenoglycoprotein (SGP) pH 4,0, và không được điều hòa bởi natri selenit (SS) hoặc SEL-PLEX (SP).

Fig.9 thể hiện gen nêu làm ví dụ, được xác định là được điều hòa duy nhất bởi phân đoạn selenoglycoprotein (SGP) pH 4,0, và không được điều hòa bởi natri selenit (SS) hoặc SEL-PLEX (SP).

Fig.10 thể hiện gen nêu làm ví dụ, được xác định là được điều hòa duy nhất bởi phân đoạn selenoglycoprotein (SGP) pH 4,0, và không được điều hòa bởi natri selenit (SS) hoặc SEL-PLEX (SP).

Fig.11 thể hiện bản đồ nhiệt mô tả ảnh hưởng của các xử lý bổ sung selen khác nhau nêu trong các Bảng 3 và 4 của Ví dụ 3 đến mức biểu hiện gen ở mô gan so với đối chứng cơ sở.

Fig.12 mô tả sự giải phóng của SGP từ viên nang nano ở độ pH 5,1 và pH 7,4

trong khoảng thời gian hai tuần.

Fig.13 thể hiện các ảnh hiển vi điện tử hiệu ứng tunen lạnh (cryo-TEM) của selenoglycoprotein được bao nang bằng polymersom ở độ pH 7,4.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Để hiểu sáng chế một cách dễ dàng hơn, nhiều thuật ngữ và cụm từ được định nghĩa ở phần dưới đây:

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "peptit," "polypeptit" và "protein" tất cả đều chỉ trình tự bậc một của các axit amin mà được nối bởi "liên kết peptit" cộng hóa trị. Nhìn chung, peptit gồm một vài axit amin, thường từ 2-50 axit amin, và ngắn hơn protein. Thuật ngữ "polypeptit" bao gồm peptit và protein.

Thuật ngữ "(các) glycoprotein" hoặc "(các) glycopeptit" chỉ protein hoặc peptit chứa một hoặc nhiều gốc hydrat cacbon được gắn kết cộng hóa trị với mạch polypeptit. Thuật ngữ "(các) selenoprotein" hoặc "(các) selenopeptit" chỉ protein hoặc peptit chứa một hoặc nhiều nguyên tử selen. Thông thường, nguyên tử selen được kết hợp vào protein trong các axit amin chứa selen bao gồm selenoxystein và selenomethionin.

Thuật ngữ "(các) selenoglycoprotein," "(các) selenoglycopeptit" hoặc "(các) SGP" chỉ glycoprotein hoặc glycopeptit mà kết hợp một hoặc nhiều nguyên tử selen. Thông thường, "selenoglycoprotein" chứa một hoặc nhiều axit amin chứa selen. "Selenoglycoprotein" có thể chứa một số lượng hydrat cacbon ở các dạng khác nhau.

Thuật ngữ "mẫu" và "mẫu vật" được sử dụng theo nghĩa rộng nhất của chúng và bao gồm mẫu hoặc mẫu vật thu được từ nguồn bất kỳ. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "mẫu" được sử dụng để chỉ mẫu sinh học thu được từ động vật (bao gồm người), và bao gồm chất lưu, chất rắn và mô. Theo một số phương án theo sáng chế, mẫu sinh học bao gồm dịch não tủy (CSF), dịch huyết thanh, nước tiểu và nước bọt, máu, và các sản phẩm máu như huyết tương, huyết thanh và các chất tương tự. Tuy nhiên, các ví dụ này không được hiểu là làm giới hạn loại mẫu được sử dụng theo sáng chế.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "nấm men" và "tế bào nấm men" chỉ vi sinh vật có nhân điển hình được phân loại trong giới Nấm, có thành tế bào, màng tế bào và thành phần nội bào. Nấm men không tạo thành nhóm phân loại hoặc phát sinh loài đặc trưng.

Hiện nay, khoảng 1500 loài đã được biết; ước tính rằng chỉ có 1% trong số tất cả các loài nấm men đã được mô tả. Thuật ngữ "*nấm men*" thường được xem là đồng nghĩa với *S. cerevisiae*, nhưng tính đa dạng phát sinh loài của nấm men được thể hiện bởi sự phân bố của chúng trong cả hai khu Ascomycota và Basidiomycota. Thuật ngữ "nấm men" bao gồm nấm men để làm bia, nấm men chưng cất rượu và nấm men bánh mì. Nấm men nảy chồi ("nấm men thực") được phân loại trong bộ Saccharomycetales. Hầu hết các loài nấm men đều sinh sản vô tính bằng cách nảy chồi, mặc dù một số nấm men sinh sản bởi sự sinh sản nhân đôi nhị nguyên. Nấm men là đơn bào, mặc dù một số loài trở nên đa bào thông qua sự tạo thành chuỗi tế bào nảy chồi được liên kết được gọi là *pseudohyphae*, hoặc *false hyphae*. Kích thước nấm men có thể thay đổi nhiều, phụ thuộc vào loài, thường có đường kính 3-4 μm , mặc dù một số nấm men có thể đạt đến đường kính trên 40 μm .

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "nấm men đã được làm giàu selen" và "nấm men được selen hóa" chỉ nấm men bất kỳ (ví dụ, *Saccharomyces cerevisiae*) mà được nuôi trong môi trường chứa muối selen vô cơ. Sáng chế không bị giới hạn bởi muối selen được sử dụng. Trên thực tế, nhiều muối selen được dự tính có thể sử dụng được theo sáng chế, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, natri selenit, hoặc natri selenat. Selenomethionin tự do (ví dụ, không được kết hợp với tế bào hoặc nấm men) cũng có thể được sử dụng làm nguồn selen cho nấm men được làm giàu selen vì nấm men không kết hợp dạng selen này. Trong nuôi cấy, vì độ tương tự hóa học giữa selen và lưu huỳnh, nấm men kết hợp selen thay vì lưu huỳnh trong những hợp chất thường là hợp chất hữu cơ chứa lưu huỳnh trong tế bào. Hợp chất chứa selen trong các chế phẩm nấm men như vậy là selenomethionin mà được kết hợp vào polypeptit/protein. Lượng selen tế bào tổng cộng có mặt ở dạng selenomethionin trong các chế phẩm như vậy sẽ thay đổi, nhưng có thể nằm trong khoảng từ 10 đến 100%, từ 20 đến 60%, từ 50 đến 75% và từ 60 đến 75%. Phần còn lại của selen hữu cơ trong chế phẩm nấm men được selen hóa chủ yếu được tạo nên từ các hợp chất trung gian trong con đường sinh tổng hợp selenomethionin. Các hợp chất trung gian này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, selenoxystein, selenoxystathionin, selenohomoxystein và seleno-adenosylselenomethionin. Lượng muối selen vô cơ còn lại trong thành phẩm nhìn chung là khá thấp (ví dụ, <2%).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "SEL-PLEX" chỉ nấm men đã được làm giàu selen không còn sống, được sấy khô (ví dụ, *Saccharomyces cerevisiae* có số nộp lưu

CNCM I-3060, Collection Nationale De Cultures De Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, Paris, France) được nuôi cấy trong quy trình lên men theo mẻ có cung cấp dinh dưỡng mà cung cấp lượng gia tăng của ri đường mía và muối selen theo cách mà làm giảm thiểu tác động có hại của muối selen đến tốc độ sinh trưởng của nấm men và cho phép sự kết hợp tối ưu của selen vô cơ vào nguyên liệu hữu cơ tế bào. Selen vô cơ còn dư được loại bỏ (ví dụ, bằng cách sử dụng quy trình rửa nghiêm ngặt) và không vượt quá 2% của hàm lượng selen tổng cộng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "selen hữu cơ" chỉ hợp chất hữu cơ bất kỳ trong đó nguyên tử selen được liên kết trực tiếp với nguyên tử cacbon.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "selen vô cơ" thường chỉ muối selen bất kỳ (ví dụ, natri selenit, natri selenat) trong đó selen ở trạng thái oxy hóa -2, +4 và +6.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "vật chủ," "đối tượng" và "bệnh nhân" chỉ động vật bất kỳ, bao gồm nhưng không giới hạn ở, người và động vật (ví dụ, động vật linh trưởng, chó, mèo, bò, ngựa, cừu, gia cầm, cá, loài giáp xác, v.v.) mà được nghiên cứu, được phân tích, được thử nghiệm, được chẩn đoán hoặc được điều trị. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "vật chủ," "đối tượng" và "bệnh nhân" được sử dụng thay thế lẫn nhau, trừ khi có quy định khác.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "theo khối lượng" ("khối lượng/khối lượng") chỉ lượng chất đã cho trong chế phẩm trên cơ sở khối lượng. Ví dụ, thức ăn cho động vật chứa 0,02% theo khối lượng chất bổ sung cho thức ăn nghĩa là khối lượng của chất bổ sung cho thức ăn là 0,02% của tổng khối lượng của thức ăn cho động vật (ví dụ, 200 gam chế phẩm chất bổ sung cho thức ăn trong 999.800 gam thức ăn cho động vật).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "được tinh chế" hoặc "để tinh chế" chỉ việc loại bỏ các thành phần ra khỏi mẫu. Ví dụ, thành tế bào nấm men được tinh chế bằng cách loại bỏ thành phần thành tế bào không phải nấm men (ví dụ, màng huyết tương và/hoặc thành phần nội bào nấm men); chúng cũng được tinh chế bằng cách loại bỏ các chất nhiễm tạp hoặc các chất khác không phải là thành tế bào nấm men. Việc loại bỏ các thành phần thành tế bào không phải nấm men và/hoặc các chất nhiễm tạp thành tế bào không phải nấm men dẫn đến sự tăng tỷ lệ phần trăm của thành tế bào nấm men hoặc các thành phần của nó trong mẫu.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "lượng hữu hiệu" chỉ lượng của chế phẩm (ví dụ,

chứa selenoglycoprotein theo sáng chế đủ để tạo ra các kết quả có lợi hoặc mong muốn). Lượng hữu hiệu có thể được sử dụng trong một hoặc nhiều lần sử dụng, áp dụng hoặc liều lượng và không được dự định là bị giới hạn ở chế phẩm và đường dùng cụ thể.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “độ sinh khả dụng” chỉ phân đoạn của phân tử hoặc thành phần mà có thể dùng được cho sinh vật hoặc đạt đến sự tuần hoàn hệ thống. Khi phân tử hoặc thành phần được sử dụng qua đường tĩnh mạch, độ sinh khả dụng của nó là khá cao. Tuy nhiên, khi phân tử hoặc thành phần được sử dụng thông qua các con đường khác (như qua đường miệng), độ sinh khả dụng của nó giảm (do sự hấp thụ không hoàn toàn và sự trao đổi chất con đường thứ nhất). Trong môi trường dinh dưỡng, độ sinh khả dụng chỉ tốc độ hấp thụ và sử dụng chất dinh dưỡng. Các dạng khác nhau của cùng chất dinh dưỡng, ví dụ, có thể có độ sinh khả dụng khác nhau.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “thức ăn”, “thực phẩm”, “thức ăn cho động vật”, và “thức ăn cho súc vật” chỉ (các) nguyên liệu mà được tiêu thụ bởi động vật và đóng góp năng lượng và/hoặc các chất dinh dưỡng cho khẩu phần ăn của động vật. Ví dụ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Khẩu phần hỗn hợp hoàn chỉnh (TMR), thức ăn cho súc vật, viên thức ăn, thức ăn cô đặc, đồng sản phẩm thức ăn trộn sẵn, ngũ cốc, bã chưng cất rượu, rỉ đường, chất xơ, cỏ khô (cho súc vật ăn), cỏ, cỏ khô, hạt, lá, bột xay thô, thức ăn hòa tan, và chất bổ sung.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất bổ sung cho thực phẩm," "chất bổ sung cho thức ăn," "chế phẩm chất bổ sung cho thức ăn," và các thuật ngữ tương tự chỉ sản phẩm thức ăn được phối trộn ở dạng chất bổ sung dinh dưỡng hoặc chất bổ sung cho chế độ ăn được sử dụng ở dạng một phần của khẩu phần ăn của người hoặc động vật, ví dụ, ở dạng chất bổ sung cho thức ăn cho động vật.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "sử dụng" và "dùng" chỉ hoạt động đưa thuốc, tiền dược chất, hoặc chất khác, hoặc điều trị trị liệu (ví dụ, chế phẩm theo sáng chế) cho đối tượng (ví dụ, đối tượng hoặc các tế bào, mô, và cơ quan in vivo, in vitro, hoặc ex vivo). Ví dụ về đường dùng cho cơ thể người có thể là qua mắt (ở mắt), miệng (qua đường miệng), da (tại chỗ hoặc qua da), mũi (ở mũi), phổi (xông hít), niêm mạc miệng (má), tai, trực tràng, âm đạo, bằng cách tiêm (ví dụ, qua đường tĩnh mạch, dưới da, trong khối u, trong bụng, v.v.) và các đường dùng tương tự.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "việc đồng sử dụng" và "đồng sử dụng" chỉ việc

sử dụng ít nhất hai chất (ví dụ, chế phẩm chứa selenoglycoprotein theo sáng chế và một hoặc nhiều chất khác--ví dụ, chất kháng sinh, chất trị liệu (ví dụ, thuốc hoặc dược phẩm), hoặc, các hợp chất có hoạt tính sinh học khác) hoặc các trị liệu cho đối tượng. Theo một số phương án, việc đồng sử dụng hai hoặc nhiều chất hoặc trị liệu là đồng thời. Theo các phương án khác, chất/trị liệu thứ nhất được sử dụng trước chất/trị liệu thứ hai. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng chế phẩm và/hoặc đường dùng của các chất hoặc của các trị liệu khác nhau được sử dụng có thể thay đổi. Liều lượng thích hợp để đồng sử dụng có thể được xác định một cách dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, khi chất hoặc trị liệu được đồng sử dụng, chất hoặc trị liệu tương ứng được sử dụng ở liều lượng thấp hơn so với liều lượng thích hợp để sử dụng chúng một mình. Như vậy, việc đồng sử dụng là đặc biệt mong muốn trong các phương án trong đó việc đồng sử dụng các chất hoặc trị liệu làm giảm liều lượng cần thiết của (các) chất có khả năng gây hại (ví dụ, gây độc), và/hoặc khi việc đồng sử dụng hai hoặc nhiều chất làm cho đối tượng nhạy với tác dụng có lợi của một trong số các chất thông qua việc đồng sử dụng chất kia.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "điều trị" hoặc các cụm từ tương đương về mặt ngữ pháp bao gồm sự cải thiện và/hoặc làm đảo ngược các triệu chứng của bệnh (ví dụ, bệnh thoái hóa thần kinh). Hợp chất mà tạo ra sự cải thiện trong thông số bất kỳ có liên quan đến bệnh khi được sử dụng trong các phương pháp sàng lọc theo sáng chế do đó có thể được xác định là hợp chất trị liệu. Thuật ngữ "điều trị" chỉ cả điều trị trị liệu và phòng ngừa hoặc các biện pháp ngăn ngừa. Ví dụ, những người có thể có lợi từ việc điều trị bằng chế phẩm và phương pháp theo sáng chế bao gồm những người đã có bệnh và/hoặc rối loạn (ví dụ, bệnh thoái hóa thần kinh, bệnh đái tháo đường hoặc thiếu hoặc mất chức năng nhận thức) cũng như những người trong đó bệnh và/hoặc rối loạn cần được ngăn ngừa (ví dụ, sử dụng việc điều trị phòng ngừa theo sáng chế).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "có nguy cơ bị bệnh" chỉ đối tượng (ví dụ, người) mà có bẩm chất bị bệnh cụ thể. Bẩm chất này có thể là di truyền (ví dụ, xu hướng di truyền cụ thể để mắc bệnh, như các rối loạn có khả năng di truyền), hoặc do các yếu tố khác (ví dụ, độ tuổi, khối lượng, điều kiện môi trường, việc tiếp xúc với các hợp chất có hại có mặt trong môi trường, v.v.). Như vậy, dự định rằng sáng chế không bị giới hạn ở nguy cơ cụ thể bất kỳ, cũng như dự định rằng sáng chế không bị giới hạn ở bệnh cụ thể bất kỳ.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "mắc bệnh" chỉ đối tượng (ví dụ, người) mà mắc bệnh cụ thể. Dự định rằng sáng chế không bị giới hạn ở dấu hiệu hoặc triệu chứng cụ thể bất kỳ, hoặc bệnh cụ thể bất kỳ. Như vậy, dự định rằng sáng chế bao gồm đối tượng mà trải qua loạt bệnh bất kỳ (ví dụ, từ sự biểu hiện cận lâm sàng đến bệnh phát triển mạnh) trong đó đối tượng thể hiện ít nhất một số các dấu hiệu phân biệt (ví dụ, dấu hiệu và triệu chứng) có liên quan đến bệnh cụ thể.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "bệnh" và "tình trạng bệnh lý" được sử dụng thay thế lẫn nhau để mô tả trạng thái, dấu hiệu và/hoặc triệu chứng có liên quan đến sự suy yếu bất kỳ của trạng thái bình thường của động vật sống hoặc của bất kỳ trong số các cơ quan hoặc mô của nó mà phá vỡ hoặc biến đổi đặc tính của các chức năng bình thường, và có thể là đáp ứng với các yếu tố môi trường (như chiếu xạ, suy dinh dưỡng, mối nguy hiểm công nghiệp, hoặc thời tiết), với các tác nhân lây nhiễm cụ thể (như sâu, vi khuẩn, hoặc virus), với khiếm khuyết cố hữu của sinh vật (như các tật dị thường khác nhau), hoặc với tổ hợp của các yếu tố này và các yếu tố khác.

Thuật ngữ "hợp chất" chỉ thực thể hóa học, dược phẩm, thuốc bất kỳ, và các chất tương tự mà có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh, tình trạng đau ốm, đau yếu, hoặc rối loạn chức năng của cơ thể. Hợp chất bao gồm cả hợp chất trị liệu đã biết và hợp chất trị liệu tiềm năng. Hợp chất có thể được xác định là có tính trị liệu bằng cách sàng lọc sử dụng các phương pháp sàng lọc theo sáng chế. "Hợp chất trị liệu đã biết" chỉ hợp chất trị liệu mà được cho thấy (ví dụ, thông qua các thử nghiệm ở động vật hoặc thử nghiệm trước đó với việc sử dụng cho người) là hiệu quả trong việc điều trị này. Nói cách khác, hợp chất trị liệu đã biết không bị giới hạn ở hợp chất có hiệu quả trong việc điều trị bệnh (ví dụ, bệnh ung thư, bệnh thoái hóa thần kinh, v.v.).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "bộ kit" được sử dụng khi viện dẫn đến hỗn hợp của các chất phản ứng và các nguyên liệu khác. Dự định rằng bộ kit có thể bao gồm các chất phản ứng như các chất dinh dưỡng và thuốc cũng như cách thức sử dụng. Dự định rằng thuật ngữ "bộ kit" không bị giới hạn ở hỗn hợp cụ thể của các chất phản ứng và/hoặc các nguyên liệu khác.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "gây độc" chỉ tác động bất lợi hoặc có hại bất kỳ đến đối tượng, tế bào, hoặc mô so với cùng tế bào hoặc mô này trước khi sử dụng chất độc.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "dược phẩm" chỉ hỗn hợp của hoạt chất (ví dụ, chế phẩm chứa selenoglycoprotein) với chất mang, trợ hoặc hoạt động, làm cho dược phẩm này đặc biệt thích hợp cho các ứng dụng trong chẩn đoán, ngăn ngừa và/hoặc trị liệu *in vitro*, *in vivo* hoặc *ex vivo*.

Thuật ngữ "dược dụng" hoặc "chấp nhận được về mặt dược lý," trong bản mô tả này, chỉ chế phẩm mà về cơ bản không tạo ra các phản ứng bất lợi, ví dụ, các phản ứng gây độc, phản ứng dị ứng, hoặc phản ứng miễn dịch, khi được dùng cho đối tượng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "tại chỗ" chỉ việc áp dụng chế phẩm theo sáng chế cho bề mặt của da và các tế bào và mô niêm mạc (ví dụ, phế nang, má, lưỡi, cơ nhai, hoặc niêm mạc mũi, và các mô và tế bào khác mà lấp đầy các cơ quan rỗng hoặc các khoang của cơ thể).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất mang dược dụng" chỉ chất mang bất kỳ trong số các chất mang được chuẩn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dung dịch nước muối được đệm phosphat, nước, nhũ tương (ví dụ, như nhũ tương dầu/nước hoặc nước/dầu), và các loại chất thấm ướt khác nhau, bất kỳ và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, chất phủ, natri lauryl sulfat, chất đẳng trương và chất làm chậm sự hấp thụ, chất làm phân rã (ví dụ, tinh bột khoai tây hoặc natri tinh bột glycolat), và các chất tương tự. Chế phẩm cũng có thể bao gồm chất làm ổn định và chất bảo quản. Ví dụ về chất mang, chất làm ổn định và tá dược được mô tả, ví dụ, trong Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa. (1975), tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Theo một số phương án, thực phẩm (ví dụ, nguyên liệu thức ăn và/hoặc sự điều trị) đóng vai trò làm chất mang (ví dụ, của chế phẩm selenoglycoprotein theo sáng chế).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "muối dược dụng" chỉ muối bất kỳ (ví dụ, thu được bởi phản ứng với axit hoặc bazơ) của hợp chất theo sáng chế mà được dung nạp về mặt sinh lý ở đối tượng đích (ví dụ, đối tượng là động vật có vú, và/hoặc các tế bào, mô, hoặc cơ quan *in vivo* hoặc *ex vivo*, *in vivo* hoặc *ex vivo*). "Muối" của hợp chất theo sáng chế có thể thu được từ axit và bazơ vô cơ hoặc hữu cơ. Ví dụ về axit bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axit clohydric, bromhydric, sulfuric, fumaric, maleic, phosphoric, glycolic, lactic, salixylic, succinic, toluen-p-sulfonic, tartaric, axetic, xitric, metansulfonic, etansulfonic, formic, benzoic, malonic, naphtalen-2-sulfonic,

benzensulfonic, và các axit tương tự. Các axit khác, như oxalic, mặc dù bản thân chúng không được dùng, có thể được sử dụng trong điều chế muối hữu ích làm các hợp chất trung gian để thu được hợp chất theo sáng chế và muối cộng axit được dùng của nó. Ví dụ về bazơ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hydroxit kim loại kiềm (ví dụ, natri), hydroxit kim loại kiềm thổ (ví dụ, magie), amoniac, và hợp chất có công thức NW_4^+ , trong đó W là C_{1-4} alkyl, và các chất tương tự. Ví dụ về muối bao gồm, nhưng không giới hạn ở: axetat, adipat, alginat, aspartat, benzoat, benzensulfonat, bisulfat, butyrat, xitrat, camphorat, camphorsulfonat, xyclopentanpropionat, digluconat, dodexylsulfat, etansulfonat, fumarat, flucoheptanoat, glyxerophosphat, hemisulfat, heptanoat, hexanoat, clorua, bromua, iodua, 2-hydroxyetansulfonat, lactat, maleat, metansulfonat, 2-naphtalensulfonat, nicotinat, oxalat, palmoat, pectinat, phenylpropionat, picrat, pivalat, propionat, succinat, tartrat, thioxyanat, tosylat, undecanoat, và các muối tương tự. Các ví dụ khác về muối bao gồm anion của hợp chất theo sáng chế được phối trộn với cation thích hợp như Na^+ , NH_4^+ , và NW_4^+ (trong đó W là nhóm C_{1-4} alkyl), và các cation tương tự. Để sử dụng trong trị liệu, muối của hợp chất theo sáng chế được dự định là được dùng. Tuy nhiên, muối của axit và bazơ mà không được dùng cũng có thể được sử dụng, ví dụ, trong điều chế hoặc tinh chế hợp chất được dùng. Để sử dụng trong trị liệu, muối của hợp chất theo sáng chế được dự định là được dùng. Tuy nhiên, muối của axit và bazơ không được dùng cũng có thể được sử dụng, ví dụ, trong điều chế hoặc tinh chế hợp chất được dùng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “làm khô” chỉ việc làm khô dạng phun, làm khô đông lạnh, làm khô bằng không khí, làm khô bằng chân không hoặc loại bất kỳ khác của quy trình làm giảm hoặc loại bỏ chất lỏng trong các chất.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “làm khô dạng phun” chỉ phương pháp thường được sử dụng để làm khô chất có chứa chất lỏng sử dụng khí nóng để làm bay hơi chất lỏng để làm giảm hoặc loại bỏ chất lỏng trong chất đó. Nói cách khác, nguyên liệu được làm khô bằng cách phun hoặc phun bụi vào dòng khí của không khí khô đã được làm nóng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “làm khô đông lạnh” và thuật ngữ “làm đông khô nhanh” và thuật ngữ “sấy thăng hoa” chỉ việc loại bỏ dung môi khỏi chất ở trạng thái đông lạnh bằng cách thăng hoa. Quá trình này được thực hiện bằng cách làm đông lạnh nguyên liệu cần được sấy khô dưới điểm otecti của nó và sau đó tạo ra ẩn nhiệt thăng

hoa. Việc kiểm soát chính xác độ chân không và nhiệt đầu vào cho phép làm khô từ trạng thái đông lạnh mà không có sự tan chảy ngược của sản phẩm. Trong ứng dụng thực tiễn, quy trình này được tăng tốc và được kiểm soát chính xác trong điều kiện áp suất giảm.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “bột khô chảy tự do” chỉ bột khô có khả năng chảy tự do, ví dụ, bột mà có thể rót được từ đồ chứa, túi, lọ, v.v. mà không có sự cản trở của các khối lớn.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “nghiên” chỉ việc làm giảm kích thước hạt bằng cách nén, cắt, hoặc mài mòn.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “rửa” chỉ việc loại bỏ hoặc làm sạch (ví dụ, sử dụng loại chất hòa tan bất kỳ (ví dụ, nước cất, dung dịch đệm, hoặc dung môi) hoặc hỗn hợp) của tạp chất hoặc thành phần hòa tan không mong muốn của chế phẩm (ví dụ, thành tế bào nấm men) có thể được rửa để loại bỏ thành phần thành tế bào không phải nấm men ra khỏi mẫu).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “polymersom” chỉ bong được lắp ráp từ các polyme tổng hợp trong dung dịch gốc nước (ví dụ, dung dịch mà có thể được sử dụng để bao nang nguyên liệu). Polymersom có thể được tạo ra bằng cách sử dụng copolyme khối tổng hợp amphiphil để tạo thành màng bong, và có bán kính nằm trong khoảng từ 50 nm đến 5 μ m hoặc lớn hơn. Hầu hết các polymersom đều chứa dung dịch gốc nước trong lõi của chúng và hữu ích để bao nang và bảo vệ các phân tử nhạy, như thuốc, enzym, các protein và petptit khác cũng như mảnh ADN và ARN. Màng polymersom tạo ra rào cản vật lý cách ly nguyên liệu đã được bao nang với các nguyên liệu bên ngoài, như các nguyên liệu được tìm thấy trong hệ sinh học. Ví dụ về polymersom được sử dụng trong các phương án theo sáng chế, cũng như các quy trình tổng hợp của chúng, có thể được tìm thấy, ví dụ, trong US 7,867,512, 7,682,603, và 6,835,394, mỗi tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất thải” chỉ nguyên liệu không mong muốn hoặc vô dụng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “nước thải” là nước bất kỳ mà chất lượng nước đã bị ảnh hưởng một cách bất lợi bởi các tác động của loài người.

I. Giới thiệu

Selen là yếu tố vết liên quan đến việc điều hòa các khía cạnh của cơ chế bảo vệ chống oxy hóa trong tất cả các mô sống bằng cách tương tác với glutathion của cơ thể (GSH) và các enzym chống oxy hóa chứa Se chính của nó, glutathion peroxidaza (GPX) và thioredoxin reductaza (Xem, Goehring et al., J. Anim. Sci. 59, 725-732 (1984); Gerloff et al., J. Anim. Sci. 70, 3934-3940 (1992); tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Glutathion và GPX có khả năng bảo vệ tính toàn vẹn của các liên kết chưa no của các phospholipit màng bằng cách làm tan sự tấn công của gốc tự do có khả năng khơi mào và lan truyền sự oxy hóa lipid (Xem, Meister and Anderson, Annu. Rev. Biochem. 52, 711-760 (1983); Deleve and Kaplowitz, Pharm. Ther. 52, 287-305 (1991); Palmer and Paulson, Nutr. Rev. 55, 353-361 (1997); tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Selen cũng có liên quan đến việc làm giảm nguy cơ ung thư trong một vài nghiên cứu dịch tễ học (Xem, Salonen et al., Am. J. Epidemiol. 120: 342-349 (1984); Willett et al., Lancet 2: 130-134 (1983); Virtamo et al., Cancer 60: 145-148 (1987); tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Nhiều hợp chất selen khác nhau có nguồn gốc tự nhiên và tổng hợp đã được cho thấy là ức chế sự phát triển của khối u trong các nghiên cứu ở động vật ở khoảng liều lượng rộng (Xem, Ip, J. Nutr. 128: 1845-1854 (1998); tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Mặc dù hầu hết các nghiên cứu ở động vật đều sử dụng liều được lý của selen (>2 mg/kg) trong hóa ngăn ngừa ung thư (Xem, Ip, J. Nutr. 128: 1845-1854 (1998)), sự thiếu hụt selen cũng đã được cho thấy là làm tăng sự phát sinh ung thư vú (Xem Ip and Daniel, Cancer Res. 45: 61-65 (1985); tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) và ung thư da do UVB gây ra (Xem, Pence et al., 102: 759-761 (1994); tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Các protein thành tế bào nấm men được liên kết với polysacarit thành tế bào bởi liên kết hóa học, và để giải phóng protein thành tế bào nấm men vào dung dịch, các liên kết này cần phải được phá vỡ. Thực hành chuẩn để chiết protein từ thành tế bào nấm men là phá vỡ các liên kết sử dụng sự thủy phân bằng kiềm (pH 11,5, 80°C) trước khi ly tâm để tách protein từ glucan polysacarit không tan trong nước.

Các thử nghiệm tiến hành trong quá trình phát triển các phương án của sáng chế

được thực hiện để cố gắng chiết selenoglycoprotein sử dụng sự thủy phân bằng kiềm theo thực hành chuẩn. Các cố gắng để chiết selenoglycoprotein từ thành tế bào nấm men sử dụng sự thủy phân bằng kiềm này đã thất bại. Sau đó, đã nhận thấy rằng việc chiết selenoglycoprotein từ thành tế bào nấm men sử dụng sự thủy phân bằng kiềm thất bại là do sự phá hủy của selenoglycoprotein. Các cố gắng sau đó để chiết selenoglycoprotein được tiến hành bằng cách sử dụng quy trình thủy phân bằng kiềm cải biến (pH 11,5, 60°C). Các cố gắng này để chiết selenoglycoprotein từ thành tế bào nấm men cũng thất bại. Các phương pháp chiết protein nấm men, kiềm, tiêu biểu không có hiệu quả khi cố gắng chiết selenoglycoprotein từ nấm men. Do đó, các thử nghiệm bổ sung đã được tiến hành trong quá trình phát triển các phương án của sáng chế, các thử nghiệm này cố gắng chiết selenoglycoprotein bằng cách sử dụng phương pháp chiết axit (pH 5, 80°C). Như được nêu trong bản mô tả này, phương pháp chiết axit là đạt được thành công; selenoglycoprotein không bị phá hủy và có thể thực hiện được việc chiết.

Như vậy, theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp mới để thu được selenoglycoprotein (SGP), chế phẩm selenoglycoprotein (SGP) (ví dụ, thu được bằng cách sử dụng phương pháp chiết axit (ví dụ, các phân đoạn selenoglycoprotein phụ thuộc pH), chế phẩm chứa selenoglycoprotein đã được bao nang (các SGP), và các phương pháp sử dụng chế phẩm này (ví dụ, để tạo ra lợi ích in vivo (ví dụ, sự thay đổi profin biểu hiện gen) cho đối tượng (ví dụ, người, động vật, v.v.)). Cụ thể, các thử nghiệm được tiến hành trong quá trình phát triển các phương án của sáng chế chứng tỏ rằng chế phẩm (ví dụ, chứa SGP (ví dụ, được tách riêng bằng các phương pháp theo sáng chế)) và các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra selen có hiệu quả về mặt sinh học cho đối tượng (ví dụ, nhờ đó làm tăng hàm lượng selen của mô và/hoặc cơ ở đối tượng (ví dụ, nhờ đó dẫn đến sự ổn định và/hoặc tăng cường sức khỏe của đối tượng))). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp để thu được các SGP, chế phẩm chứa các SGP đã được bao nang (ví dụ, được bao nang bởi polymersom) và các phương pháp sử dụng các chế phẩm này để làm thay đổi chức năng tế bào (ví dụ, nhờ đó tạo ra tác dụng có lợi đối với hệ thống của đối tượng (ví dụ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hệ cơ xương, hệ thần kinh, hệ thống thần kinh, hệ thống nội tiết, hệ thống trao đổi chất, và/hoặc hệ miễn dịch)). Sáng chế còn đề xuất các phương pháp sử dụng các SGP một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều hoạt chất khác để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh (ví dụ, sự phát triển và/hoặc di căn của ung thư). Sáng chế

còn đề xuất các phương pháp sử dụng các SGP để tăng cường sức khỏe động vật (ví dụ, vật nuôi). Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế được sử dụng để bổ sung, cải thiện và/hoặc tăng cường giá trị sức khỏe và/hoặc dinh dưỡng của sản phẩm thực phẩm (ví dụ, thịt, sữa, trứng, v.v.). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa các SGP và các phương pháp sử dụng chế phẩm này làm biện pháp điều trị trị liệu, bổ sung dinh dưỡng, và/hoặc phòng ngừa (ví dụ, cho sức khỏe chung, để tăng cường hệ miễn dịch, cho bệnh thoái hóa thần kinh, để tăng cường chức năng nhận thức, để điều trị hoặc phòng ngừa ung thư, sự phát triển và/hoặc di căn của khối u, v.v.), và các phương pháp tạo ra, sản xuất, tinh chế, tách, chiết, và/hoặc xác định đặc điểm chế phẩm này. Sáng chế còn đề xuất các SGP và các phương pháp sử dụng các SGP để làm thức ăn cho động vật và/hoặc bổ sung cho thức ăn của động vật.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm selen hòa tan (ví dụ, các SGP) và các phương pháp sử dụng, sản xuất, và tinh chế chế phẩm này. Ví dụ, theo một số phương án, sáng chế đề xuất SGP hòa tan (Xem, chẳng hạn, Ví dụ 1-2 mô tả việc tạo ra (ví dụ, tách và xác định đặc điểm của) các phân đoạn SGP phụ thuộc pH), và các chế phẩm và phương pháp sử dụng chúng (Xem, Ví dụ 3-4). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất selen (ví dụ, selen hữu cơ (ví dụ, phân đoạn SGP phụ thuộc pH của SEL-PLEX hoặc các nấm men được làm giàu selen khác)) ở dạng hòa tan mà được sử dụng cho đối tượng thông qua nhiều con đường (ví dụ, qua đường miệng, tại chỗ, theo đường tĩnh mạch, v.v.). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm selen hòa tan (ví dụ, selen hữu cơ) ít chất xơ. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm và phương pháp dùng cho các hệ phân phối selen hữu cơ hòa tan (ví dụ, selenoglycoprotein được bao nang bằng polymersom, viên nang nano, polyme, v.v.).

Nấm men (ví dụ, *Saccharomyces cerevisiae*), được sinh trưởng trong môi trường chứa selen (ví dụ, selen vô cơ (ví dụ, natri selenit (Na_2SeO_3))) chuyển hóa selen (ví dụ, selen vô cơ) và kết hợp selen thay vì lưu huỳnh vào cysteine và methionine, tạo ra protein chứa selenoaminoaxit (SeCys và SeMet) (Demirci et al. J. Agric. Food Chem. 47, 2496-2500 (1999)., Demirci & Pometto. J. Agric. Food Chem. 47, 2491-2495 (1999), Ouerdane & Mester. J. Agric. Food Chem. 56, 11792-11799, (2008), các tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). ALLTECH, Inc. (Nicholsville, KY, USA) sản xuất nấm men được làm giàu selen, được làm khô dạng phun và được bán dưới tên SEL-PLEX làm thức ăn cho súc vật và chất bổ sung dinh dưỡng cho thực phẩm, chứa

“selen hữu cơ” (Xem, Korhola et al. Res. 18, 65-68, (1986)., tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Nồng độ tối thiểu của selen trong SEL-PLEX là 1500 ppm và protein là chất mang duy nhất của nó (Xem, Surai. Nottingham University Press 2002, 234-236 (2002), Kelly & Power. J. Dairy Sci. 78, 237-242 (1995), McSheehy et al. Analyst 130, 35-37 (2005), tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Có hai nhóm protein trong nấm men: protein có mặt bên trong tế bào nấm men và protein kết hợp với mannan của thành tế bào nấm men (Xem, Sedmak. US Patent Appl. Publication Pub. No.: US 2006/0263415., tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Khoảng 17,0 % khối lượng của SEL-PLEX thương mại là tan được trong nước, và nguyên liệu này chứa ít hơn 6,5 % của tổng selen có mặt trong SEL-PLEX. Nghiên cứu việc chế biến thức ăn cho gà trong đó SEL-PLEX và natri selenit được sử dụng làm nguồn selen, cho thấy SEL-PLEX giúp vận chuyển selen tốt hơn nhiều vào cơ ức của gà. Nhiều hoạt tính sinh học được phát hiện đối với việc sử dụng qua đường miệng của SEL-PLEX (Xem, Rayman. Lancet 356, 233-241 (2000), McKenzie Trends in Immunology 19, 342-345 (1998), Tapiero. Biomedicine & Pharmacotherapy 57, 134-144 (2003), Combs & Grey Pharmacol. Ther. 79, 179-192 (1998), Clark et. al. J. Am. Med. Assoc. 276, 1957-1963 (1996), tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất việc tách, và xác định đặc điểm vật lý và hóa học của selenoglycoprotein hòa tan (các SGP) từ nấm men (ví dụ, *Saccharomyces cerevisiae*) được sinh trưởng trong môi trường chứa selen (ví dụ, selen vô cơ (ví dụ, natri selenit)), và sự tham gia có hiệu quả của chúng trong việc phân phối “selen hữu cơ” đến các mô (ví dụ, người, động vật, gà, v.v.), bằng cách cho động vật ăn thực phẩm (ví dụ, thức ăn) được bổ sung hoặc theo cách khác chứa các SGP theo sáng chế (Xem, chẳng hạn, Ví dụ 1-4). Sáng chế đề xuất sự phân phối nhắm đích mô, theo đường tĩnh mạch, qua đường miệng, và/hoặc qua da của các thành phần selen hòa tan, có hoạt tính (ví dụ, các phân đoạn SGP phụ thuộc pH của nấm men được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX)). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất dạng giải phóng chậm của hệ phân phối “selen hữu cơ” (ví dụ, viên nang nano, khối cầu polyme, và các SGP được bao nang bởi polymersom) (Xem, chẳng hạn, Ví dụ 5-9). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa các SGP được bao nang bởi polymersom. Theo một số phương án sáng chế đề xuất sự phân phối được tăng cường và sự phân bố sinh học được cải thiện

của các SGP bằng cách bao nang các SGP bên trong các polymersom gốc poly(etylen oxit)-khối-poly(ϵ -caprolacton) (PEO-b-PCL).

Việc tách các thành phần tế bào nấm men khác nhau bằng cách chiết thành tế bào khỏi các thành phần nội bào của tế bào nấm men đã được mô tả (Xem, Otero et al. J. Chem. Tech. Biotechnol. 66, 67-71 (1996), tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Các kỹ thuật tách này không được áp dụng cho việc chiết nấm men selen được làm khô dạng phun. Điều kiện kiềm thông thường (pH 9,0-14,0) được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này để chiết glycoprotein từ nấm men (Xem, Roberge et al. J. Agric. Food Chem. 51, 4191-4197 (2003)) gặp thất bại vì các phân tử thể SeH hoặc SeMe bị loại bỏ khỏi axit amin selenoxystin hoặc selenomethionin. Nói cách khác, các phân tử thể mong muốn bị phân hủy và kết quả là, selen có mặt trong các SGP ban đầu bị mất trong khi chiết trong điều kiện kiềm được áp dụng để chiết nấm men chứa selenoprotein (Xem Bảng 12 của Ví dụ 8).

Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm selenoglycoprotein (ví dụ, bao gồm phân đoạn phụ thuộc pH của selenoglycoprotein được mô tả trong bản mô tả này) và các phương pháp sử dụng chế phẩm này. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp sản xuất, tinh chế, tách, chiết, phân tách, kết tủa, và/hoặc xác định đặc điểm selenoglycoprotein (ví dụ, từ nấm men được làm giàu selen). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm và phương pháp để phân phối chế phẩm selen hòa tan (ví dụ, các SGP (ví dụ, các phân đoạn SGP phụ thuộc pH)) cho đối tượng, bao gồm chế phẩm chất bổ sung cho thức ăn (ví dụ, chứa các SGP (ví dụ, dược phẩm, chất dinh dưỡng, chất bổ sung, thực phẩm, v.v.)). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm và phương pháp để phân phối cải tiến (ví dụ, phân phối có điều khiển, phân phối giải phóng theo thời gian, v.v.) selen (ví dụ, các SGP (ví dụ, polymersom, viên nang nano, hạt nano, polyme, v.v.)). Chế phẩm và phương pháp theo sáng chế được sử dụng trong nhiều ứng dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các ứng dụng trong khẩu phần ăn (ví dụ, phối trộn với thức ăn cho súc vật hoặc theo cách khác, chế biến thức ăn cho động vật), ngăn ngừa, trị liệu cũng như các ứng dụng trong nghiên cứu. Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm thức ăn cho động vật (ví dụ, chứa các SGP (ví dụ, SGP hòa tan (ví dụ, selen hữu cơ hòa tan))), phương pháp sản xuất chế phẩm này và phương pháp cung cấp dinh dưỡng (ví dụ, chứa các SGP (ví dụ, SGP hòa tan (ví dụ, selen hữu cơ hòa tan))) cho động vật bao gồm bước cung cấp chế phẩm này

cho động vật.

II. Chiết, tách, tinh chế và sử dụng

Theo một số phương án theo sáng chế, selen hòa tan thu được ở dạng selenoglycoprotein (các SGP). Theo một số phương án, các SGP được chiết từ nguồn selenoprotein phổ biến (ví dụ, nấm men được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX)). Theo một số phương án, việc chiết và/hoặc tinh chế các SGP bao gồm một hoặc nhiều bước chiết/kết tủa phụ thuộc pH (ví dụ, như được nêu trong Ví dụ 1 và 2). Theo một số phương án, việc chiết và/hoặc tinh chế các SGP bao gồm một hoặc nhiều bước cắt phân đoạn phụ thuộc pH. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất việc chiết bằng axit nấm men được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX) để hòa tan các SGP (ví dụ, mà không làm biến tính và/hoặc phá hủy các SGP). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất rằng việc kết tủa SGP phụ thuộc pH từ chất chiết axit (ví dụ, như được nêu trong Ví dụ 1- 2) tạo ra hàm lượng tăng của selenoglycoprotein, hàm lượng giảm của chất xơ không tiêu hóa được, và nồng độ cao của selen (ví dụ, nồng độ của selen lớn hơn nồng độ có mặt trong SEL-PLEX). Như vậy, theo một số phương án, sáng chế đề xuất SGP được chiết từ nấm men được làm giàu selen trong đó hàm lượng selen của SGP là lớn hơn hàm lượng selen của nguyên liệu từ đó SGP được chiết (ví dụ, tính theo % khối lượng, ppm, v.v.). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất selen ở dạng phân đoạn SGP phụ thuộc pH (ví dụ, phân đoạn pH 4,0 hoặc pH 6,0) của nấm men được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX) mà thể hiện mức sinh khả dụng khi được dùng cho đối tượng giống như hoặc rất tương tự khi so với độ sinh khả dụng của selen từ nguồn gốc nấm men được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX) (Xem, Ví dụ 3, Bảng 5).

Theo một số phương án, các SGP được chiết từ nguồn selenoprotein phổ biến (ví dụ, tế bào nấm men được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX)). Theo một số phương án, một phần của selenoprotein trong nguồn selenoprotein bao gồm các SGP (ví dụ, 0,1%... 0,2%...0,5%... 1,0%... 2,0%... 5,0%... 10%... 20%... 50% SGP hoặc lớn hơn). Theo một số phương án, nguồn selenoprotein chứa các tế bào (ví dụ, tế bào nấm men) đã được sinh trưởng trong điều kiện có mặt môi trường chứa Se (ví dụ, môi trường giàu Se). Theo một số phương án, tế bào chứa Se (ví dụ, tế bào nấm men) được xử lý để chiết, tách riêng, và/hoặc tinh chế selenoprotein tạo ra nguồn selenoprotein hoặc chế phẩm giàu selenoprotein (ví dụ, chế phẩm giàu SGP). Theo một số phương án, mẫu chứa selenoprotein và các SGP được làm giàu đối với các SGP.

Theo một số phương án, nguồn selenoprotein hoặc chế phẩm giàu selenoprotein (ví dụ, nguồn nấm men đã được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX)) được thực hiện một hoặc nhiều bước để tạo thành các SGP đã được tách riêng, được tinh chế, được phân tách, và/hoặc chiết. Theo một số phương án, nguồn selenoprotein được trộn (ví dụ, trong chất mang lỏng (ví dụ, nước, dung dịch đệm, muối, v.v.)) để sản xuất huyền phù đặc, hỗn hợp, dịch tan, và/hoặc dung dịch của protein. Theo một số phương án, nguồn selenoprotein (ví dụ, nguồn nấm men đã được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX)) được trộn ở nhiệt độ cao (ví dụ, trên nhiệt độ đông lạnh, trên nhiệt độ trong phòng, 30°C... 40°C... 50°C... 60°C... 70°C... 80°C... 90°C hoặc lớn hơn). Theo một số phương án, nguồn selenoprotein (ví dụ, nguồn nấm men đã được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX)) được trộn ở độ pH thấp (ví dụ, điều kiện axit (ví dụ, pH khoảng 0,5, khoảng 1,0, khoảng 1,5, khoảng 2,0, khoảng 3,0, khoảng 4,0, khoảng 4,5, khoảng 5,0, khoảng 5,5, khoảng 6,0 hoặc khoảng 6,5)). Theo một số phương án, nguồn selenoprotein (ví dụ, nguồn nấm men đã được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX)) được trộn nhẹ nhàng, được trộn nhanh, được trộn kỹ lưỡng, được trộn mạnh, v.v.. Theo một số phương án, nguồn selenoprotein (ví dụ, nguồn nấm men đã được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX)) được trộn ở độ pH thấp (ví dụ, điều kiện axit (ví dụ, pH khoảng 0,5, khoảng 1,0, khoảng 1,5, khoảng 2,0, khoảng 3,0, khoảng 4,0, khoảng 4,5, khoảng 5,0, khoảng 5,5, khoảng 6,0 hoặc khoảng 6,5) và nhiệt độ cao (ví dụ, trên nhiệt độ đông lạnh, trên nhiệt độ trong phòng, 30°C... 40°C... 50°C... 60°C... 70°C... 80°C... 90°C, hoặc lớn hơn)). Theo một số phương án, độ pH của hỗn hợp được duy trì thông qua việc bổ sung axit hoặc bazơ.

Theo một số phương án, hỗn hợp chứa selenoprotein được ly tâm để tách các pha lỏng/hòa tan và pha rắn/không tan. Theo một số phương án, tốc độ ly tâm được chọn sao cho đủ để tách các pha. Theo một số phương án, pha lỏng bao gồm SGP hòa tan. Theo một số phương án, độ pH của pha lỏng được điều chỉnh (ví dụ, được làm tăng) để kết tủa một phần của các SGP. Theo một số phương án, độ pH của phân đoạn chất lỏng được tăng ít đến vừa phải (ví dụ, pH được làm tăng khoảng 0,1...0,2...0,5... 1,0...2,0) để kết tủa các SGP mà hòa tan ở độ pH ban đầu, nhưng không hòa tan ở độ pH cao. Theo một số phương án, độ pH của phân đoạn chất lỏng được làm tăng đáng kể (ví dụ, độ pH được làm tăng khoảng 1,0...2,0...3,0...4,0...5,0...6,0) để kết tủa một phần lớn của các SGP mà đã hòa tan ở độ pH ban đầu. Theo một số phương án, selenoglycoprotein được kết tủa và được tách riêng khỏi pha lỏng ở các điều kiện pH khác nhau để tạo thành

nhiều phân đoạn phụ thuộc pH của selenoglycoprotein hòa tan. Ví dụ, theo một số phương án, pha lỏng đơn bao gồm chất chiết của nấm men được làm giàu selen hòa tan trong điều kiện axit được sử dụng để tạo ra phân đoạn thứ nhất của selenoglycoprotein hòa tan kết tủa ở độ pH thứ nhất (ví dụ, độ pH bằng 1,85), phân đoạn thứ hai của selenoglycoprotein hòa tan kết tủa ở độ pH thứ hai (ví dụ, độ pH bằng 3,0), phân đoạn thứ ba của selenoglycoprotein hòa tan kết tủa ở độ pH thứ ba (ví dụ, độ pH bằng 4,0), và phân đoạn thứ tư của selenoglycoprotein hòa tan kết tủa ở độ pH thứ tư (ví dụ, độ pH bằng 6,0). Theo một số phương án, việc kết tủa selenoglycoprotein từ pha lỏng bằng cách tăng độ pH của pha lỏng bao gồm nhiều phản ứng kết tủa liên tiếp phụ thuộc pH của pha lỏng.

Theo một số phương án, các SGP đã kết tủa được tách riêng khỏi phân đoạn chất lỏng đã được điều chỉnh độ pH bằng cách ly tâm (ví dụ, ở tốc độ đủ để tạo ra các pha lỏng và pha rắn riêng rẽ). Theo một số phương án, các SGP đã được tách riêng khỏi pha lỏng được làm khô đông lạnh để tạo thành phân đoạn SGP rắn. Theo một số phương án, quy trình làm tăng độ pH của pha lỏng và ly tâm để tách riêng phân đoạn SGP được lặp lại để tạo ra các phân đoạn SGP có độ hòa tan khác nhau (ví dụ, hòa tan ở độ pH thấp hơn 1,5... hòa tan ở độ pH thấp hơn 2... hòa tan ở độ pH thấp hơn 3... hòa tan ở độ pH thấp hơn 4... hòa tan ở độ pH thấp hơn 5... hòa tan ở độ pH thấp hơn 6, v.v.). Theo một số phương án, một bước điều chỉnh độ pH và ly tâm được thực hiện để tạo ra một phân đoạn chứa các SGP có độ hòa tan mong muốn (ví dụ, hòa tan ở độ pH thấp hơn 1,5... hòa tan ở độ pH thấp hơn 2... hòa tan ở độ pH thấp hơn 3... hòa tan ở độ pH thấp hơn 4... hòa tan ở độ pH thấp hơn 5... hòa tan ở độ pH thấp hơn 6, v.v.). Theo một số phương án, pha lỏng vẫn còn sau khi loại bỏ phân đoạn SGP cuối cùng được sử dụng làm thành phần của môi trường sinh trưởng cho các tế bào được sử dụng để sản xuất tiếp selenoprotein hoặc SGP. Theo một số phương án, chế phẩm chứa selenoglycoprotein hòa tan chỉ chứa một phân đoạn phụ thuộc pH của selenoglycoprotein (ví dụ, selenoglycoprotein hòa tan từ pha lỏng chứa chất chiết của nấm men được làm giàu selen hòa tan trong điều kiện axit kết tủa ở độ pH 4,0). Theo một số phương án, chế phẩm chứa selenoglycoprotein hòa tan chứa hai hoặc nhiều phân đoạn phụ thuộc pH của selenoglycoprotein (ví dụ, selenoglycoprotein hòa tan từ pha lỏng chứa chất chiết của nấm men được làm giàu selen hòa tan trong điều kiện axit kết tủa ở hai hoặc nhiều giá trị pH khác nhau).

Theo một phương án được ưu tiên, quy trình chiết SGP từ nguồn selenoprotein (ví dụ, nấm men được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX)) và cất phân đoạn phụ thuộc pH hỗn hợp của các SGP (Xem các Fig. 2 và 3) bao gồm hai giai đoạn (Xem, chẳng hạn, Ví dụ 1-2, các Fig.1 và 2). Trong giai đoạn đầu, huyền phù chứa nấm men được làm giàu selen trong HCl nồng độ 0,3N (pH 1,5) được khuấy và được gia nhiệt ở nhiệt độ 80°C trong 8 giờ. Độ pH của hỗn hợp được giữ ở độ pH 1,5 bằng cách bổ sung HCl đặc trong giờ chiết đầu tiên. Sau tám giờ, hỗn hợp này được ly tâm, và pha lỏng được tách riêng. Độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến 1,85, bằng cách bổ sung NaOH nồng độ 2,0N và các SGP hòa tan hạn chế ở độ pH này kết tủa khỏi dung dịch và được tách riêng khỏi chất lỏng (pH 1,85) bằng quy trình ly tâm lần thứ hai và sau đó được làm khô đông lạnh để tạo thành phân đoạn SGP rắn có độ pH 1,85. Theo một số phương án, chất lỏng (pH 1,85) được trộn với chất rắn (pH 1,5) từ quy trình ly tâm lần thứ nhất, mà dẫn đến sự thay đổi độ pH của hỗn hợp đến pH 1,6. Phần chính của các SGP hòa tan ở độ pH 1,6, được đưa vào pha lỏng, mà không làm tăng thể tích của dòng chất thải được tạo ra trong giai đoạn này của quy trình. Sản phẩm phụ chính từ giai đoạn này của quy trình là chất rắn từ quy trình ly tâm lần thứ hai. Dòng chất thải rắn tạo nên khoảng 56,5 % khối lượng của nấm men được làm giàu selen được lấy để chiết và chứa nguyên liệu thành tế bào nấm men selen có giá trị chứa: 38,91 % protein và 2477 ppm selen. Theo một số phương án, các chất rắn này được sử dụng (ví dụ, một mình hoặc kết hợp với các nguyên liệu khác (ví dụ, nấm men được làm giàu selen)) làm chất bổ sung dinh dưỡng thân thiện với môi trường trong thức ăn của động vật. Trong giai đoạn thứ hai (Xem Fig.3), pha lỏng (pH 1,6) từ quy trình ly tâm lần thứ hai (Xem Fig. 2) được chuyển vào thiết bị trộn và độ pH được điều chỉnh thành pH 3,0 bằng cách bổ sung NaOH nồng độ 2,0N và các SGP hòa tan hạn chế ở độ pH này kết tủa khỏi dung dịch và được tách riêng khỏi chất lỏng (pH 3,0) bằng quy trình ly tâm lần thứ ba và cuối cùng được làm khô đông lạnh để tạo thành phân đoạn SGP rắn có độ pH 3,0 (Xem các Ví dụ 1-2 và các Fig. 2 và 3). Pha lỏng (pH 3,0) từ quy trình ly tâm lần thứ ba được chuyển vào thiết bị trộn và độ pH được điều chỉnh thành pH 4,0 bằng cách bổ sung NaOH nồng độ 2,0N và các SGP hòa tan hạn chế ở độ pH này kết tủa khỏi dung dịch và được tách riêng khỏi chất lỏng (pH 4,0) bằng quy trình ly tâm lần thứ tư và cuối cùng được làm khô đông lạnh để tạo thành phân đoạn SGP rắn có độ pH 4,0. Pha lỏng (pH 4,0) từ quy trình ly tâm lần thứ tư được chuyển vào thiết bị trộn và độ pH được điều chỉnh thành pH 6,0 bằng cách

bổ sung NaOH nồng độ 2,0N và các SGP hòa tan hạn chế ở độ pH này kết tủa khỏi dung dịch và được tách riêng khỏi chất lỏng (pH 6,0) bởi quy trình ly tâm lần thứ năm và sau đó được làm khô đông lạnh để tạo thành phân đoạn SGP rắn có độ pH 6,0. Dòng chất thải duy nhất được tạo ra ở giai đoạn thứ hai của quy trình là dòng nước thải, chứa 13,4 % khối lượng là chất rắn (so với khối lượng của nấm men được làm giàu selen được sử dụng trong quy trình chiết), trong số đó, phân đoạn protein tạo nên khoảng 13,3 % khối lượng, natri clorua tạo nên 3,6 % khối lượng và glucoza và mannoza mono- và oligosacarit tạo nên trên 80 % khối lượng. Dòng “nước thải” có độ pH 6,0 này và hàm lượng selen bằng 242 ppm có thể được tái chế hoặc theo cách khác được tái sử dụng để điều chế mẻ mới của nấm men selen (ví dụ, được sử dụng trong môi trường sinh trưởng).

Theo một số phương án, các SGP kết tủa ở độ pH 4,0 thể hiện sự phân phối selen tốt hơn (ví dụ, đến mô cơ) so với nấm men được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX) và sự phân phối tốt hơn nhiều so với dạng selen vô cơ (ví dụ, natri selenit) (Xem, chẳng hạn, Ví dụ 3). Ngoài ra, các phân đoạn selenoglycoprotein phụ thuộc pH (ví dụ, pH 6,0) là khác nhau về mặt thành phần so với nấm men được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX) và cho phép phân phối lượng tương tự của selen trong khi đòi hỏi lượng nguyên liệu ban đầu ít hơn nhiều (ví dụ, nấm men được làm giàu selen).

Theo một số phương án, quy trình chiết SGP bao gồm 4 hoặc ít hơn 4 bước điều chỉnh độ pH và ly tâm của quy trình nêu trên (ví dụ, 1 bước điều chỉnh độ pH và ly tâm, 2 bước điều chỉnh độ pH và ly tâm, 3 bước điều chỉnh độ pH và ly tâm, 4 bước điều chỉnh độ pH và ly tâm).

III. Thức ăn cho động vật

Thức ăn cho động vật chỉ thực phẩm bất kỳ được sử dụng để cung cấp thức ăn cho vật nuôi đã được thuần hóa (ví dụ, gia súc, dê, cừu, ngựa, gia cầm, trâu, Anpaca, lạc đà không bướu, lừa, lợn, thỏ, gà, ngỗng, gà tây, hoặc lợn). Thức ăn cho động vật thường bao gồm cỏ khô, rơm, thức ăn gia súc ủ xilô, thức ăn được nén và được vùi viên, dầu và khẩu phần trộn, và cả hạt mầm và cây họ đậu. Ngành công nghiệp thức ăn cho động vật trên toàn thế giới tiêu thụ 635 triệu tấn thức ăn trong năm 2006, với tốc độ phát triển hàng năm khoảng 2%. Việc sử dụng đất nông nghiệp để phát triển thức ăn, đúng hơn là, thực phẩm cho người có thể gây tranh cãi; một số loại thức ăn, như ngũ cốc (ngô), cũng có thể đóng vai trò làm thực phẩm cho người, trong khi đó các loại khác như cỏ thì

không thể. Ngoài việc cung cấp nguồn năng lượng cho động vật, thức ăn cho động vật cũng cung cấp các chất dinh dưỡng (ví dụ, selen) được sử dụng bởi cơ thể.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm dinh dưỡng (ví dụ, chế phẩm selen hòa tan (ví dụ, các SGP) cho phép tạo ra chế phẩm thức ăn cho động vật chứa selen (ví dụ, hàm lượng cao của selen so với chế phẩm thức ăn chuẩn (ví dụ, selen hòa tan)) mà làm giảm tổng giá thành, làm tăng sự chuyển hóa thức ăn và duy trì và/hoặc tăng cường chất lượng của sản phẩm động vật (ví dụ, thịt, trứng, sữa, v.v.) thu được từ vật nuôi nhận được chế phẩm này so với thức ăn cho động vật thông thường.

Ví dụ, theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm chất bổ sung cho thức ăn chứa các SGP mà có thể được kết hợp với và/hoặc được kết hợp vào thức ăn cho động vật và được sử dụng cho (ví dụ, được cấp cho) động vật để tạo ra tác động tương đương hoặc tốt hơn đến đặc tính sinh trưởng ở động vật (ví dụ, so với động vật được cho ăn khẩu phần ăn với các dạng khác của selen bổ sung (ví dụ, nấm men được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX)). Theo một số phương án, chế phẩm chất bổ sung cho thức ăn theo sáng chế làm tăng lượng của selen tuần hoàn (ví dụ, nằm trong máu và/hoặc huyết thanh) ở đối tượng (ví dụ, người hoặc động vật) nhận được chế phẩm này. Theo một số phương án, tỷ lệ selen được sử dụng là sinh khả dụng trong chế phẩm selen hòa tan theo sáng chế (ví dụ, các SGP) lớn hơn so với trong các chế phẩm selen khác (ví dụ, natri selenit hoặc nấm men được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX)). Tức là, theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa selenoglycoprotein chứa tỷ lệ và/hoặc tỷ số lớn hơn của selen mà được làm cho sẵn có (ví dụ, sinh khả dụng) cho đối tượng so với các dạng khác của selen (ví dụ, nấm men được làm giàu selen) nghĩa là cần lượng ít hơn của chế phẩm chứa selenoglycoprotein theo sáng chế (ví dụ, để thu được lượng sinh khả dụng tương tự). Theo một số phương án, chế phẩm chất bổ sung cho thức ăn theo sáng chế (ví dụ, chứa các SGP theo sáng chế) làm tăng lượng của selen (ví dụ, nằm trong cơ hoặc, các mô khác) ở đối tượng (ví dụ, người hoặc động vật) nhận được chế phẩm này. Theo một số phương án, việc sử dụng các SGP và/hoặc selen hòa tan dẫn đến làm tăng độ sinh khả dụng của selen đối với huyết thanh, mô mỡ, mô cơ, v.v..

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng hiệu quả sử dụng các chất dinh dưỡng trong khẩu phần ăn cấp cho động vật của động vật bao gồm bước cung cấp cho động vật khẩu phần ăn chứa chế phẩm chất bổ sung cho thức ăn theo sáng chế, trong đó chế phẩm bổ sung này tăng cường khả năng của động vật để xử lý và

sử dụng các chất dinh dưỡng có mặt trong khẩu phần ăn của chúng. Theo một số phương án, chế phẩm chất bổ sung cho thức ăn theo sáng chế làm tăng lượng của chất chống oxy hóa tuần hoàn (ví dụ, selen nằm trong máu và/hoặc huyết thanh) ở đối tượng nhận được chế phẩm này. Theo một số phương án, chế phẩm chất bổ sung cho thức ăn theo sáng chế làm tăng lượng của chất chống oxy hóa (ví dụ, selen nằm trong mô mỡ, cơ, v.v.) ở đối tượng nhận được chế phẩm này.

IV. Dược phẩm, chất dinh dưỡng, và chất bổ sung

Mức selen dinh dưỡng đã được FDA thiết lập (Xem 21 C.F.R. 101.9(c)(8)(iv), January 1994). Người và động vật có thể chuyển hóa một cách an toàn lượng hạn chế của cả dạng selen vô cơ và selen hữu cơ và có thể chuyển hóa selen không được metyl hóa thành dẫn xuất mono- hoặc di- hoặc trimetyl hóa, trong số đó dẫn xuất monometyl hóa là có tính độc nhất. (Xem, Bedwal, R. s., et al., Medical Hypotheses, 41 (2): 150-159 (August 1993)). FDA đã thông qua Mức hấp thụ hàng ngày chuẩn (RDI) là 70 microgam selen đối với phụ nữ đang cho con bú và RDI là 55 microgam đối với người trưởng thành không cho con bú. Liều lượng selen bằng 600 microgam cho mỗi ngày đã được báo cáo là an toàn. (Xem, Ferris G. M. Lloyd, et al., App. Clin. Biochem., 26:83-88 (1989). Ở khoảng liều lượng này, hoạt tính bình thường của enzym glutathion reductaza chuyển hóa một cách an toàn selenogluthation thành hydro selenua ở gan và hồng cầu và cuối cùng được bài tiết. Như vậy, ở các liều lượng thấp hơn như vậy, cơ thể có khả năng chuyển hóa an toàn và tiết selen mà có mặt ở dạng kim loại tự do. Tuy nhiên, như với nhiều yếu tố vết (ví dụ, selen), ở các mức hoặc nồng độ liều lượng lớn hơn, tác dụng có lợi bị làm đảo ngược và đặc tính độc nguy hiểm được biểu lộ. (Xem, chẳng hạn, Furnsinn, C. et al., Internat'l J. of Obesity and Related Metab. Dis., 19(7):458-463 (1995)).

Việc sử dụng selen ở dạng tự nhiên liên quan đến sự thỏa hiệp của khoa học và y tế vì, khi được sử dụng với nồng độ tương đối thấp, selen tạo ra tác dụng có lợi cho sức khỏe, tuy nhiên, ở nồng độ lớn hơn, selen thể hiện tính độc mạnh khiến cho lợi ích sức khỏe tiềm tàng bị mất và tính độc trở thành mối lo lắng chủ yếu.

Như được nêu trên đây, sáng chế đề xuất dạng selen nhất định (ví dụ, các SGP, selen hòa tan trong nước) mà tạo ra tác dụng có lợi cho đối tượng. Bằng chứng đã cho thấy rằng dạng selen hữu cơ (ví dụ, selenomethionin và nấm men được làm giàu selen)

có thể ít độc hơn và được hấp thụ tốt hơn so với các dạng vô cơ (Xem, Mahan, Proceedings of the 15th Annual Symposium Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 523-535 (1999)). Tuy nhiên, theo một số phương án, nhiều dạng selen được sử dụng trong hỗn hợp với dạng khác (ví dụ, để tạo ra tác dụng có lợi cho sức khỏe cho đối tượng). Nguồn tự nhiên của selen bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nấm men được làm giàu selen (ví dụ, được selen hóa). Chúng nấm men được sử dụng là không bị giới hạn.

Theo một số phương án ưu tiên nhất định của sáng chế, các SGP (ví dụ, thu được từ nấm men được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX), như được nêu trong Ví dụ 1-2) là dạng selen được chọn cho các công thức phối trộn và chế phẩm theo sáng chế. Theo một số phương án, chế phẩm chứa selen hòa tan trong nước và/hoặc các SGP tạo ra dạng có sẵn để dùng theo cách sinh học hơn của selen so với các dạng khác của selen. Tuy nhiên, các dạng khác của selen cũng có thể được sử dụng trong sáng chế bao gồm dẫn xuất hoặc các cải biến của selen hòa tan trong nước và/hoặc các SGP, SEL-PLEX, hoặc các dạng khác của nấm men được làm giàu selen, selenomethionin, selenoxystein, hợp chất selenit, hợp chất selenat, hoặc dẫn xuất, muối, hoặc các cải biến của chúng. Như vậy, theo một số phương án được ưu tiên, mỗi trong số các dạng này của selen có thể được sử dụng làm thành phần của chế phẩm. Theo cách khác, mỗi trong số các dạng nêu trên của selen có thể được liên kết (ví dụ, theo cách hóa học hoặc vật lý) với thuốc hoặc chất trị liệu để tạo thành dẫn xuất selen-thuốc. Ngoài ra, các chế phẩm và công thức phối trộn không bị giới hạn ở một dạng của selen. Trên thực tế, chế phẩm hoặc công thức phối trộn có thể chứa nhiều dạng của selen (ví dụ, các SGP và SEL-PLEX, hoặc Sod-sel và selen hòa tan trong nước).

Các dạng khác của selen được sử dụng trong các phương án khác nhau của sáng chế được mô tả trong US 6,911,550 6,197,295, 5,221,545, 6 và 6,576,233, và US 20010043925, 20050069594, 20050089530, và 20080107755, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Do đó, sáng chế đề xuất dược phẩm, chế phẩm dược phẩm dinh dưỡng, và/hoặc chế phẩm bổ sung (ví dụ, thực phẩm và/hoặc chế phẩm thức ăn hoặc điều trị) chứa một hoặc nhiều dạng của selen (ví dụ, các SGP, selen hòa tan (ví dụ, selen tan được trong nước), v.v.), một mình hoặc kết hợp với ít nhất một chất khác, như hợp chất làm ổn định, (các) chất trị liệu, (các) chất dinh dưỡng, và/hoặc các chất khoáng khác; và có thể được sử dụng trong chất mang tinh khiết, tương thích về mặt sinh học bất kỳ, bao gồm,

nhưng không giới hạn ở, nước muối, nước muối được đậm, dextroza, nước, v.v..

Các phương pháp theo sáng chế được sử dụng trong điều trị (ví dụ, phòng ngừa hoặc trị liệu) bệnh (ví dụ, bệnh thoái hóa thần kinh, ung thư, v.v.) hoặc làm thay đổi trạng thái sinh lý. Selen (ví dụ, selen hòa tan (ví dụ, selen hòa tan trong nước), các SGP))) có thể được sử dụng cho đối tượng (ví dụ, bệnh nhân) qua đường tĩnh mạch trong chất mang được dụng như nước muối sinh lý. Các phương pháp chuẩn để phân phối nội bào hợp chất có thể được sử dụng (ví dụ, phân phối thông qua liposom). Các phương pháp này là đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Các chế phẩm theo sáng chế là hữu ích để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, như theo đường tĩnh mạch, dưới da, trong cơ, và trong bụng. Theo một số phương án, chế phẩm (ví dụ, các SGP và/hoặc dược phẩm chứa chúng) được sử dụng qua đường miệng.

Như đã được biết rõ trong lĩnh vực y tế, liều lượng đối với một đối tượng bất kỳ có thể phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm cỡ khối của bệnh nhân, diện tích bề mặt cơ thể, độ tuổi, hợp chất cụ thể được sử dụng, giới tính, thời gian và đường dùng, tình hình sức khỏe chung, và tương tác với các thuốc khác đang được sử dụng đồng thời.

Do đó, theo một số phương án, chế phẩm và/hoặc công thức phối trộn chứa selen (ví dụ, selen hòa tan (ví dụ, selen hòa tan trong nước), các SGP, v.v.) được sử dụng cho đối tượng một mình, hoặc kết hợp với các dạng khác của selen, thuốc, các phân tử nhỏ, hoặc trong dược phẩm trong đó nó được trộn với (các) tá dược hoặc các chất mang được dụng khác. Theo một số phương án, chất mang được dụng là trợ về mặt dược học. Theo các phương án khác, chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hòa tan (ví dụ, selen hòa tan trong nước), các SGP, v.v.) được sử dụng một mình cho các đối tượng riêng rẽ mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh. Theo các phương án khác của sáng chế, chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hòa tan (ví dụ, selen hòa tan trong nước), các SGP, v.v.) được sử dụng một mình cho các đối tượng riêng rẽ để đẩy mạnh tình hình sức khỏe chung hoặc sức khỏe của hệ thống cơ thể. Chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hòa tan (ví dụ, selen hòa tan trong nước), các SGP, v.v.) một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều dạng khác của selen có thể được bổ sung vào đồ uống hoặc thực phẩm dinh dưỡng (ví dụ, ENSURE, POWERBAR, hoặc các loại tương tự), multi-vitamin, sản phẩm dinh dưỡng, sản phẩm thực phẩm, v.v. để tiêu thụ hàng ngày.

Tùy thuộc vào mục tiêu được tìm kiếm để được làm thay đổi bởi việc điều trị (ví

dự, sự biểu hiện gen có liên quan đến độ tuổi, và/hoặc sự điều hòa biểu hiện gen có liên quan đến ung thư và/hoặc sự phát triển và/hoặc di căn của khối u), các dược phẩm, chế phẩm bổ sung, và/hoặc dược phẩm dinh dưỡng này được bào chế và được sử dụng toàn thân hoặc cục bộ. Kỹ thuật để bào chế và sử dụng có thể được tìm thấy ấn bản mới nhất của "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Publishing Co, Easton Pa.). Các đường dùng thích hợp có thể, ví dụ, bao gồm sử dụng qua đường miệng hoặc qua niêm mạc; cũng như phân phối ngoài đường tiêu hóa, bao gồm trong cơ, dưới da, trong tủy sống, trong vỏ, trong não thất, theo đường tĩnh mạch, trong bụng, hoặc trong mũi.

Để tiêm, chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hòa tan (ví dụ, selen hòa tan trong nước), các SGP, v.v.) được bào chế trong dung dịch gốc nước, tốt hơn nếu là trong chất đệm tương thích về mặt sinh lý như dung dịch Hanks, dung dịch Ringer, hoặc nước muối được đệm sinh lý. Để sử dụng ở mô hoặc tế bào, chất xuyên thấu thích hợp với hàng rào cụ thể được cho phép sử dụng trong chế phẩm. Chất xuyên thấu như vậy thường đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo các phương án khác, chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hòa tan (ví dụ, selen hòa tan trong nước), các SGP, v.v.) được bào chế bằng cách sử dụng chất mang được dụng đã biết rõ trong lĩnh vực ở liều lượng thích hợp để sử dụng qua đường miệng. Chất mang như vậy làm cho chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hòa tan (ví dụ, selen hòa tan trong nước), các SGP, v.v.) có thể được phối trộn ở dạng viên nén, viên tròn, viên nang, chất lỏng, gel, xirô, huyền phù đặc, hỗn dịch và các dạng tương tự, để tiêu hóa qua đường miệng hoặc qua mũi bởi bệnh nhân cần được điều trị.

Dược phẩm thích hợp để sử dụng theo sáng chế bao gồm chế phẩm trong đó các thành phần hoạt tính (ví dụ, chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hòa tan (ví dụ, selen hòa tan trong nước), các SGP, v.v.) được chứa với lượng hữu hiệu để đạt được mục đích dự định. Ví dụ, lượng hữu hiệu của dược chất có thể là lượng làm thay đổi sự biểu hiện của gen đặc hiệu (ví dụ, KTLG, GRB2, DNAJ3, TGFB1, MAPK8, C1R, UBE4A, SMPX, USP22, và/hoặc PTP4A1). Việc xác định lượng hữu hiệu là thuộc khả năng của người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Sáng chế còn đề xuất các SGP phụ thuộc pH và các chế phẩm chứa chúng để sử dụng trong việc điều trị ngăn ngừa và/hoặc trị liệu ung thư (ví dụ, để ngăn ngừa hoặc làm chậm sự tiến triển và/hoặc di căn của ung thư/khối u). Ví dụ, theo một phương án

được ưu tiên, phân đoạn SGP phụ thuộc pH của nấm men được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX) được sử dụng cho đối tượng để điều hoà sự biểu hiện (ví dụ, theo cách mong muốn) của gen có liên quan đến sự phát triển và/hoặc di căn của ung thư). Như được nêu trong bản mô tả này, một số phân đoạn SGP hòa tan nhất định đã được xác định là có các tính chất sinh học (ví dụ, khả năng điều hòa sự biểu hiện gen) mà nguyên liệu gốc từ đó phân đoạn SGP hòa tan thu được (ví dụ, nấm men được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX)) không có (Xem, Ví dụ 4 và các Fig. 7-11). Theo một phương án được ưu tiên, phân đoạn SGP phụ thuộc pH của nấm men được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX) là phân đoạn phụ thuộc pH 4,0, mặc dù các phân đoạn khác (ví dụ, pH 3,0, pH 6,0, v.v.) cũng được sử dụng trong chế phẩm và phương pháp theo sáng chế.

Ngoài các thành phần hoạt tính, các dược phẩm chứa selen này (ví dụ, selen hòa tan (ví dụ, selen hòa tan trong nước), các SGP, v.v.) có thể chứa chất mang dược dụng thích hợp bao gồm tá dược và chất phụ trợ mà tạo điều kiện dễ dàng cho việc xử lý các hoạt chất thành chế phẩm mà có thể sử dụng được về mặt dược học. Chế phẩm được bào chế để sử dụng qua đường miệng có thể ở dạng viên nén, viên bọc đường, viên nang, hoặc dung dịch.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sản xuất theo cách đã biết (ví dụ, bằng các quy trình trộn, hòa tan, tạo hạt, tạo viên bọc đường, tán thành bột mịn, nhũ hóa, bao nang, bao hoặc sấy đông khô nhanh).

Dược phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch gốc nước của hoạt chất ở dạng hòa tan trong nước. Ngoài ra, hỗn dịch của hoạt chất có thể được điều chế dưới dạng hỗn dịch tiêm dạng dầu thích hợp. Các dung môi hoặc môi trường dẫn thuốc ưa mỡ thích hợp bao gồm dầu béo như dầu mè, hoặc este của axit béo tổng hợp, như etyl oleat hoặc triglycerit, hoặc liposom. Hỗn dịch tiêm chứa nước có thể chứa các chất mà làm tăng độ nhớt của hỗn dịch, như natri carboxymetyl xenluloza, sorbitol, hoặc dextran. Tùy ý, hỗn dịch có thể cũng chứa chất làm ổn định hoặc các chất thích hợp làm tăng khả năng hòa tan của hợp chất để cho phép điều chế dung dịch có độ đậm đặc cao.

Chế phẩm dược để sử dụng qua đường miệng có thể thu được bằng cách kết hợp hoạt chất với tá dược rắn, tùy ý nghiền hỗn hợp thu được, và xử lý hỗn hợp hạt, sau khi bổ sung chất phụ trợ thích hợp, nếu muốn, để thu được viên nén hoặc lõi của viên bọc đường. Tá dược thích hợp là hydrat cacbon hoặc chất độn protein như đường, bao gồm

lactoza, sucroza, manitol, hoặc sorbitol; tinh bột từ ngô, lúa mỳ, lúa gạo, khoai tây, v.v.; xenluloza như metyl xenluloza, hydroxypropylmetyl-xenluloza, hoặc natri carboxymetylxenluloza; và các gồm bao gồm arabic và tragacan; và protein như gelatin và collagen. Nếu muốn, chất làm phân rã hoặc chất làm hòa tan có thể được bổ sung vào, như polyvinyl pyrolidon được tạo liên kết ngang, thạch, axit alginic hoặc muối của chúng như natri alginat.

Lõi của viên bọc đường được cung cấp chất phù thích hợp như dung dịch đường đậm đặc, mà có thể cũng chứa gồm arabic, đá talc, polyvinylpyrolidon, gel carbopol, polyetylen glycol, và/hoặc titan dioxit, dung dịch sơn mài, và các dung môi hữu cơ thích hợp hoặc các hỗn hợp dung môi. Thuốc nhuộm hoặc chất màu có thể được bổ sung vào viên nén hoặc lớp bọc đường để nhận diện sản phẩm hoặc để xác định lượng hoạt chất, (tức là, liều lượng).

Chế phẩm được mà có thể được sử dụng qua đường miệng bao gồm viên nang lấp sít được làm từ gelatin, cũng như viên nang mềm, được bít kín được làm từ gelatin và lớp bọc như glyxerol hoặc sorbitol. Viên nang lấp sít có thể chứa các thành phần hoạt tính được trộn với chất độn hoặc chất kết dính như lactoza hoặc tinh bột, các chất bôi trơn như đá talc hoặc magie stearat, và tùy ý, chất làm ổn định. Trong viên nang mềm, hoạt chất có thể được hòa tan hoặc được tạo huyền phù trong chất lỏng thích hợp, như dầu béo, parafin lỏng, hoặc polyetylen glycol lỏng có hoặc không có chất làm ổn định.

Chế phẩm chứa hợp chất theo sáng chế được phối trộn trong chất mang được dụng có thể được điều chế, được đặt trong đồ chứa thích hợp, và được dán nhãn để điều trị các tình trạng bệnh đã nêu. Đối với chế phẩm hoặc công thức phối trộn chứa selen, tình trạng bệnh nêu trên nhãn có thể bao gồm việc điều trị tình trạng bệnh liên quan đến phòng ngừa hoặc điều trị triệu chứng bệnh hoặc tình trạng bệnh (ví dụ, ung thư, bệnh thoái hóa thần kinh và/hoặc chức năng nhận thức).

Dược phẩm có thể được cung cấp ở dạng muối và có thể được tạo thành với nhiều axit, bao gồm, nhưng không giới hạn ở axit clohydric, sulfuric, axetic, lactic, tarttric, malic, succinic, v.v.. Muối có xu hướng dễ tan hơn trong nước hoặc các dung môi proton khác mà là dạng bazơ tự do tương ứng. Trong các trường hợp khác, dạng bào chế được ưu tiên có thể là bột đông khô nhanh trong histidin 1mM-50 mM, sucroza 0,1%-2%, manitol 2%-7% ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,5 mà được kết hợp với dung

dịch đêm trước khi sử dụng.

Đối với hợp chất bất kỳ được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế, liều lượng có tác dụng điều trị có thể được ước lượng ban đầu từ thử nghiệm nuôi cấy tế bào. Sau đó, tốt hơn là, liều lượng có thể được bào chế trong mô hình động vật (cụ thể là, mô hình chuột) để đạt được khoảng nồng độ tuần hoàn mong muốn.

Liều lượng có tác dụng điều trị chỉ lượng mà cải thiện hoặc ngăn ngừa các triệu chứng của trạng thái hoặc tình trạng bệnh (ví dụ, thông qua việc biến đổi sự biểu hiện gen). Tính độc và hiệu quả trị liệu của các hợp chất như vậy có thể được xác định bằng các quy trình được phẩm chuẩn trong dịch nuôi cấy tế bào hoặc động vật thử nghiệm, ví dụ, để xác định LD₅₀ (liều lượng gây chết đối với 50% quần thể) và ED₅₀ (liều lượng trị liệu hiệu quả trong 50% quần thể). Tỷ lệ liều lượng giữa tác dụng gây độc và tác dụng trị liệu là chỉ số trị liệu, và nó có thể được biểu thị dưới dạng tỷ lệ LD₅₀/ED₅₀. Hợp chất mà thể hiện các chỉ số trị liệu lớn là được ưu tiên. Dữ liệu thu được từ các thử nghiệm nuôi cấy tế bào này và các nghiên cứu bổ sung ở động vật có thể được sử dụng trong việc bào chế hàng loạt liều lượng để sử dụng cho người. Liều lượng của các hợp chất này tốt hơn nếu nằm trong khoảng nồng độ tuần hoàn mà bao gồm ED₅₀ với ít hoặc không có độc tính. Liều lượng thay đổi trong khoảng này phụ thuộc vào dạng liều lượng được sử dụng, độ nhạy của bệnh nhân, và đường dùng.

Liều lượng chính xác có thể được chọn bởi đối tượng hoặc bác sĩ dựa trên bệnh nhân được điều trị. Liều lượng và việc sử dụng được điều chỉnh để tạo ra mức độ đủ của các gốc hoạt tính hoặc để duy trì hiệu quả mong muốn (ví dụ, làm thay đổi sự biểu hiện gen ở đối tượng). Các yếu tố bổ sung có thể được xem xét đến bao gồm mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh; độ tuổi, cân nặng, và giới tính của bệnh nhân; chế độ ăn, thời gian và tần suất sử dụng, (các) hỗn hợp thuốc, độ nhạy của phản ứng, và tính dung nạp/đáp ứng với trị liệu. Dược phẩm tác động lâu dài có thể được sử dụng mỗi 3 đến 4 ngày, mỗi tuần, hoặc một lần mỗi hai tuần hoặc một lần mỗi tháng phụ thuộc vào chu kỳ bán hủy và tốc độ thanh thải của chế phẩm cụ thể.

Theo một số phương án, selen (ví dụ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, các SGP, v.v.) được sử dụng ở liều lượng hàng ngày nằm trong khoảng từ 25 đến 600μg cho mỗi ngày (ví dụ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, và/hoặc SGP được sử dụng cho đối tượng theo cách sao cho cung cấp selen với lượng nằm trong khoảng từ 25 đến

600 μ g cho đối tượng mỗi ngày). Theo các phương án được ưu tiên, selen được sử dụng ở liều lượng hàng ngày với lượng nằm trong khoảng từ 50 đến 200 μ g mỗi ngày. Theo các phương án được ưu tiên khác, selen được sử dụng ở liều lượng hàng ngày nằm trong khoảng từ 100 đến 200 μ g cho mỗi ngày. Các liều lượng nằm ngoài khoảng 25 đến 600 μ g có thể được sử dụng. Theo một số phương án, liều đơn của selen (ví dụ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, các SGP, v.v.) được sử dụng một lần hàng ngày. Theo các phương án khác, 2, 3, 4 liều lượng, hoặc nhiều hơn có thể được sử dụng mỗi ngày (ví dụ, một lần vào buổi sáng và một lần vào buổi tối, hoặc một lần mỗi 4 đến 6 giờ). Ví dụ, theo một số phương án, selen (ví dụ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, các SGP, v.v.) được sử dụng cho đối tượng trong ba liều riêng biệt, nhiều hơn ba liều riêng biệt, hai liều riêng biệt, hoặc ít hơn hai liều riêng biệt. Theo một số phương án được ưu tiên, liều hàng ngày được sử dụng trong viên nang giải phóng theo thời gian. Theo một số phương án được ưu tiên, liều hàng ngày của selen nằm trong khoảng từ 25 đến 75 μ g (ví dụ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, các SGP, v.v.). Theo các phương án được ưu tiên khác, liều hàng ngày của selen bằng 200 μ g (ví dụ, selen hữu cơ, nấm men được selen hóa, SEL-PLEX, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, các SGP, v.v.).

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng theo nhiều cách, phụ thuộc vào việc điều trị cục bộ hay toàn thân được mong muốn và khu vực cần được điều trị. Việc sử dụng có thể là tại chỗ (bao gồm mắt và màng niêm mạc kể cả phân phối qua âm đạo và trực tràng), phổi (ví dụ, bằng cách hít hoặc bơm bột hoặc sol khí, kể cả bằng ống phun; trong khí quản, trong mũi, biểu mô và qua da), qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa. Việc sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm tiêm hoặc truyền theo đường tĩnh mạch, trong động mạch, dưới da, trong bụng hoặc trong cơ; hoặc việc sử dụng trong sọ, ví dụ, trong vỏ hoặc trong não thất. Chế phẩm và công thức phối trộn chứa selen được tin là đặc biệt là hữu ích để sử dụng qua đường miệng.

Công thức phối trộn và chế phẩm dược, dược phẩm dinh dưỡng, và/hoặc chế phẩm bổ sung chứa selen (ví dụ, chứa SGP) để sử dụng tại chỗ có thể bao gồm miếng dán qua da, thuốc mỡ, kem lỏng, kem, gel, thuốc nước, thuốc đạn, thuốc phun, chất lỏng và bột. Chất mang dược thông thường, nền chứa nước, dạng bột hoặc dạng dầu, chất làm đặc và các chất tương tự có thể là cần thiết hoặc mong muốn.

Chế phẩm và công thức phối trộn để sử dụng qua đường miệng bao gồm bột hoặc hạt, hỗn dịch hoặc dung dịch trong nước hoặc môi trường không chứa nước, viên nang,

túi hoặc viên nén. Chất làm đặc, chất tạo hương, chất pha loãng, chất nhũ hóa, chất trợ phân tán hoặc chất kết dính có thể được bổ sung nếu mong muốn.

Chế phẩm và công thức phối trộn để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, trong vỏ hoặc trong nảo thất có thể bao gồm dung dịch gốc nước tinh khiết mà có thể cũng chứa chất đệm, chất pha loãng và các chất phụ gia thích hợp khác như, nhưng không giới hạn ở, chất tăng cường tính thấm, hợp chất chất mang và các chất mang hoặc tá dược được dụng khác.

Như vậy, theo một số phương án, dược phẩm, dược phẩm dinh dưỡng, và/hoặc chế phẩm bổ sung theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dung dịch, nhũ tương, và chế phẩm chứa liposom. Các chế phẩm này có thể được tạo ra từ nhiều thành phần bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất lỏng đã được tạo hình trước, chất rắn tự nhũ hóa và chất bán rắn tự nhũ hóa.

Dược phẩm, dược phẩm dinh dưỡng, và/hoặc chế phẩm bổ sung theo sáng chế, mà có thể có mặt thuận tiện ở dạng liều lượng đơn vị, có thể được bào chế theo các kỹ thuật thông thường đã biết rõ trong ngành công nghiệp dược phẩm. Các kỹ thuật này bao gồm bước cho các thành phần hoạt tính tiếp xúc với (các) chất mang hoặc (các) tá dược dùng trong dược phẩm. Nhìn chung, chế phẩm được điều chế bằng cách cho các thành phần hoạt tính tiếp xúc đồng đều và kỹ với chất mang lỏng hoặc chất mang rắn đã được nghiền mịn hoặc cả hai, và sau đó, nếu cần, tạo hình sản phẩm.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP) theo sáng chế có thể được bào chế thành dạng liều lượng bất kỳ trong số nhiều dạng liều lượng có thể có như, nhưng không giới hạn ở, viên nén, viên nang, xi rô lỏng, gel mềm, thuốc đạn, và chất lỏng dùng để thụ. Chế phẩm theo sáng chế cũng có thể được phối trộn ở dạng các hạt nano giải phóng theo thời gian (ví dụ, viên nang nano), bọt, liposom, polyme (ví dụ, polyme được khắc phân tử (MIP), polyme giải phóng chậm có khả năng phân hủy sinh học, polyme dạng polycation, v.v.. Chế phẩm theo sáng chế cũng có thể được phối trộn ở dạng hỗn dịch trong môi trường trong nước, không chứa nước hoặc môi trường hỗn hợp. Hỗn dịch trong nước có thể chứa thêm các chất mà làm tăng độ nhớt của hỗn dịch bao gồm, ví dụ, natri carboxymetylxenluloza, sorbitol và/hoặc dextran. Hỗn dịch có thể cũng chứa chất làm ổn định. Theo một phương án của sáng chế, dược phẩm, và/hoặc chế phẩm bổ sung có thể được bào chế và được sử

dạng dưới dạng bột. Bột bao gồm chế phẩm như, nhưng không giới hạn ở, nhũ tương, vi nhũ tương, kem, thạch và liposom. Mặc dù gần như tương tự về tính chất, các chế phẩm này khác nhau về thành phần và độ đặc của thành phẩm.

Chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, v.v.) theo sáng chế ngoài ra có thể chứa các thành phần phụ thêm khác thường được tìm thấy trong dược phẩm. Như vậy, ví dụ, chế phẩm có thể chứa các nguyên liệu bổ sung có hoạt tính về mặt dược học, tương thích, như, ví dụ, chất trị ngứa, chất làm se, chất gây tê cục bộ hoặc các chất kháng viêm, hoặc có thể chứa nguyên liệu bổ sung có thể sử dụng trong phối trộn vật lý các dạng liều lượng khác nhau của chế phẩm theo sáng chế, như thuốc nhuộm, chất tạo hương, chất bảo quản, chất chống oxy hóa, chất làm mờ, chất làm đặc và chất làm ổn định. Tuy nhiên, các nguyên liệu này, khi được bổ sung, phải không cản trở quá mức hoạt tính sinh học của các thành phần của chế phẩm theo sáng chế. Chế phẩm có thể được làm vô trùng và nếu muốn, được trộn với chất phụ trợ, ví dụ, các chất bôi trơn, chất bảo quản, chất làm ổn định, chất thẩm ướt, chất nhũ hóa, muối để tác động đến áp suất thẩm thấu, chất đệm, chất tạo màu, chất tạo hương và/hoặc chất thơm và các chất tương tự mà không tương tác theo cách có hại với (các) axit nucleic của chế phẩm.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm, dược phẩm dinh dưỡng, và/hoặc chế phẩm bổ sung chứa (a) một hoặc nhiều dạng của selen (ví dụ, SGP (ví dụ, phân đoạn SGP phụ thuộc pH), selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SEL-PLEX) và (b) một hoặc nhiều chất khác (ví dụ, chất dinh dưỡng, chất khoáng, chất trị liệu, v.v.).

Sáng chế còn bao gồm các phương pháp có liên quan đến việc đồng sử dụng các hợp chất chứa selen (ví dụ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, v.v.) được mô tả trong bản mô tả này với một hoặc nhiều chất có hoạt tính bổ sung (ví dụ, chất trị liệu (ví dụ, chất trị liệu ung thư, chất trị liệu bệnh Alzheimer), chất chống oxy hóa, v.v.). Trên thực tế, khía cạnh khác của sáng chế đề xuất các phương pháp để tăng cường các trị liệu và/hoặc dược phẩm, dược phẩm dinh dưỡng, và/hoặc chế phẩm bổ sung bằng cách đồng sử dụng chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP (ví dụ, phân đoạn SGP phụ thuộc pH), v.v.) theo sáng chế với dược phẩm để ngăn ngừa hoặc trị liệu, dược phẩm dinh dưỡng và/hoặc chất bổ sung. Trong các quy trình đồng sử dụng, các chất có thể được sử dụng đồng thời hoặc liên tiếp. Theo một phương án, hợp chất được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trước (các) chất có hoạt tính

khác. Chế phẩm và cách thức sử dụng có thể là bất kỳ trong số các chế phẩm và cách thức sử dụng được nêu trên đây. Ngoài ra, hai hoặc nhiều đồng chất được đồng sử dụng, mỗi chất có thể được sử dụng bằng cách sử dụng các cách thức khác nhau hoặc các chế phẩm khác nhau. Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế được đồng sử dụng với việc điều trị ung thư.

Do đó, theo một số phương án, chế phẩm chứa một hoặc nhiều dạng của selen (ví dụ, SGP (ví dụ, phân đoạn SGP phụ thuộc pH), selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SEL-PLEX) được sử dụng toàn thân hoặc cục bộ để ức chế sự tăng sinh tế bào khối u và sự hình thành mạch, và/hoặc gây chết tế bào khối u ở các bệnh nhân bị ung thư. Ví dụ, theo một số phương án, chế phẩm chứa phân đoạn SGP phụ thuộc pH (pH 4,0) của nấm men được làm giàu selen (ví dụ, SEL-PLEX) được sử dụng cho đối tượng trong điều kiện sao cho sự biểu hiện của một hoặc nhiều gen có liên quan đến ung thư/sự phát triển và/hoặc di căn của khối u được điều hòa (ví dụ, được điều hòa tăng hoặc được điều hòa giảm) theo cách có lợi ở đối tượng (Xem Ví dụ 4). Chế phẩm có thể được sử dụng qua đường tĩnh mạch, trong vỏ, trong bụng cũng như qua đường miệng. Ngoài ra, chúng có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các thuốc chống tăng sinh khác.

Khi hỗn hợp được dự định, dự định rằng sáng chế không bị giới hạn bởi tính chất cụ thể của hỗn hợp. Sáng chế bao gồm các hỗn hợp dưới dạng các hỗn hợp đơn giản cũng như các thể lai hóa học. Ví dụ về thể lai hóa học là thể lai trong đó chế phẩm chứa một hoặc nhiều dạng của selen được liên kết cộng hóa trị với chất mang đích hoặc với chất có được tính. Việc liên kết cộng hóa trị có thể được thực hiện bởi bất kỳ một trong số nhiều hợp chất liên kết ngang có sẵn trên thị trường.

Dự định rằng sáng chế không bị giới hạn ở tính chất cụ thể của chế phẩm trị liệu. Ví dụ, chế phẩm như vậy có thể được tạo ra cùng với chất lỏng có khả năng dung nạp về mặt sinh lý, gel hoặc chất mang rắn, chất pha loãng, chất phụ trợ và tá dược.

Các chế phẩm trị liệu như vậy có thể được sử dụng cho động vật có vú để sử dụng trong thú y, như với động vật được nuôi trong nhà hoặc trong trang trại, và sử dụng lâm sàng ở người theo cách tương tự với các chất trị liệu khác. Nhìn chung, liều lượng cần cho hiệu quả trị liệu sẽ thay đổi theo loại sử dụng và cách thức sử dụng, cũng như các yêu cầu cụ thể của các vật chủ riêng rẽ.

Chế phẩm như vậy thường được bào chế dưới dạng dung dịch hoặc hỗn dịch lỏng,

hoặc ở dạng chất rắn. Chế phẩm dùng qua đường miệng cho bệnh ung thư thường sẽ bao gồm các chất phụ gia thường được sử dụng như vậy như các chất kết dính, chất độn, chất mang, chất bảo quản, các chất ổn định, chất nhũ hóa, chất đệm và tá dược như, ví dụ, loại dùng trong dược phẩm của manitol, lactoza, tinh bột, magie stearat, natri sacarin, xenluloza, magie cacbonat, và các chất tương tự. Các chế phẩm này ở dạng dung dịch, hỗn dịch, viên nén, viên tròn, viên nang, chế phẩm giải phóng kéo dài, hoặc bột, và thường chứa 1%-95% thành phần hoạt tính, tốt hơn nếu là 2%-70%.

Chế phẩm cũng được bào chế dưới dạng dung dịch tiêm được, hoặc là dung dịch hoặc hỗn dịch lỏng; dạng rắn thích hợp cho dung dịch trong, hoặc hỗn dịch trong, chất lỏng trước khi tiêm cũng có thể được bào chế.

Chế phẩm theo sáng chế thường được trộn với chất pha loãng hoặc tá dược mà dung nạp và tương thích về mặt sinh lý. Chất pha loãng và tá dược thích hợp, ví dụ, nước, nước muối, dextroza, glyxerol, hoặc các chất tương tự, và hỗn hợp của chúng. Ngoài ra, nếu muốn, chế phẩm có thể chứa lượng nhỏ của các chất phụ gia như chất thẩm ướt hoặc chất nhũ hóa, chất làm ổn định hoặc chất đệm độ pH.

Nhiều chất trị liệu có thể được sử dụng trong sáng chế. Ví dụ, chất trị liệu bất kỳ mà có thể được đồng sử dụng với chế phẩm chứa một hoặc nhiều dạng của selen theo sáng chế là thích hợp để sử dụng trong sáng chế.

Một số phương án của sáng chế đề xuất việc sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa một hoặc nhiều dạng của selen và ít nhất một chất chống ung thư (ví dụ, chất chống ung thư thông thường, như, các thuốc hóa trị liệu, và/hoặc trị liệu chiếu xạ).

Cơ chế của chất chống ung thư thích hợp để sử dụng cùng với sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất gây chết tế bào theo chương trình, chất cảm ứng/gây ra sự tổn thương axit nucleic, chất ức chế quá trình tổng hợp axit nucleic, chất ảnh hưởng đến sự tạo thành vi cấu trúc hình ống, và chất ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp protein hoặc độ ổn định của protein.

Lớp chất chống ung thư thích hợp để sử dụng trong chế phẩm và phương pháp theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở: 1) alkaloit, bao gồm, các chất ức chế vi cấu trúc hình ống (ví dụ, Vincristin, Vinblastin, và Vindesin, v.v.), chất làm ổn định vi cấu trúc hình ống (ví dụ, Paclitaxel (Taxol), và Docetaxel, v.v.), và chất ức chế chức

năng chất nhuộm sắc, bao gồm, chất ức chế topoisomeraza, như, epipodophyllotoxin (ví dụ, Etoposide (VP-16), và Teniposide (VM-26), v.v.), và chất nhắm đích topoisomeraza I (ví dụ, Camptothecin và Irinotecan (CPT- 11), v.v.); 2) chất liên kết ADN cộng hóa trị (chất alkyl hóa), bao gồm, mù tạc nitơ (ví dụ, Mechlorethamin, Chlorambuxil, Xyclophosphamid, Ifosphamid, và Busulfan (Myleran), v.v.), nitrosoure (ví dụ, Carmustin, Lomustin, và Semustin, v.v.), và các chất alkyl hóa khác (ví dụ, Dacarbazin, Hydroxymetylmelamin, Thiotepa, và Mitocycin, v.v.); 3) chất liên kết ADN không cộng hóa trị (chất kháng sinh kháng khối u), bao gồm, các chất ức chế axit nucleic (ví dụ, Dactinomycin (Actinomycin D), v.v.), anthracyclin (ví dụ, Daunorubicin (Daunomycin, và Cerubidin), Doxorubicin (Adriamycin), và Idarubicin (Idamycin), v.v.), anthracenedion (ví dụ, chất tương tự anthracyclin, như, (Mitoxantron), v.v.), bleomycin (Blenoxan), v.v., và plicamycin (Mithramycin), v.v.; 4) chất chống chuyển hóa, bao gồm, antifolat (ví dụ, Methotrexat, Folex, và Mexat, v.v.), chất chống chuyển hóa purin (ví dụ, 6-Mercaptopurin (6-MP, Purinhol), 6-Thioguanin (6-TG), Azathioprin, Acyclovir, Ganciclovir, Chlorodeoxyadenosin, 2-Chlorodeoxyadenosin (CdA), và 2'-Deoxycoformycin (Pentostatin), v.v.), chất đối kháng pyrimidin (ví dụ, flopyrimidin (ví dụ, 5-flouraxil (Atracil), 5- flodeoxyuridin (FdUrd) (Floxuridin)) v.v.), và xytosin arabinosit (ví dụ, Cytosar (ara-C) và Fludarabin, v.v.); 5) enzym, bao gồm, L-asparaginaza, và hydroxyure, v.v.; 6) hormon, bao gồm, glucocorticoit, như, antiestrogen (ví dụ, Tamoxifen, v.v.), antiandrogen không phải steroid (ví dụ, Flutamat, v.v.), và các chất ức chế aromataza (ví dụ, anastrozol (Arimidex), v.v.); 7) hợp chất platin (ví dụ, Xisplatin và Carboplatin, v.v.); 8) kháng thể đơn dòng được liên hợp với các thuốc chống ung thư, các độc tố, và/hoặc nuclit phóng xạ, v.v.; 9) các chất biến đổi đáp ứng sinh học (ví dụ, interferon (ví dụ, IFN- α , v.v.) và interleukin (ví dụ, IL-2, v.v.), v.v.); 10) các chất trị liệu miễn dịch đã được thông qua; 11) yếu tố tăng trưởng tạo huyết; 12) chất kích thích sự biệt hóa tế bào khối u (ví dụ, axit all-trans-retinoic, v.v.); 13) kỹ thuật trị liệu gen; 14) kỹ thuật trị liệu đối nghĩa; 15) các vacxin chống khối u; 16) các trị liệu được hướng chống lại sự di căn của khối u (ví dụ, Batimistat, v.v.); và 17) các chất ức chế sự hình thành mạch khác.

Theo các phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất việc dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa một hoặc nhiều dạng của selen theo sáng chế và ít nhất một chất chống ung thư thông thường mà kích thích sự chết tế bào theo chương trình và/hoặc

ngăn ngừa sự tăng sinh tế bào ung thư cho đối tượng. Theo một số phương án được ưu tiên, đối tượng có bệnh được đặc trưng bởi sự di căn. Theo các phương án được ưu tiên khác, sáng chế đề xuất việc dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa một hoặc nhiều dạng của selen và taxan (ví dụ, Docetaxel) cho đối tượng có bệnh được đặc trưng bởi sự biểu hiện quá mức của (các) protein họ Bcl-2 (ví dụ, Bcl-2 và/hoặc Bcl-X_L).

Taxan (ví dụ, Docetaxel) là lớp chất hóa trị liệu chống ung thư hiệu quả. (Xem, ví dụ, K. D. Miller and G. w. Sledge, Jr. *Cancer Investigation*, 17:121-136 (1999)). Mặc dù dự định rằng sáng chế không bị giới hạn ở cơ chế cụ thể bất kỳ, sự chế tế bào do taxan gây ra được tin là diễn ra thông qua việc làm ổn định vi cấu trúc hình ống gian bào và sự kích thích tiếp theo con đường gây chết tế bào theo chương trình. (Xem, ví dụ, s. Haldar et al., *Cancer Research*, 57:229-233 (1997)). Theo một số phương án khác, xisplatin và taxol được cụ thể bao gồm để sử dụng với chế phẩm chứa một hoặc nhiều dạng của selen theo sáng chế. Theo một số phương án, dược phẩm bất kỳ thường được sử dụng trong trị liệu ung thư được sử dụng theo sáng chế. Chất chống ung thư thông thường thích hợp để sử dụng với chế phẩm chứa một hoặc nhiều dạng của selen theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, adriamycin, 5-flouraxil, etoposid, camptothecin, methotrexat, actinomycin-D, mitomycin C, hoặc tốt hơn nữa nếu là, xisplatin. Theo một số phương án theo sáng chế, điều trị trị liệu còn bao gồm một hoặc nhiều chất mà liên kết ngang trực tiếp với axit nucleic (ví dụ, ADN) để tạo điều kiện cho việc gây tổn hại ADN dẫn đến chất hiệp đồng, chống ung thư theo sáng chế. Ví dụ, chất như xisplatin, và các chất alkyl hóa ADN khác có thể được sử dụng. Chất làm tổn hại ADN còn bao gồm hợp chất mà cản trở sự tái bản của ADN, sự gián phân, và sự kết tập của nhiễm sắc thể. Các hợp chất hóa trị liệu như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, adriamycin, còn được biết dưới tên doxorubicin, etoposid, verapamil, podophyllotoxin, và các chất tương tự. Các hợp chất này được sử dụng rộng rãi trong môi trường lâm sàng để điều trị ung thư, và được sử dụng bằng cách tiêm liều lớn qua đường tĩnh mạch ở các liều lượng nằm trong khoảng từ 25-75 M² tại các khoảng thời gian cách nhau 21 ngày đối với adriamycin, đến 35-50 Mg/M² đối với etoposid qua đường tĩnh mạch hoặc gấp đôi liều lượng trong tĩnh mạch qua đường miệng.

Chất phá vỡ quá trình tổng hợp và độ chính xác của tiền chất và các cấu trúc siêu phân tử nucleic axit cũng dẫn đến sự tổn hại ADN và được sử dụng làm chất hóa trị liệu trong sáng chế. Nhiều tiền chất axit nucleic đã được phát triển. Đặc biệt hữu ích là các

chất mà đã được thử nghiệm sâu rộng và có sẵn một cách dễ dàng. Như vậy, chất như 5-flouraxil (5-FU) được sử dụng ưu tiên bởi các mô khối u, làm cho chất này đặc biệt hữu ích để nhắm đích các tế bào khối u. Liều lượng được phân phối có thể nằm trong khoảng từ 3 đến 15 mg/kg/ngày, mặc dù các liều lượng khác có thể thay đổi đáng kể theo nhiều yếu tố bao gồm giai đoạn của bệnh, tính dễ xử lý của các tế bào được trị liệu, mức độ kháng đối với các chất và các yếu tố tương tự.

Theo các phương án được ưu tiên, chất chống ung thư (ví dụ, yếu tố chống hình thành mạch được bàn luận trong bản mô tả này) được sử dụng trong sáng chế là những chất có thể được đồng sử dụng với chế phẩm chứa một hoặc nhiều dạng của selen hoặc theo cách khác được kết hợp với chế phẩm chứa một hoặc nhiều dạng của selen sao cho chúng có thể được phân phối vào đối tượng, mô, hoặc tế bào mà không gây tổn hại đến độ chính xác của tác dụng chống ung thư. Để mô tả chi tiết hơn về các chất trị liệu ung thư như phức hợp platin, verapamil, podophyllotoxin, carboplatin, procarbazine, mechlorethamine, cyclophosphamide, camptothecin, ifosfamide, melphalan, chlorambucil, bisulfan, nitrosure, adriamycin, dactinomycin, daunorubicin, doxorubicin, bleomycin, plicomycin, mitomycin, etoposide (VP16), tamoxifen, taxol, transplatin, 5-flouraxil, vincristin, vinblastin và methotrexate và các chất chống ung thư tương tự khác, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể tham khảo nhiều tài liệu hướng dẫn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Physician's Desk reference và Goodman and Gilman's "Pharmaceutical Basis of Therapeutics" ninth edition, Eds. Hardman et al., 1996.

V. Chất chống oxy hóa

Theo một số phương án theo sáng chế, chất chống oxy hóa được đồng sử dụng với chế phẩm hoặc công thức phối trộn theo sáng chế. Sáng chế không bị giới hạn bởi loại của chất chống oxy hóa được sử dụng. Trên thực tế, nhiều chất chống oxy hóa được dự định có thể sử dụng trong sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, diphenylamine được alkyl hóa, phenyldiamine được N-alkyl hóa, phenyl-.alpha.-naphthylamine, phenyl-.alpha.-naphthylamine được alkyl hóa, dimethyl quinoline, trimetyldihydroquinoline và chế phẩm oligome thu được từ đó, phenolic không tự do, hydroquinone được alkyl hóa, thioldiphenyl ete được hydroxyl hóa, alkylidenbisphenol, thiopropionate, dithiocarbamate kim loại, 1,3,4-dimercaptothiadiazole và dẫn xuất, hợp chất đồng hòa tan trong dầu, và các hợp chất tương tự, Naugalube.RTM. 438, Naugalube 438L, Naugalube 640, Naugalube 635, Naugalube 680, Naugalube AMS, Naugalube APAN, Naugard PANA,

Naugalube TMQ, Naugalube 531, Naugalube 431, Naugard BHT, Naugalube 403, và Naugalube 420, axit ascorbic, tocopherol bao gồm alpha-tocopherol, chất chống oxy hóa hòa tan trong nước như hợp chất sulfhydryl và dẫn xuất của chúng (ví dụ, natri metabisulfite và N-acetyl-cysteine), axit lipoic và axit dihydrolipoic, resveratrol, lactoferrin, dẫn xuất axit ascorbic (ví dụ, ascorbyl palmitat và ascorbyl polypeptit), hydroxytoluen được butylat hóa, retinoit (ví dụ, retinol và retinyl palmitat), tocotrienol, ubiquinon, chất chiết chứa flavonoid và isoflavonoid và dẫn xuất của chúng (ví dụ, genistein và diadzein), chất chiết chứa resveratrol và các chất tương tự, hạt nho, màu chàm xanh, vỏ cây thông, keo ong, Irganox1010, 1035, 1076, 1222 (được sản xuất bởi Ciba Specialty Chemicals Co., Ltd.), Antigene p, 3C, FR, Sumilizer GA-80 (được sản xuất bởi Sumitomo Chemical Industries Co., Ltd.), beta-caroten, lycopene, vitamin C, E, và A, và các chất khác.

Mặc dù việc hiểu cơ chế là không cần thiết để thực hiện sáng chế và sáng chế không bị giới hạn ở cơ chế tác động cụ thể bất kỳ, theo một số phương án, việc sử dụng chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hòa tan, SGP) cho đối tượng làm thay đổi profin biểu hiện gen (ví dụ, TGFB1, MAPK8, C1R, UBE4A, SMPX, USP22, và PTP4A1) ở đối tượng. Theo một số phương án, việc sử dụng chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hòa tan, SGP) cho đối tượng làm giảm mức hư hại ADN (ví dụ, trong mô não (ví dụ, lớp vỏ não mới), mô cơ, mô mỡ, v.v.) của đối tượng.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm độ nhạy của các tế bào với tính gây độc tế bào của H_2O_2 bao gồm sử dụng cho tế bào chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.).

Sáng chế còn đề xuất phương pháp làm giảm gốc superoxit ở đối tượng (ví dụ, ở đối tượng trải qua áp lực oxy hóa) bao gồm sử dụng chế phẩm (ví dụ, chất bổ sung dinh dưỡng) chứa selen (ví dụ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.) cho đối tượng. Ngoài ra, theo một số phương án, sáng chế đề xuất rằng đối tượng nhận được chế phẩm chứa selen nhất định (ví dụ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.) được tăng cường khả năng đối phó với áp lực oxy hóa. Mặc dù việc hiểu cơ chế là không cần thiết để thực hiện sáng chế và sáng chế không bị giới hạn ở cơ chế tác động bất kỳ, theo một số phương án, đối tượng nhận được chế phẩm chứa selen (ví dụ, chất bổ sung cho thức ăn chứa selen (ví dụ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.)) được tăng cường khả năng đối phó với áp lực oxy

hóa do khả năng lựa chọn dạng của selen (ví dụ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.) để làm thay đổi (ví dụ, làm giảm) mức độ của gốc superoxit ở đối tượng.

Dự định rằng chế phẩm và phương pháp theo sáng chế sẽ được sử dụng trong nhiều môi trường khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nghiên cứu và các chẩn đoán lâm sàng.

VI. Chất mang

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất việc phân phối selen (ví dụ, selenoglycoprotein) thông qua một hoặc nhiều chất mang bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các hạt nano (ví dụ, viên nang nano), bong, liposom, polyme (ví dụ, polyme được khắc phân tử (MIP), polyme giải phóng chậm, polyme dạng polycation, và/hoặc polymerosom. Theo một số phương án, chất mang selen tạo ra việc sử dụng, nhắm đích, và/hoặc giải phóng theo thời gian hợp chất chứa selen (ví dụ, selen hòa tan trong nước, SGP) ở đối tượng (ví dụ, người hoặc động vật). Theo một số phương án, chất mang (ví dụ, polyme giải phóng chậm, viên nang nano, MIP, polymerosom, v.v.) tăng cường sự phân phối của hợp chất chứa selen (ví dụ, selen hữu cơ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.) cho đối tượng. Theo một số phương án, chất mang (ví dụ, polyme giải phóng chậm, viên nang nano, MIP, polymerosom, v.v.) làm tăng độ sinh khả dụng của hợp chất chứa selen (ví dụ, selen hữu cơ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.) cho đối tượng.

Sáng chế không bị giới hạn bởi loại chất mang được sử dụng. Trên thực tế nhiều chất mang có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dendrime, polymerosom, hạt nano, polyme giải phóng chậm, viên nang nano, polyme được khắc phân tử và/hoặc các loại chất mang khác (ví dụ, chất mang bất kỳ trong số các chất mang được mô tả trong bản mô tả này). Theo một phương án được ưu tiên, chất mang là polyme giải phóng chậm. Theo phương án được ưu tiên khác, chất mang là polyme được khắc phân tử. Theo phương án được ưu tiên khác nữa, chất mang là polymersom được sử dụng để bao nang selenoglycoprotein. Sáng chế không bị giới hạn bởi loại polymersom được sử dụng. Trên thực tế, polymersom bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng. Theo một số phương án, polymersom bao gồm copolyme khối poly(etylen oxit) (PEO). Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn bởi copolyme khối

này. Copolyme khối bất kỳ đã biết có thể được sử dụng, bao gồm, ví dụ, poly(etylen) (PEE), poly(butadien) (PB hoặc PBD), poly(styren) (PS), và poly(isopren) (PI). Theo một số phương án, polyme bao gồm copolyme hai khối poly(ϵ -caprolacton) (PCL). Theo một số phương án, polymersom bao gồm copolyme hai khối gốc poly(etylen oxit)-khối-poly(ϵ -caprolacton) (PEO-b-PCL). Theo một số phương án, polymersom bao gồm copolyme khối mà là copolyme khối ba khối, bốn khối, năm khối, hoặc ít nhất sáu khối. Theo một số phương án, polymersom thu được từ việc liên hợp poly(axit lactic), poly(glycolit), poly(axit lactic-coglycolic) và/hoặc poly(3-hydroxybutyrat) với PEO. Sáng chế không bị giới hạn bởi kích thước của selenoglycoprotein được bao nang bằng polymersom. Nhiều kích thước được sử dụng trong chế phẩm và phương pháp theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, selenoglycoprotein được bao nang bằng polymersom mà có đường kính khoảng, 50-300 nm mặc dù selenoglycoprotein được bao nang bằng polymersom có đường kính lớn hơn (ví dụ, khoảng 350 nm, 400 nm, 500 nm hoặc lớn hơn) và nhỏ hơn (ví dụ, khoảng 40 nm, 30 nm, 20 nm, hoặc nhỏ hơn) có thể được sử dụng.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất viên nang nano và khối cầu MIP giải phóng có kiểm soát SGP để tạo ra nguồn cung cấp selen hữu cơ ổn định và an toàn (ví dụ, polyme được khắc phân tử (MIP), polyme giải phóng chậm, v.v.) so với các dạng khác của selen (ví dụ, nấm men được làm giàu selen, SEL-PLEX, hoặc selen vô cơ dạng liều đơn, viên nang hoặc viên tròn). Theo một số phương án, selen hòa tan trong nước, selen hòa tan, và/hoặc các SGP được sử dụng để bao nang và phân phối selen hiệu quả thông qua các phương pháp phân phối tiên tiến trong bản mô tả này (ví dụ, các hạt nano (ví dụ, viên nang nano), bong, polyme (ví dụ, polyme được khắc phân tử (MIP), polyme giải phóng chậm, v.v.), và/hoặc polymerosom). Theo một số phương án, các phương pháp phân phối tiên tiến trong bản mô tả này tăng cường độ sinh khả dụng của selen đã được bao nang (ví dụ, các SGP hoặc selen hòa tan). Theo một số phương án, các phương pháp phân phối tiên tiến trong bản mô tả này tạo ra sự giải phóng chậm (ví dụ, 12 giờ, 24 giờ, 2 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 10 tuần, v.v.) của selen vào dung dịch, đối tượng, huyết thanh, v.v..

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất polyme giải phóng chậm làm chất mang cho chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hữu cơ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, v.v.) theo sáng chế. Polyme giải phóng chậm, như poly(axit lactic-axit co-glycolic)

(PLGA), hoặc polyme dạng polycation, như, polyetylenimin (PEI), có thể được sử dụng làm chất mang. Theo một số phương án, polyme giải phóng chậm tạo ra sự phân phối có kiểm soát chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hữu cơ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.). Theo một số phương án, sự phân phối có kiểm soát xảy ra khi polyme (ví dụ, PEI), dù là tự nhiên hay tổng hợp, được kết hợp một cách cẩn thận với chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hữu cơ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.) và tùy ý các chất có hoạt tính hoặc không có hoạt tính khác theo cách sao cho chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hữu cơ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.) được giải phóng từ nguyên liệu theo cách đã được thiết kế sẵn. Sự giải phóng chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hữu cơ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.) có thể là không đổi trong khoảng thời gian dài, nó có thể là sự giải phóng theo chu kỳ trong khoảng thời gian dài, hoặc nó có thể được khởi phát bởi môi trường hoặc các biến cố bên ngoài khác. Theo một số phương án, việc kiểm soát phân phối tạo ra sự trị liệu hiệu quả hơn. Theo một số phương án, việc kiểm soát phân phối làm loại bỏ nguy cơ tiềm năng đối với cả việc định liều dưới ngưỡng hoặc định quá liều. Các ưu điểm khác của việc sử dụng hệ phân phối có kiểm soát có thể bao gồm việc duy trì mức selen trong khoảng mong muốn, yêu cầu về số lần sử dụng ít hơn, và sự ung thuận của bệnh nhân tăng.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất polymerosom làm chất mang cho chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hữu cơ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.) theo sáng chế. Theo một số phương án, polymersom được tạo ra bằng cách sử dụng copolyme khối tổng hợp amphiphil để tạo thành màng bọt, và có bán kính nằm trong khoảng từ khoảng 50 nm đến khoảng 10 μ m hoặc lớn hơn (Xem, Discher et al. Journal of Physical Chemistry B (2002), 106(11), 2848-2854), tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Theo một số phương án, polymersom chứa dung dịch gốc nước trong lõi của chúng và hữu ích để bao nang và bảo vệ phân tử, như chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hữu cơ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.) và tùy ý một hoặc nhiều thuốc, enzym, các protein và peptit khác, và mảnh ADN và ARN. Theo một số phương án, màng polymersom tạo ra rào cản vật lý mà cách ly nguyên liệu đã được bao nang với nguyên liệu bên ngoài, như các nguyên liệu được tìm thấy trong hệ thống sinh học. Theo một số phương án, polymerosom cho phép sự giải phóng được định thời gian của các hàm lượng trong lõi của chúng (ví dụ,

chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hữu cơ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.)). Theo một số phương án, việc sử dụng các polyme tổng hợp để tạo cấu trúc polymerosom làm cho nhà thiết kế có thể kiểm soát các đặc tính của màng và vì vậy kiểm soát được tính thấm, tốc độ giải phóng, độ ổn định và các tính chất khác.

Theo một phương án, chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP) theo sáng chế có thể được bao nang bên trong polymersom gốc poly(etylen oxit)-khối-poly(ϵ -caprolacton) (PEO-b-PCL). Mặc dù việc hiểu cơ chế là không cần thiết để thực hiện sáng chế, và sáng chế không bị giới hạn ở cơ chế tác động bất kỳ, theo một số phương án, PEO tạo cho chất mang thu được độ ổn định hóa học và cơ học *in vitro* được tăng cường, độ sinh khả dụng *in vivo* được làm tăng và thời gian bán hủy kéo dài trong vòng tuần hoàn máu. PCL, một nguyên liệu sinh học có thể cấy ghép đã được biết rõ, tạo thành màng polymersom, và tạo điều kiện dễ dàng cho sự phân hủy *in vivo* hoàn toàn và an toàn của sản phẩm thu được bởi sự thủy phân liên kết este của nó.

Theo phương án khác, chế phẩm chứa selen (ví dụ, selenoglycoprotein) theo sáng chế có thể được bao nang trong polymersom được tổng hợp từ các hỗn hợp trộn lẫn hoặc dẫn xuất tinh khiết của các polyme khối có khả năng phân hủy sinh học khác thu được từ việc liên hợp poly(axit lactic), poly(glycolit), poly(axit lactic-coglycolic) hoặc poly(3-hydroxybutyrat) với PEO.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất viên nang nano (Couvreur et al. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2002; 19(2):99-134,, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) làm chất mang cho chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hữu cơ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.) theo sáng chế (Xem, US 7,498,045, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Theo một số phương án, viên nang nano tạo ra sự giải phóng có kiểm soát của chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hữu cơ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.) trong quá trình phân hủy sinh học của viên nang nano. Theo một số phương án, viên nang nano có chu kỳ bán rã phân hủy sinh học nằm trong khoảng từ khoảng 2 đến khoảng 100 giờ (ví dụ, khoảng 2 giờ...4 giờ...6 giờ... 12 giờ...24 giờ... 48 giờ... 96 giờ, v.v.). Theo một số phương án, viên nang nano có khả năng phân hủy sinh học theo sáng chế là có khả năng thích ứng với sự giải phóng có kiểm soát của chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hữu cơ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.) và tùy

ý nhiều chất trị liệu được bao nang khác, bao gồm các đại phân tử, vào vòng tuần hoàn in vivo của đối tượng trong quá trình sử dụng. Chế phẩm viên nang nano theo sáng chế được làm thích ứng tiếp để bao nang nồng độ hữu hiệu có tác dụng trị liệu của chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hữu cơ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, v.v.) và phân phối chúng vào vòng tuần hoàn in vivo của thể nhận. Theo một số phương án, viên nang nano bao nang chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hữu cơ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.) là màng bao gồm, ví dụ, copolyme của polyme axit polylactic và polyetylen glycol. Theo một số phương án, viên nang nano được tạo thành bởi quá trình polyme hóa mặt phân cách của monome hoặc sự lắng nano mặt phân cách của polyme đã được tạo hình trước.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất polyme được khắc phân tử làm chất mang cho chế phẩm chứa selen (ví dụ, selen hữu cơ, selen hòa tan, selen hòa tan trong nước, SGP, SEL-PLEX, v.v.) theo sáng chế (Mosbach. Trends in Biochemical Sciences, Vol. 7, pp. 92-96, 1994., Wulff. Trends in Biotechnology, Vol. 11, pp. 85-87, 1993., Andersson, et al., Molecular Interactions in Bioseparations (Ngo. T. T. ed.), pp. 383-394,)., US 5,959,050, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau được đưa ra để chứng tỏ và minh họa thêm một số phương án và khía cạnh được ưu tiên nhất định của sáng chế và không dự định được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1

A. Điều chế theo dãy các selenoglycoprotein hòa tan từ SEL-PLEX bằng cách chiết axit và các quy trình kết tủa tiếp theo

Bình phản ứng ba cổ dung tích 4 L (thiết bị chiết# 1, xem Fig.1) được trang bị bộ phận khuấy cơ học, nhiệt kế, và lớp phủ điện được nạp đầy với 3 L H₂O được khử ion và 50 ml HCl 0,3 N. Bình phản ứng được gia nhiệt đến trên 50°C và 600g SEL-PLEX ở 1600ppm được bổ sung từng phần trong khi có khuấy. Sau khoảng một giờ, nhiệt độ đạt đến 80°C và độ pH của hỗn hợp là 2,23. Độ pH được làm giảm đến 1,5 bằng cách bổ sung 13,5mL HCl 0,3 N. Bình phản ứng được duy trì gia nhiệt và khuấy trong 7 giờ. Độ pH của hỗn hợp được kiểm tra khoảng mỗi giờ để đảm bảo mức pH vẫn còn ở 1,5. Hỗn hợp sau phản ứng có tính axit (pH 1,5) được phân bố vào bốn lọ ly tâm dung tích

1L và được ly tâm (thiết bị ly tâm#1, xem Fig.1) ở 4000 RCF trong 20 phút ở nhiệt độ 8°C. Dịch nổi bề mặt (pH 1,5) và viên tròn rắn được thu gom. Dịch nổi bề mặt được bổ sung vào bình phản ứng ba cổ dung tích 3 L (thiết bị trộn#1, xem Fig.1) trong bể đá (4°C), và được trang bị phễu nhỏ giọt chứa NaOH 2N, bộ phận khuấy cơ học và điện cực pH. NaOH 2N được bổ sung từng giọt vào dung dịch trong khi có khuấy cho đến khi độ pH của hỗn hợp đạt đến 1,85. Trong quá trình bổ sung NaOH, chất kết tủa màu trắng được tạo thành. Tiếp tục khuấy trong 30 phút và hỗn hợp lại được ly tâm (thiết bị ly tâm#2, xem Fig.1) tạo thành dịch nổi bề mặt và viên tròn selenoglycoprotein. Viên tròn selenoglycoprotein được thu gom và được làm khô đông lạnh (thiết bị làm khô đông lạnh# 1, xem Fig.1) tạo ra 1,635g chất kết tủa màu trắng. Dịch nổi bề mặt ở độ pH 1,85 và viên tròn được tạo thành ở độ pH 1,5 được bổ sung vào bình phản ứng (thiết bị trộn#2, xem Fig.1) và được đặt trong bể nước đá (4°C). Hỗn hợp được khuấy trong 30 phút và sau đó được ly tâm (thiết bị ly tâm#3, xem Fig.1 và Fig.2), tạo thành phần cặn rắn ướt và dịch nổi bề mặt ở độ pH 1,6, sau đó được sử dụng để tạo thành các SGP bởi các quy trình kết tủa phụ thuộc pH tiếp theo (ví dụ, phân đoạn SGP pH 3,0, pH 4,0 và pH 6,0 như được nêu ở phần dưới đây).

B. Sự kết tủa phụ thuộc pH của selenoglycoprotein

Dịch nổi bề mặt có pH 1,6 được đặt trong bình phản ứng (thiết bị trộn #3, xem Fig.2) và NaOH 2N được bổ sung vào dung dịch trong khi có khuấy cho đến khi độ pH của hỗn hợp đạt đến 3,0. Tiếp tục khuấy trong 30 phút nữa và hỗn hợp được ly tâm (thiết bị ly tâm#4, xem Fig.2) tạo thành dịch nổi bề mặt và viên tròn selenoglycoprotein. Viên tròn selenoglycoprotein ở độ pH 3,0 (SGP pH 3,0) được thu gom và được làm khô đông lạnh (thiết bị làm khô đông lạnh#2, xem Fig.2) tạo ra chất kết tủa màu xám nhạt. Dịch nổi bề mặt có độ pH 3,0 được đặt trong bình phản ứng (thiết bị trộn #4, xem Fig.2) và NaOH 2N được bổ sung vào dung dịch cho đến khi độ pH của dung dịch tăng đến 4,0. Tiếp tục khuấy trong 30 phút nữa và hỗn hợp được ly tâm (thiết bị ly tâm#5, xem Fig.2) tạo thành dịch nổi bề mặt và viên tròn selenoglycoprotein. Viên tròn selenoglycoprotein ở độ pH 4,0 (SGP pH 4,0) được thu gom và được làm khô đông lạnh (thiết bị làm khô đông lạnh#3, xem Fig.2) tạo ra chất kết tủa màu xám nhạt. Dịch nổi bề mặt có độ pH 4,0 được đặt trong bình phản ứng (thiết bị trộn #5, xem Fig.2) và NaOH 2N được bổ sung vào dung dịch cho đến khi độ pH của dung dịch tăng đến 6,0. Tiếp tục khuấy trong 30 phút nữa và hỗn hợp được ly tâm (thiết bị ly tâm#6, xem Fig.2) tạo thành dịch nổi bề

mặt và viên tròn selenoglycoprotein. Viên tròn selenoglycoprotein ở độ pH 6,0 (SGP pH 6,0) được thu gom và được làm khô đông lạnh (thiết bị làm khô đông lạnh#4, xem Fig.2) tạo ra chất kết tủa màu xám nhạt. Các chất kết tủa tiếp theo mà đã được tạo thành được thu gom bằng cách ly tâm. Dòng nước thải có độ pH 6,0 từ lần ly tâm cuối cùng chứa một số seleno-peptit, manozơ và glucozơ oligosacarit (ví dụ, mà có thể được sử dụng trong điều chế môi trường sinh trưởng của nấm men hoặc chất dinh dưỡng khác). Quy trình này không tạo ra chất thải gây độc và thân thiện với môi trường.

Ví dụ 2

Tách và xác định đặc điểm SGP hòa tan

Viên tròn chứa phần cặn rắn ở độ pH 1,5 tạo thành bằng cách chiết SEL-PLEX bằng axit được rửa với dịch nổi bề mặt ở độ pH 1,85 từ lần chiết thứ hai (Xem, Ví dụ, 1) để làm giảm thể tích của nước được sử dụng trong quy trình, và để hòa tan hầu hết các SGP được giữ trong viên tròn. Phần cặn rắn sau quy trình ly tâm lần thứ ba ở độ pH 1,6 chứa lượng đáng kể của selen và có thể được trộn với mẻ mới của nấm men selen trước khi được làm khô dạng phun, hoàn toàn sử dụng nguyên liệu mà được lấy để chiết.

Tổng selen, % hàm lượng protein, và khối lượng của mỗi trong số các phân đoạn SGP được tính trung bình sau ba lần chiết tiếp theo từ SEL-PLEX (Xem, Bảng 1). Các phân đoạn SGP đã được chiết tạo nên từ 2,0 đến 2,5 % khối lượng của SEL-PLEX và từ 4,3 đến 5,75% của tổng selen mà có mặt trong SEL-PLEX đã được chiết sơ bộ.

Có mối tương quan dương giữa độ pH của các phân đoạn SGP và khối lượng protein, điều ngược lại là đúng đối với hàm lượng selen tổng (Xem, Bảng 1).

Khối lượng protein trung bình đối với các phân đoạn SGP nằm trong khoảng từ khoảng 65 đến 90 % khối lượng, và nồng độ của selen đối với cùng nhóm các phân đoạn nằm trong khoảng từ khoảng 2900ppm đến 4900ppm. Các phân đoạn SGP chứa từ 4 đến 37 % khối lượng là thành phần hydrat cacbon.

Bảng 1. Kết quả tính trung bình từ ba lần chiết tiếp theo 600g SEL-PLEX

Độ pH của phân đoạn	Hàm lượng Se [ppm]	Khối lượng protein [%]	Khối lượng [g]
1,85	4887	65,55	1,635
3,0	3836	76,04	5,652

4,0	3250	87,74	3,634
6,0	2915	91,81	1,757

Điện di gel của phân đoạn SGP ở độ pH 1,5 tạo thành bằng cách chiết SEL-PLEX bằng axit cho thấy rằng các băng tương ứng với protein khối lượng phân tử cao hoặc protein mang thành phần hydrat cacbon lớn vắng mặt. Sự phân bố kích thước tương tự, với sự trội hơn của các phân đoạn có khối lượng phân tử thấp, được phát hiện bằng cách sử dụng điện di mao dẫn và protein khối lượng phân tử thấp từ 5,1kDa đến 12,2kDa chiếm nhiều hơn 90% khối lượng của hỗn hợp.

Sắc ký loại trừ theo kích cỡ của ba phân đoạn SGP ở độ pH 3,0, 4,0, và 6,0 trên gel BIO- RAD P10 (thời gian lưu lên đến 6 giờ) và trên gel BIO-RAD P30 (thời gian lưu ít hơn một giờ), thu được đỉnh đầu với thời gian lưu 5-10 phút và đỉnh sau, rộng, với thời gian lưu 35-60 phút. Đỉnh đầu chứa protein nhiều hơn một cách đáng kể: từ 64,74 đến 75,24%, và hàm lượng selen lớn hơn một cách đáng kể: từ 2972 đến 4252ppm. Hàm lượng của protein trong đỉnh sau là thấp hơn nhiều: từ 31,66 đến 54,95% và hàm lượng selen là thấp hơn một cách đáng kể: từ 1193 đến 1858 ppm. Loại sắc ký này có thể tạo ra các SGP với hàm lượng cao của Se từ các phân đoạn thô, và chứng tỏ tính đồng nhất thấp của thành phần hydrat cacbon trong các hỗn hợp này.

Sắc ký loại trừ theo kích cỡ trên nhựa SUPERDEX Peptit 10/300 GL (AMERSHAM Biosciences; khoảng cắt phân đoạn 7,0-100kDa) sử dụng 0,1M AcONH₄ (pH 7,5) đối với các peptit khác nhau từ quá trình tiêu hóa SEL-PLEX nhờ tripxin, tạo ra nhóm các đỉnh tương tự đối với mẫu SGP (10-100kDa và >100kDa) và mẫu rửa giải hoàn toàn khác đối với mẫu SEL-PLEX. Chỉ có các đỉnh "đầu", với thời gian rửa giải dưới 20 phút, chứa selen. Dung môi rửa giải chứa selen được thu gom, được làm đông khô nhanh và được phân tích bằng cách sử dụng kỹ thuật SEC ICP MS, MALDI TOF MS và nano ESI MS/MS. Các kết quả là bổ sung và cho phép phát hiện, xác định và giải trình tự peptit chứa selen. Việc nhận diện các protein đã được phát hiện thu được bởi sự tra cứu cơ sở dữ liệu SwissProt (Xem Bảng 2).

Bảng 2. Seleno-peptit và selenoprotein từ quá trình tiêu hóa chất chiết SEL-PLEX bằng tripxin đã được nhận diện.

Phân đoạn SEC được phân tích	Khối lượng peptit được phát hiện (^{80}Se) $[M + H]^+$, Th	Trình tự peptit được nhận diện	Protein	Khối lượng phân tử protein (kDa)
2	653,39 701,42	GSDTMRSVSPIRSEQ ID NO: 1 GSDT Se MRSVSPIR SEQ ID NO: 2	Ylr 190 wp	42
3	637,39 685,41	SGMSKK SEQ ID NO:3 SG Se MSKK SEQ ID NO: 4	Phosphatidylinositol 4 kinaza alpha	89
2	587,33 635,35	EVIGIDPSSAMLSIAEK SEQ ID NO: 5 EVIGIDPSSA Se MLSIAEK SEQ ID NO: 6	Yhr209wp	34
3	637,39	A Se MIVR SEQ ID NO: 7	Ribonucleaza III	77
1 và 2	402,10	DY Se MGAAK SEQ ID NO: 8	HSP 12	12
1 và 2	489,55	SIVPL Se MDR SEQ ID NO: 9	HSP 10	10
1 và 2	504,03	Se MGHDQSGTK SEQ ID NO: 10	SIP 18	18

Tính chất bất ngờ nhất của phương pháp này là ở chỗ thành phần protein của các phân đoạn khác nhau thu được bởi các phép tách sắc ký (ví dụ, sắc ký trao đổi ion, sắc ký loại trừ theo kích cỡ) của các phân đoạn SGP khác nhau từ quy trình kết tủa phụ thuộc pH, là giống hoặc rất tương tự, với các phương pháp điện chuyển (điện di gel và điện di mao dẫn) đã được áp dụng. Như được nêu trong bản mô tả này, việc chiết selenoglycoprotein từ nấm men được làm giàu selen là thành công ở độ pH thấp (ví dụ, 1,5). Mặc dù việc hiểu cơ chế là không cần thiết để thực hiện sáng chế và sáng chế không bị giới hạn ở cơ chế tác động bất kỳ, theo một số phương án, trong điều kiện axit được sử dụng để chiết SGP, lõi protein không bị thủy phân đáng kể và chủ yếu vẫn còn ở dạng ban đầu của nó. Theo một số phương án, các phân đoạn selenoglycoprotein phụ thuộc pH của SEL-PLEX (ví dụ, SGP pH 3,0, SGP pH 4,0, SGP pH 6,0) được tạo ra và được sử dụng (ví dụ, một mình hoặc kết hợp với chất khác) cho đối tượng (ví dụ, để phân phối selen hữu cơ cho đối tượng (ví dụ, thông qua đường miệng)).

Ví dụ 3

So sánh độ sinh khả dụng

Các con gà con được cho ăn trong 18 ngày với bảy cách xử lý khẩu phần ăn khác nhau (xem các Bảng 3 và 4) để so sánh độ sinh khả dụng của selen từ sự kết tủa phụ thuộc pH của các SGP từ chất chiết axit SEL-PLEX bằng cách xác định hàm lượng selen

trong cơ ức của gà:

Bảng 3. Mô tả chế phẩm và chất dinh dưỡng của khẩu phần ăn cơ sở

Thành phần	%
Ngô	57,80
Bột đậu tương (48%)	35,00
Dầu ngô	3,20
Đá vôi	1,30
Dicaxi phosphat	1,80
Muối	0,45
Hỗn hợp Vitamin-Khoáng chất (không có Se)	0,25
DL-Methionin	0,20
Tổng	100
Chất dinh dưỡng	
ME, kcal/kg	300
CP, %	21,5
Ca, %	1,00
P có sẵn, %	0,45
Lysin, %	1,21
Methionin, %	0,54
Met + Cys, %	0,89
Na, %	0,20

Bảng 4. Các xử lý khẩu phần ăn

Xử lý	Thành phần
1 (Đối chứng)	Khẩu phần ăn cơ sở ngô-đậu tương không bổ sung Se
2 (SS)	Cơ sở + 0,3ppm Se dưới dạng natri selenit
3 (SP)	Cơ sở + 0,3ppm Se dưới dạng SEL-PLEX
4 (pH 1,85)	Cơ sở + 0,3ppm Se dưới dạng phân đoạn kết tủa ở độ pH 1,85
5 (pH 3,0)	Cơ sở + 0,3ppm Se dưới dạng phân đoạn kết tủa ở độ pH 3,0
6 (pH 4,0)	Cơ sở + 0,3ppm Se dưới dạng phân đoạn kết tủa ở độ pH 4,0
7 (pH 6,0)	Cơ sở + 0,3ppm Se dưới dạng phân đoạn kết tủa ở độ pH 6,0

Như được thể hiện trong Bảng 5, gà được cho ăn khẩu phần ăn được bổ sung phân đoạn SGP pH 4,0 hoặc pH 6,0 hầu như tích lũy cùng lượng lắng đọng selen ở mô cơ ức so với gà được cho ăn khẩu phần ăn được bổ sung SEL-PLEX (SP). So với đối chứng, mức Se ở mô của gà được cho ăn khẩu phần ăn SP và ở gà được cho ăn khẩu phần ăn được bổ sung phân đoạn SGP pH 4,0 hoặc pH 6,0 là cao hơn hai lần so với gà nhận được thức ăn được bổ sung natri selenit. Như vậy, sáng chế đề xuất, theo một số phương án, rằng SP, cũng như phân đoạn SGP SP con (ví dụ, pH 4,0 và pH 6,0) là có tính sinh khả dụng khi được dùng cho đối tượng (ví dụ, theo một số phương án, SP, SGP pH 4,0 hoặc SGP pH 6,0 là có tính sinh khả dụng lớn hơn (ví dụ, 2 lần hoặc lớn hơn 2 lần) so với selen vô cơ (ví dụ, natri selenit) khi được dùng cho đối tượng (ví dụ, như được chứng tỏ bởi sự phân phối selen đến mô của đối tượng)).

Xử lý	Se, ppm
1-Đối chứng	98,9 ^c
2-SS	137,3 ^d
3-SP	327,6 ^a
4 - pH 1,85	214,8 ^c
5 - pH 3,0	257,7 ^b
6 - pH 4,0	326,6 ^a
7 - pH 6,0	305,4 ^a

Bảng 5. Ảnh hưởng của nguồn Se trong khẩu phần ăn đến hàm lượng Se ở cơ

* Giá trị với các chữ cái khác nhau biểu thị rằng các kết quả là có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$).

Ví dụ 4

A. Ảnh hưởng của các nguồn selen khác nhau trong khẩu phần ăn đến profin biểu hiện gen ở cơ ức của gà giò

Mô cơ ức từ các con gà nêu trong Ví dụ 3 được sử dụng để đánh giá độ tương tự và độ khác nhau trong profin biểu hiện gen được gọi ra bởi các xử lý khẩu phần ăn sau đây: Xử lý 1- cơ sở (đối chứng); Xử lý 2- Đối chứng + 0,3 ppm natri-selenit (SS); Xử lý 3- Đối chứng + 0,3 ppm SEL-PLEX; Xử lý 6-0,3 ppm phân đoạn SGP được chiết từ SEL-PLEX (SP) ở độ pH 4,0. Phân đoạn SGP pH 4,0 được phân tích vì nó tạo ra mức lắng đọng selen trong mô ức hầu như giống hệt so với mức thu được với SP (Xem, Bảng 5). Như vậy, các thử nghiệm được tiến hành trong quá trình phát triển các phương án của sáng chế để xác định xem động vật nhận được phân đoạn SGP pH 4,0 có các tác dụng *in vivo* tương tự (ví dụ, các thay đổi sự biểu hiện gen) quan sát được ở động vật được cho ăn SP hay không, hoặc để xác định xem liệu có tồn tại sự khác biệt đáng kể, có thể xác định được hay không.

Động vật và Lấy mẫu mô:

Vào 18 ngày tuổi, năm con gà từ mỗi nhóm xử lý (được nêu trên đây và trong các Bảng 3 và 4) được chọn ngẫu nhiên và được làm chết không đau đớn bằng cách làm ngạt bằng khí agon, sau đó là làm trật khớp cổ. Mẫu mô cơ ức (1 gam) được lấy ra nhanh chóng và được làm đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng. Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi được phân tích.

Phân tích vi mảng:

ARN tổng cộng được tách riêng khỏi mô đã được đông lạnh bằng cách sử dụng chất phản ứng TRIZOL (INVITROGEN, Carlsbad, CA) theo protocol của nhà sản xuất và được tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit RNEASY (QIAGEN, Valencia, CA). ARN tổng cộng được định lượng bởi sự hấp thụ ở 260 nm và tính toán vẹn được xác nhận bởi sự điện di trên gel agarosa và nhuộm màu ethidi bromua các băng 28S và 18S.

Việc xác định profin vi mảng được tiến hành bằng cách sử dụng AFFYMETRIX (Santa Clara, CA) Genechip Chicken Genome Array theo protocol do nhà sản xuất đưa ra.

Dữ liệu được xử lý và mỗi bộ mẫu dò được đánh dấu là P (có mặt), M (mép) hoặc A (vắng mặt) dựa trên tỷ lệ tín hiệu so với cường độ nhiễu sử dụng thuật toán tóm lược biểu thức AFFYMETRIX MAS5.0.

Phân tích tin sinh học:

Genpring GX 10.0 (Silicon Genetics, Redwood, CA) được sử dụng để xác định và chuẩn hóa dữ liệu vi mảng và để thực hiện các phân tích thống kê và mẫu biểu hiện gen.

Để làm giảm thiểu khả năng phát hiện nhầm lẫn, bộ mẫu dò với cường độ tín hiệu thấp (được đánh dấu là ‘Vắng mặt’ bởi thuật toán MAS5.0) được loại trừ khỏi phân tích tiếp theo. Profin biểu hiện gen đã lọc sau đó được cho qua ANOVA một chiều để nhận diện bộ mẫu dò mà được biểu hiện một cách khác biệt giữa các nhóm và sau đó là thử nghiệm *post hoc* để xác định các gen mà được làm thay đổi một cách đáng kể bởi việc xử lý bằng selen so với đối chứng. Chỉ các gen mà khác với Đối chứng ($P < 0,05$) và có sự thay đổi số lần cường độ tín hiệu tương ứng (FC) $> 1,2$ mới được cho là thay đổi.

Để biểu thị bằng mắt thường tác dụng của các xử lý khẩu phần ăn đến profin biểu hiện gen ở mô cơ ức, 693 gen mà được xác định là được biểu hiện một cách khác biệt (ANOVA, $p < 0,05$) được tiến hành kết cụm phân tầng không được giám sát dựa trên cả mảng và gen. Như được nêu chi tiết ở trên, phân đoạn SGP pH 4,0 thu được trực tiếp từ SP, và các nhóm xử lý khẩu phần ăn nhận được SP hoặc phân đoạn SGP pH 4,0 thể hiện mức lắng đọng selen (độ sinh khả dụng) trong mô cơ ức của gà gần như giống hệt (Xem, Bảng 5, ở trên). Như vậy, được mong đợi rằng cả hai nhóm xử lý selen (phân đoạn SP và SGP pH 4,0) sẽ thể hiện sự thay đổi biểu hiện gen giống hệt hoặc rất tương tự. Tuy nhiên, và khá ngạc nhiên, ảnh hưởng rõ ràng của khẩu phần ăn đến profin biểu hiện gen

được quan sát thấy giữa hai nhóm xử lý (xem Fig.3). Cụ thể, sự khác biệt đáng kể được quan sát thấy giữa profin biểu hiện gen của nhóm xử lý SP so với nhóm xử lý phân đoạn SGP pH 4,0, trong đó phần lớn các gen được phân tích đáp ứng khác nhau với hai nhóm xử lý. Sự thay đổi lớn này trong profin biểu hiện gen gây ra bởi sự xử lý SP so với xử lý phân đoạn SGP pH 4,0 là hoàn toàn bất ngờ và đưa ra sự hiểu biết sâu sắc chưa từng có trước đây về đặc tính sinh học của yếu tố vết.

Ví dụ, 693 gen được điều hòa khác nhau ($P < 0,05$, ANOVA) được cho qua sự kết cụm phân tầng không được giám sát dựa trên cả mảng và gen. Trong bản đồ nhiệt được thể hiện trên Fig.3, profin biểu hiện gen được chuẩn hóa được thể hiện bằng các màu sắc mà phản ánh sự thay đổi biểu hiện so với giá trị trung bình của mỗi gen; màu trắng, đen hoặc xám lần lượt biểu thị mức thay đổi cường độ biểu hiện bị giảm, được tăng hoặc không có mức thay đổi cường độ biểu hiện. Thụ đồ ở phía trên của bản đồ nhiệt phản ánh mức độ tương tự trong các profin biểu hiện giữa các nhóm xử lý, trong khi đó thụ đồ phía bên trái biểu thị độ khác nhau trong kiểu biểu hiện của các gen riêng rẽ, trong số tất cả các xử lý. Chiều dài của thụ đồ thể hiện trên Fig.3 tương ứng với mức không tương tự giữa lá cụm (thụ đồ ngắn biểu thị mức tương tự lớn hơn).

Các ảnh hưởng khác nhau của phân đoạn SGP pH 4,0 và SP đến profin biểu hiện gen trong cơ ức được phân tích tiếp bằng cách so sánh số lượng gen bị thay đổi một cách đáng kể ($P < 0,05$, $FC > 1,2$) bởi phân đoạn SGP pH 4,0 (pH4), SP và natri selenit (SS), như được biểu thị trong biểu đồ Venn được thể hiện trên Fig.4. Có 198, 173, và 283 gen bị thay đổi một cách đáng kể bởi SP, pH4 và SS, một cách tương ứng. Chỉ có 21 gen được điều hòa thông thường bởi cả ba nhóm xử lý Se, và 46 gen được điều hòa thông thường bởi cả SP và phân đoạn SGP pH 4,0. Có 152 và 127 gen được làm thay đổi duy nhất bởi SP hoặc phân đoạn SGP pH 4,0, một cách tương ứng.

Ví dụ, một vài gen được xác định là được điều hòa một cách khác biệt hoặc thông thường trong mô cơ ức của gà do kết quả của các xử lý selen khác nhau được thể hiện trên các Fig. 5-7.

Protein được cảm ứng bởi yếu tố tăng trưởng chuyển dạng beta (TGFBI 68 kDa) được tin là có liên quan đến các tương tác tế bào-nền, sự bám dính, di trú và biệt hóa tế bào. Các đột biến của gen này có liên quan đến một số dạng loạn dưỡng màng sùng. Protein kinaza 8 được hoạt hóa bởi tác nhân gây phân bào, (MAPK8, còn được gọi là

JNK1) là thành phần của họ MAP kinaza. MAP kinaza tác động như là điểm tích hợp đối với nhiều tín hiệu hóa sinh, và có liên quan đến nhiều quá trình tế bào khác nhau như sự tăng sinh, biệt hóa, điều hòa phiên mã và phát triển.

MAPK8 cũng đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng với áp lực oxy hóa tế bào, đáp ứng miễn dịch, cũng như sự chuyển hóa hydrat cacbon và protein thông qua các con đường truyền tín hiệu insulin. Đã biết rằng sự hoạt hóa quá mức của MAPK8 có thể gây ra tính kháng insulin thông qua sự phosphoryl hóa cơ chất thụ thể insulin 1(IRS1).

Fig.5 đưa ra ví dụ về gen (ví dụ, TGFBI và MAPK8) mà được điều hòa thông thường bởi SS, SP và phân đoạn SGP pH 4,0. Fig.6 đưa ra ví dụ về gen (ví dụ, thành phần bổ sung 1R (C1R), và yếu tố ubiquityl hóa E4A (UBE4A)) được điều hòa thông thường bởi SP và phân đoạn SGP pH 4,0, nhưng không bởi được điều hòa bởi SS. Thành phần bổ sung IR (C1R) là protein liên quan đến thác bổ thể của hệ miễn dịch bẩm sinh và sự loại bỏ mầm bệnh. Việc cải biến protein với ubiquitin là cơ chế tế bào quan trọng để nhắm đích protein bất thường hoặc protein có đời sống ngắn để phân hủy. UBE4A mã hóa ubiquitin ligaza loại hộp chữ U được mô tả là yếu tố ubiquityl hóa E4. UBE4A được tin là có vai trò trong các quy trình hóa sinh khác nhau ngoài quy trình ubiquityl hóa, bao gồm sự sinh trưởng và/hoặc biệt hóa.

Fig.7 đưa ra ví dụ về gen (ví dụ, protein cơ nhỏ, peptidaza đặc hiệu ubiquitin và được liên kết X (SMPX) (USP22)) mà được điều hòa duy nhất bởi phân đoạn SGP pH 4,0. Protein cơ nhỏ, được liên kết X (SMPX) là protein nhỏ được biểu hiện đặc hiệu trong cơ vân và đóng vai trò quan trọng trong sự co cơ. Peptidaza đặc hiệu ubiquitin 22 (USP22) là gen liên quan đến các quá trình dị hóa protein phụ thuộc ubiquitin. USP22 đã được cho thấy là chất điều hòa dương đối với sự phát triển của khối u. Sự biểu hiện tăng của USP22 có liên quan đến sự tiến triển của ung thư. Khả năng làm giảm hoặc kìm hãm sự biểu hiện của USP22 có thể tạo ra tác dụng ức chế sự phát triển của khối u và/hoặc sự tiến triển của ung thư. Ví dụ, việc làm giảm sự biểu hiện của USP22 có thể điều hòa giảm sự biểu hiện của Mdm2 và cyclin E, dẫn đến sự biểu hiện được điều hòa tăng của p53 và p21, dẫn đến sự kìm hãm chu kỳ tế bào và tác dụng ức chế sự tăng sinh tế bào khối u bằng quang ở người.

Việc kiểm tra tiếp theo về kiểu biểu hiện gen duy nhất được gọi ra bởi phân đoạn pH 4,0 trong mô cơ đưa ra bằng chứng bổ sung đối với ứng dụng trị liệu tiềm năng của

các dạng hóa học của selen trong phân đoạn này (ví dụ, để ngăn ngừa hoặc làm chậm sự tiến triển và/hoặc sự di căn của khối u).

Ví dụ, gen KITLG (phôi tử c-KIT) mã hóa phôi tử của thụ thể tyrosin-kinaza, một yếu tố đa tác động mà tác dụng *in utero* trong sự phát triển của tế bào mầm và tế bào thần kinh và sự tạo huyết; các quy trình mà được tin là phản ánh vai trò trong sự di trú tế bào. Gần đây, các thay đổi trong gen KITLG đã được phát hiện mà được tin là có liên quan đến nguy cơ tăng của bệnh ung thư tinh hoàn (Kanetsky et al., 2009). Ngoài ra, sự biểu hiện quá mức của thụ thể cùng nguồn của KITLG, sản phẩm gen gây ung thư KIT, đã được nêu trong tài liệu trong caxinom tế bào thận ký màu và sự biểu hiện của cả KITLG và KIT đã được biết là có liên quan đến sự biến đổi của nguyên bào sợi NIH3T3 và sự phát sinh khối u của ung thư phổi tế bào nhỏ (Yamazaki et al., 2003).

Ngạc nhiên là, đã quan sát thấy rằng mô cơ từ đối tượng được sử dụng phân đoạn pH4,0 điều hòa giảm đáng kể gen KITLG nhưng mức biểu hiện của nó không bị ảnh hưởng bởi các xử lý selen khác bao gồm SP, nguyên liệu gốc đối với phân đoạn pH 4,0 (Xem Fig.8).

Di căn là nguyên nhân tử vong chính trong hầu hết các bệnh ung thư ở người và là quá trình nhiều bước trong đó các tế bào từ khối u ban đầu di trú qua nền ngoại bào, đi vào vòng tuần hoàn thông qua mạch máu mới được tạo thành (sự hình thành mạch khối u) và phân tán đến các vị trí xa (thoát mạch), trong đó sự tăng sinh lại bắt đầu.

Protein được liên kết thụ thể yếu tố sinh trưởng 2 (Grb2) là phân tử chủ chốt trong sự chuyển nạp tín hiệu nội bào. Protein này có tính quyết định đối với sự tiến triển của chu kỳ tế bào và sự di động gốc actin và, do đó, các quy trình phức tạp hơn như sự tạo hình biểu mô, sự hình thành mạch và sự tạo mạch. Các chức năng quan trọng này làm cho Grb2 là đích trị liệu đối với các phương pháp được thiết kế để ngăn ngừa sự lan rộng của khối u rắn qua sự xâm lấn và di căn cục bộ. Trên thực tế, nhiều nỗ lực hiện nay được định hướng ở việc phát hiện các con đường để phong bế hoặc đối kháng Grb2 vì được thấy rằng đây có thể là phương pháp chống di căn hiệu quả (Giubellino, Burke and Bottaro, 2008).

Như được thể hiện trên Fig.9, Grb2 được điều hòa giảm một cách đáng kể ở pH 4,0 - động vật đã được xử lý so với đối chứng và các xử lý selen khác, bao gồm natri selenit và nguyên liệu selen gốc đối với pH 4,0; Sel-Plex.

Hoạt tính chống sinh ung thư tiềm năng của phân đoạn pH 4,0 không bị giới hạn ở sự điều hòa giảm của các gen có liên quan đến ung thư quan trọng. Ví dụ, việc làm giảm sự biểu hiện của DNAJA3 ở các tế bào ung thư vú đã được quan sát thấy là tăng cường sự di trú của chúng bằng cách cho phép mức Interleukin-8 tăng (Kim et al., 2005). Kết quả này và các kết quả khác nữa gợi ý rằng việc tăng cường mức Tid1 (DNAJA3) ở các tế bào ung thư điều hòa âm sự di động và khả năng di căn của chúng.

DNAJA3 được điều hòa tăng mạnh trong mô cơ trong các thử nghiệm đáp ứng với selen pH 4,0 (Fig.10), nhưng vẫn không đáp ứng, so với điều kiện đối chứng, trong mô cơ từ động vật nhận được nguồn selen khác.

B. Ảnh hưởng của các xử lý selen khác nhau đến profin biểu hiện gen ở gan của gà giò

Để cố gắng xác định đặc điểm thêm về các ảnh hưởng bất ngờ đến sự biểu hiện gen khác nhau của SP và phân đoạn SGP pH 4,0 và để xác định xem sự điều hòa biểu hiện có được mở rộng đến các mô khác hay không, các nghiên cứu sự biểu hiện gen được tiến hành như được nêu ở trên trong Ví dụ 4(a). Thay cho mô cơ ức, mô gan được thu gom và được phân tích từ các con gà nêu trong Ví dụ 3. Ngoài các nhóm xử lý được bổ sung SS, SP và phân đoạn SGP pH 4,0, profin biểu hiện gen ở gan của gà từ các nhóm xử lý bổ sung (phân đoạn SGP pH 1,85 (pH1,85), phân đoạn SGP pH 3,0 (pH3), và phân đoạn SGP pH 6,0 (pH6) cũng được xác định đặc điểm và được so với nhóm xử lý đối chứng.

Theo cùng protocol thử nghiệm được nêu trong Ví dụ 4(A), việc phân tích profin biểu hiện gen ở gan từ các đối tượng của mỗi nhóm xử lý đã nhận diện được 1520 gen mà được thay đổi một cách đáng kể bởi các xử lý khẩu phần ăn khác nhau ($P < 0,01$, ANOVA). Phân tích sự kết cụm phân tầng không được giám sát của các gen này được thể hiện trên Fig.11 và cung cấp các bằng chứng bổ sung rằng việc xử lý bằng các nguồn selen khác nhau gây ra mức biến đổi lớn trong khả năng điều hòa sự biểu hiện gen. Bản đồ nhiệt của Fig.11 thể hiện profin biểu hiện gen được chuẩn hóa bằng các màu sắc mà phản ánh các thay đổi của sự biểu hiện so với giá trị trung bình của mỗi gen; màu trắng, đen hoặc xám lần lượt biểu thị mức giảm, mức tăng hoặc mức không thay đổi trong cường độ biểu hiện. Thụ đồ ở phía trên của bản đồ nhiệt phản ánh mức độ tương tự trong profin biểu hiện giữa các xử lý, trong khi đó thụ đồ phía bên trái biểu thị độ khác nhau

trong kiểu biểu hiện của các gen riêng rẽ, trong số tất cả các xử lý. Chiều dài của thụ đờ được thể hiện trên hình vẽ tương ứng với mức không tương tự giữa các lá cụm (thụ đờ ngắn biểu thị mức tương tự lớn hơn).

Độ khác nhau giữa SP và phân đoạn SGP pH 4,0, cũng như độ khác nhau giữa phân đoạn SGP pH 3,0 và phân đoạn SGP pH 6,0, là đáng kể, với chỉ một số gen được điều hòa thông thường bởi việc xử lý bằng mỗi trong số các nguồn selen. Nhìn chung, ảnh hưởng của việc xử lý bằng phân đoạn SGP pH 1,85 đến sự biểu hiện gen rơi vào giữa nhóm xử lý bằng SP và các nhóm xử lý SGP khác (xem Fig.11). Như vậy, theo một số phương án, sáng chế đề xuất rằng việc xử lý bằng (ví dụ, khẩu phần ăn chứa và/hoặc việc sử dụng) SEL-PLEX so với việc xử lý bằng (ví dụ, khẩu phần ăn chứa và/hoặc việc sử dụng) phân đoạn SGP được chiết từ SEL-PLEX, dẫn đến hoạt tính sinh học khác nhau mặc dù các nguồn selen khác nhau thể hiện tác dụng tương tự đối với độ sinh khả dụng của selen.

Ví dụ 5

Sự bao nang selenoglycoprotein bằng polymersom

Hỗn hợp 1:1 của các SGP kết tủa ở độ pH 4,0 và 6,0 (Xem Ví dụ 1 và 2) được bao nang trong polymersom. Hàm lượng selen của hỗn hợp này là 3,054 ppm và chứa 79,96 % khối lượng protein.

Để tạo ra selenoglycoprotein được bao nang trong polymersom, hỗn hợp này được hòa tan trong chất đệm gốc nước có độ pH 5,1, 6,2 và 7,4, và hỗn dịch được trộn qua đêm trên bộ lắc. SGP không hòa tan được tách ra bằng cách ly tâm. Để tạo ra polymersom, copolyme hai khối gốc PEO(2k)-b-PCL(12k) được hòa tan trong dung môi hữu cơ (ví dụ, metylen clorua, tetrahydrofuran, hoặc dimetyl sulfoxit) để tạo thành 1 mM polyme PEO-b-PCL trong dung dịch hữu cơ. Sau đó, dung dịch được lắng trên dải TEFLON ráp (độ dày khoảng 1" x 1" x 1/16") và được đặt trên đáy của lọ thủy tinh, mặt ráp hướng lên trên. Dung môi được làm bay hơi trong chân không ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 24-48 giờ, tạo ra màng được làm khô của copolyme cân nặng 1-10 mg.

Sau đó, các màng này được hydrat hóa với 2-3 ml dung dịch gốc nước chứa tỷ lệ 1:1 của selenoglycoprotein ở độ pH 4,0 và pH 6,0, và sau đó được khuấy âm trong bể khuấy âm ở 20- 100 Hz trong 1-2 giờ. Sau khi kết thúc khuấy âm, lọ được tạo xoáy ngay

trong 1-2 phút để tạo thành polymersom mà bao nang selenoglycoprotein trong lõi chứa nước của bong polyme gốc PEO-b-PCL. Sau đó, polymersom được ép đều nhanh chóng qua màng polycarbonat có cỡ lỗ mong muốn sử dụng thiết bị đều LIPOSOFAST để thu được đường kính trung bình mong muốn của polymersom, trong trường hợp này, nằm trong khoảng từ 50-300 nm. Sau đó, polymersom đã được ép đều được bơm vào cát xét thẩm tách để trao đổi dung dịch đối với dung dịch đệm đẳng thẩm thấu (iso-osmotic) có pH 7,4 trong 24 giờ để cho tất cả selenoglycoprotein chưa được bao nang được loại bỏ.

Mẫu selenoglycoprotein được bao nang bằng polymersom ở pH 7,4 được điều chế với nồng độ selenoglycoprotein ban đầu bằng 10 mg/ml và được thẩm tách đối với dung dịch đệm PBS đẳng thẩm thấu. Mẫu này được tạo ảnh bằng cryo-TEM ở mức khuếch đại 21.000x và 52.000x để thu được sự nhận diện trực quan đối với sự bao nang selenoglycoprotein thành công bên trong polymersom (xem Fig.13). Cryo-TEM cho phép tạo ảnh mẫu vật ở nhiệt độ làm lạnh ở trạng thái được hydrat hóa tự nhiên của chúng nhờ đó ngăn ngừa được sự thay đổi hình dạng không mong muốn bất kỳ. Nhìn chung, polymersom hình cầu đồng nhất có kích thước khoảng 100 nm hoặc nhỏ hơn một chút được quan sát thấy trong mẫu đã được tạo ảnh. Trong một số trường hợp, các khối kết tụ gần như hình cầu của nguyên liệu vô định hình được quan sát thấy ngoài polymersom. Các khối kết tụ này có thể bao gồm selenoglycoprotein được giải phóng từ lõi polymersom và kết tụ thêm do độ chênh lệch pH từ bên trong đến bên ngoài polymersom ở thời điểm mẫu được tạo ảnh.

Selenoglycoprotein được bao nang bằng polymersom ở độ pH 5,1, 6,2 và 7,4 được xác định đặc điểm thêm bằng cách xác định hàm lượng selen (Xem, Bảng 6). Một ml của mỗi mẫu selenoglycoprotein được bao nang bằng polymersom được làm khô đông lạnh, tạo thành chất kết tủa dạng bột màu trắng mà sau đó được cân và được kiểm tra dưới mức khuếch đại 200X. Toàn bộ lượng selenoglycoprotein được bao nang bằng polymersom được hòa tan bằng cách sử dụng axit đặc: axit perchloric, axit nitric và axit clohydric, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 175°C. Dung dịch được pha loãng đến 50 ml bằng cách sử dụng nước được khử ion (DI) và được phân tích bằng cách sử dụng thiết bị và phương pháp của MILLENIUM EXCALIBUR.

Bảng 6. Kết quả bao nang

Chế phẩm	Độ pH của quá trình bao nang	Viên nang nano (mg)	Nồng độ Se (ppm)
	Đối chứng âm (không có selen)	8,0	0,02
1	5,1	4,6	46,5
2	6,2	3,3	39,6
3	7,4	8,4	32,2

Ví dụ 6

Sự giải phóng của selenoglycoprotein khỏi viên nang nano:

Sự giải phóng của selenoglycoprotein (SGP) khỏi chế phẩm viên nang nano # 1 và 3 từ Bảng 6 ở trên, được chuẩn bị với 10 mg/ml hỗn dịch SGP và được thẩm tách so với chất đệm có độ pH 7,4 và 5,1, một cách tương ứng, được theo dõi trong khoảng thời gian 14 ngày ở nhiệt độ 37°C. Để theo dõi sự giải phóng của selenoglycoprotein từ selenoglycoprotein được bao nang trong viên nang nano, hỗn dịch đã được thẩm tách được cô bằng cách ly tâm màng (ống ly tâm với điểm cắt khối lượng phân tử bằng 300 kD được sử dụng). Hỗn dịch đã được cô được định phần phân ước vào các chất đệm đẳng thẩm thấu (độ pH bằng 5,1 hoặc 7,4) và được giữ ở nhiệt độ 37°C với mẫu N = 2 đối với mỗi thời điểm. Để đánh giá % giải phóng của selenoglycoprotein từ viên nang nano, mẫu được ly tâm để tách các viên nang nano nguyên vẹn ở mỗi thời điểm. Để đánh giá rằng viên nang nano được tách riêng một cách hữu hiệu khỏi mẫu selenoglycoprotein, các phép xác định sự tán xạ ánh sáng động được tiến hành trên các bọt đã được tách riêng (retentate) và dung dịch tự do (phần dịch lọc) để xác định kích thước hạt. Độ hấp thụ UV của dung dịch tự do được xác định ở 280 nm và % giải phóng của selenoglycoprotein được tính toán dưới dạng $(A_{\text{mẫu}} - A_{\text{ban đầu}}) / (A_{\text{cuối cùng}} - A_{\text{ban đầu}})$, trong đó $A_{\text{ban đầu}}$ là độ hấp thụ ở ngày 0, và $A_{\text{cuối cùng}}$ là độ hấp thụ vào cuối nghiên cứu khi mẫu được làm hòa tan để gây ra sự giải phóng hoàn toàn (xem Fig.12). Trong khoảng thời gian 14 ngày, khoảng 70% SGP ở pH 5,1 được giải phóng từ viên nang nano ở trạng thái ổn định; trong khi đó khoảng 50% được giải phóng ở độ pH 7,4. Tốc độ giải phóng ban đầu của các SGP ở độ pH thấp hơn được tin là do sự thủy phân

được xúc tác bởi axit của màng viên nang nano, sau đó là sự khuếch tán ổn định của selenoglycoprotein qua màng viên nang nano. Các profin giải phóng này là tương tự rõ rệt với profin giải phóng của doxorubixin, một chất trị liệu ung thư, được bao nang bên trong polymersom gốc PEO-b-PCL (Xem Ghoroghchian et al. *Macromolecules*, 2006, 39 (5), 1673-1675). Các dữ liệu này xác nhận rằng việc bao nang selenoglycoprotein ngay cả ở nồng độ nạp tương đối cao không ảnh hưởng đến kiểu giải phóng theo cách âm tính.

Ví dụ 7

Điều chế polyme giải phóng chậm selenoglycoprotein (SGP)

Tổng hợp polyme A. Hỗn hợp 1:1 của các SGP kết tủa ở độ pH 4,0 và 6,0 (Xem, Ví dụ 5) được sử dụng trong điều chế polyme giải phóng chậm SGP. 150 mg SGP được hòa tan trong 2 ml axit metacrylic và 1 ml nước DI. Áp dụng gia nhiệt để tăng tốc sự hòa tan. Mẫu chứa 0,5 ml dung dịch được đặt trong lọ dung tích 5 ml chứa 10 mg AIBN, được xoay cuộn trong 1 phút và không khí từ ống được loại bỏ trong chân không và được thay thế bằng nitơ. Hàm lượng chứa trong ống được polyme hóa bằng cách đặt ống vào lò thí nghiệm được gia nhiệt đến 70°C trong 2 giờ. Ống được phá vỡ và polyme được cắt thành các phần mỏng và được làm khô ở chân không cao.

Tổng hợp polyme B. Hỗn hợp chứa: 0,064ml axit metacrylic, 0,091ml 2-hydroxyethyl-metacrylat, 1,427ml etylen glycol dimetacrylat và 10mg AIBN được đặt trong lọ 5 ml và được khuấy bằng thanh khuấy từ, sau đó là 75mg SGP được hòa tan trong hỗn hợp của 1,5ml axit axetic và 0,75ml nước DI. Không khí trong lọ được thay thế bằng nitơ và lọ được bít kín và được đặt trong bể dầu ở nhiệt độ 70°C trong 4 giờ. Lọ được phá vỡ và phần polyme nguyên khối được nghiền thành bột trong thiết bị nghiền sứ. Chất dễ bay hơi được loại ra khỏi polyme trong điều kiện chân không cao.

Sự giải phóng SGP theo thời gian. Áp dụng cùng quy trình giải phóng chậm SGP đối với mỗi trong số các polyme (A và B). 333,7 ± 0,1 mg polyme được đặt trong ống ly tâm dung tích 15 ml chứa 5ml dung dịch đệm xitrat (pH 5,0) và ống được lắc nhẹ trong 4 giờ. Sau đó, ống được ly tâm và dịch nổi bề mặt được thu gom trong khi đó viên tròn polyme được rửa bằng hai thể tích 8 ml của nước DI và được làm khô đông lạnh. ~21 mg được lấy ra khỏi mẫu đã được làm khô đông lạnh để phân tích Se. Các lần chiết SGP được lặp lại nhiều hơn hai lần. Khối lượng của mẫu được ghi lại. Tất cả các mẫu

đều có sự tồn thất khối lượng trong các xử lý này (Xem, các Bảng 8 và 9).

Bảng 8

Miligam của polyme giải phóng				
Polyme	Ban đầu	Sau khi rửa lần thứ nhất	Sau khi rửa lần thứ hai	Sau khi rửa lần thứ ba
A	333,6	271,4	235,6	207,8
B	333,6	301,6	281,1	254

Bảng 9

Miligam của polyme được lấy để phân tích Se				
Polyme	Ban đầu	Sau khi rửa lần thứ nhất	Sau khi rửa lần thứ hai	Sau khi rửa lần thứ ba
A	21,1	20,5	20,9	20,6
B	20,6	20,5	20,6	20,8

Để ước tính hàm lượng của SGP được giải phóng, độ hấp thụ UV ở 280 nm của các dịch nổi bề mặt được xác định và so với đường cong hiệu chuẩn SGP được điều chế trong cùng dung dịch đệm (Xem, Bảng 10).

Bảng 10

Polyme A				
	abs	ml trong 2ml dịch pha loãng	mg SGP/ml trong dung dịch ban đầu	mg SGP được giải phóng trong một khoảng thời gian
Rửa lần thứ nhất	0,298	0,1	0,781	3,907
Rửa lần thứ hai	0,349	0,5	0,183	0,913
Rửa lần thứ ba	0,353	Không được pha loãng	0,046	0,231
Polyme B				
	abs	ml trong 2ml dịch pha loãng	mg SGP/ml trong dung dịch ban đầu	mg SGP được giải phóng trong một khoảng thời gian
Rửa lần thứ nhất	0,35	0,25	0,366	1,831
Rửa lần thứ hai	0,572	Không được pha loãng	0,074	0,372
Rửa lần thứ ba	0,251	Không được pha loãng	0,033	0,165

Phổ hấp thụ nguyên tử (sử dụng phương pháp và thiết bị EXCALIBUR) được áp dụng để xác định nồng độ của Se còn lại trong polyme giải phóng chậm (Xem, Bảng 11).

Bảng 11

Mẫu	Polyme A Nồng độ Se (ppm)	Polyme B Nồng độ Se (ppm)
Mẫu ban đầu	318,6	127,1
Sau lần rửa thứ nhất	268,8	116,1
Sau lần rửa thứ hai	222,3	108,7
Sau lần rửa thứ ba	215,3	92,3

Theo các phép xác định nồng độ Se trong các viên tròn còn lại, 36,08% SGP được giải phóng từ Polyme A, sau ba lần rửa, mỗi lần 4 giờ (tổng cộng 12 giờ). Trong cùng quá trình xử lý, 30,11% SGP được giải phóng từ Polyme B.

Ví dụ 8

Chiết protein nấm men nội bào bằng kiềm

200,0g SEL-PLEX được trộn với 1L natri hydroxit 0,1M ở pH 11,5 và được gia nhiệt ở 60°C trong 8 giờ. Sau đó, hỗn hợp được ly tâm ở tốc độ 14.000x g/10 phút/10°C tạo thành dịch nổi bề mặt và viên tròn. Viên tròn được rửa hai lần bằng 400ml nước DI và được sấy khô đông lạnh, tạo ra khối lượng bằng 54,5 g (Xem, Bảng 12). Dịch nổi bề mặt ở độ pH 11,5 và các dung dịch nước rửa đã được sử dụng được trộn cùng nhau. Độ pH được làm giảm xuống 6,6 bằng cách trung hòa có sử dụng axit clohydric đặc. Lượng vết nhỏ của chất kết tủa và dịch nổi bề mặt trong suốt được tạo thành trong quá trình trung hòa. Chất kết tủa được tách ra bằng cách ly tâm và dịch nổi bề mặt được cô bằng cách sử dụng thiết bị siêu lọc AMICON 10kDa. Chất cô được rửa bằng hai phần 100ml nước DI và được sấy khô đông lạnh, tạo ra 64,0g chất rắn màu nâu. Phần dịch lọc còn lại được kết hợp (thể tích tổng cộng 2l) và được phân tích về nồng độ selen. Chất kết tủa đã được tách riêng được phân tích về selen và nitơ/protein (Xem, Bảng 12).

Bảng 12: Chiết bằng kiềm

	Khối lượng (g)	Se (ppm)	Protein (% khối lượng)	Se tổng (mg)	Se (%) của tổng
SEL-PLEX	200,0	1600	37,0	320,0	100,0
Viên tròn sau khi chiết ở pH 11,5	54,5	760	2,9	41,4	12,9
Chất cô ở pH 6,6 MW>10kDa	64,0	1918	52,9	122,8	38,3
Phần dịch lọc 2L MW<10kDa	NA (không được phân tích)	1909	NA	155,8	48,7

Phân tích phần dịch lọc cho thấy 40,7% sự tồn thất khối lượng và 48,7% sự tồn thất selen mà không được thu hồi bằng cách siêu lọc qua màng 10kDa. Việc loại bỏ β -Ái nhân /nhiệt của MeSe-1 và HSe-1 và các dạng được oxy hóa của các nhóm chức này ra khỏi peptit chứa selen, dẫn đến sự phân rã cấu trúc hóa học ban đầu của các SGP và sự tồn thất khối lượng và selen vào phần dịch lọc. Quy trình sản xuất thường được thực hiện trong lĩnh vực kỹ thuật này tạo ra thể tích tăng và nồng độ cao của selen trong phần dịch lọc, điều này dẫn đến tạo ra dòng chất thải mà có thể có hại hoặc có tác động gây

độc (ví dụ, có hại với môi trường). Trái lại, các phương pháp theo sáng chế đưa ra quy trình chiết axit và cất phân đoạn phụ thuộc pH của các SGP từ nấm men đã được làm giàu selen (ví dụ, trong quy trình thương mại trên quy mô lớn). Trong các điều kiện nhiệt độ thay đổi, đã phát hiện thấy rằng kỹ thuật truyền thống/thông thường sử dụng sự thủy phân bằng kiềm không có hiệu quả đối với việc chiết selenoglycoprotein từ tế bào nấm men. Như được nêu trong bản mô tả này, việc chiết các SGP từ tế bào nấm men sử dụng phương pháp chiết axit được phát hiện thấy là thành công.

Tài liệu tham khảo

1. Demirci A., Pometto III A. L. 'Enhanced Organically Bound Selenium Yeast Production By Fed-Batch Fermentation' J. Agric. Food Chem. 47, 2496-2500 (1999).
2. Demirci A., Pometto III A. L. 'Production of Organically Bound Selenium Yeast by Continuous Fermentation' J. Agric. Food Chem. 47, 2491-2495 (1999).
3. Ouerdane L., Mester Z. 'Production and Characterization of Fully Selenomethionine-Labelled *Saccharomyces cerevisiae*' J. Agric. Food Chem. 56, 11792-11799, (2008).
4. Korhola.M.; Vainio, A.; Edaelman, K. 'Selenium yeast' Ann. Clin. Res. 18, 65-68, (1986).
5. Surai P.F. Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction' Nottingham University Press 2002, 234-236 (2002).
6. Kelly, M. P.; Power R. F. ' Fractionation and identification of the major selenium compounds in selenized yeast' J. Dairy Sci. 78, 237-242 (1995).
7. McSheehy, S.; Kelly, J.; Tessier, L.; Mester, Z. 'Identification of Selenomethionine in selenized yeast using two-dimentional liquid chromatography-mass spectrometry based proteomic analysis' Analyst 130, 35-37 (2005).
8. Sedmak J. J. 'Production of beta-Glucans and Mannans' US Patent Appl. Publication Pub. No.: US 2006/0263415 A1.
9. Rayman, M.P. 'The importance of selenium to human health' The Lancet 356, 233-241 (2000).
10. McKenzie, R.C.; Rafferty, T.S.; Beckett, G.J. 'Selenium: an essential element for immune function' Trends in Immunology 19, 342-345 (1998).
11. Tapiero, H.; Townsend, D.M.; Tew, K.D. 'The antioxidant role of selenium and selenocompounds' Biomedicine&Pharmacotherapy' 57, 134-144 (2003).
12. Combs, G.F.; Grey, W.P. 'Chemopreventive Agents: Selenium' Pharmacol. Ther. 79, 179-192 (1998).
13. Clark, L.C.; Combs Jr., G.F.; Turnbull, B.W. et all. 'Effects of Selenium Supplementation for Cancer Prevention in Patients with Carcinoma of Skin' J. Am. Med. Assoc. 276, 1957-1963 (1996).

14. Otero, M.A.; Vasallo, M.C.; Verdecia, O.; Fernandez, V.; Betancourt, D. 'A Process for the Complete Fractionation of Baker's Yeast' *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 66, 67-71 (1996).
15. Roberge, M.T.; Borgerding, A.J.; Finley, J.W. 'Speciation of Selenium Compounds from High Selenium Broccoli Is Affected by the Extracting Solution' *J. Agric. Food Chem.* 51, 4191-4197 (2003).
16. Furnsinn et al., *Int. J of Obesity and Related Metab. Dis.*, 19, 458-463 (1995).
17. El-Bayoumy, *The role of selenium in cancer prevention*, Philadelphia, Lippincott, 1-15, 1991.
18. Yu et al. *Biol Trace Elem Res*, 56: 117-124 (1997).
19. Yoshizawa et al., *J Natl Cancer Inst*, 90: 1219-1224, (1998).
20. Brooks, et al., *J Urol*, 166: 2034-2038, (2001).
21. Garland et al., *J. Am. Coll Nutr.*, 12: 400-11 (1993); Ghadirian et al., *Cancer Detect Prev*, 24: 305-13 (2000).
22. Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa. (1975).
23. Goehring et al., *J. Anim. Sci.* 59, 725-732 (1984); Gerloff et al., *J. Anim. Sci.* 70, 3934-3940 (1992).
24. Meister and Anderson, *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711-760 (1983).
25. Deleve and Kaplowitz, *Pharm. Ther.* 52, 287-305 (1991).
26. Palmer and Paulson, *Nutr. Rev.* 55, 353-361 (1997).
27. Salonen et al., *Am. J. Epidemiol.* 120: 342-349 (1984).
28. Willett et al., *Lancet* 2: 130-134 (1983).
29. Virtamo et al., *Cancer* 60: 145-148 (1987).
30. Ip, *J. Nutr.* 128: 1845-1854 (1998).
31. Ip and Daniel, *Cancer Res.* 45: 61-65 (1985).
32. Pence et al., 102: 759-761 (1994).

33. Bedwal, R. S., et al., Medical Hypotheses, 41 (2):150-159 (August 1993).
34. Ferris G. M. Lloyd, et al., App. Clin. Biochem.,26:83-88 (1989).
35. Furnsinn, C. et al., Internat'l J. of Obesity and Related Metab. Dis., 19(7):458-463 (1995).
36. Mahan, Proceedings of the 15th Annual Symposium Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 523-535 (1999).
37. Discher et al. Journal of Physical Chemistry B (2002), 106(11), 2848-2854.
38. Couvreur et al. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2002;19(2):99-134.
39. Mosbach. Trends in Biochemical Sciences, Vol. 7, pp. 92-96, 1994.
40. Wulff. Trends in Biotechnology, Vol. 11, pp. 85-87, 1993.
41. Andersson, et al., Molecular Interactions in Bioseparations (Ngo. T. T. ed.), pp. 383-394.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp điều chế selenoglycoprotein hòa tan bao gồm các bước:

a) cung cấp nấm men được làm giàu selen;

b) cho nấm men được làm giàu selen tiếp xúc với điều kiện axit sau đó là ly tâm để tạo ra i) viên tròn chứa nguyên liệu không tan được trong axit; và ii) pha lỏng chứa chất chiết của nấm men được làm giàu selen hòa tan trong điều kiện axit;

c) làm kết tủa selenoglycoprotein từ pha lỏng chứa chất chiết của nấm men được làm giàu selen hòa tan trong điều kiện axit bằng cách làm tăng độ pH của pha lỏng; và

d) tách selenoglycoprotein đã kết tủa khỏi pha lỏng.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó điều kiện axit thu được bằng cách sử dụng đệm axit hoặc bổ sung axit.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó axit là axit clohydric.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc cho nấm men được làm giàu selen tiếp xúc với điều kiện axit bao gồm việc cho nấm men được làm giàu selen tiếp xúc với độ pH nằm trong khoảng từ 1,5 đến pH 6,5.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó độ pH bằng 1,5.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nấm men được làm giàu selen được cho tiếp xúc với điều kiện axit trong khoảng thời gian từ 1 đến 24 giờ.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nấm men được làm giàu selen được cho tiếp xúc với điều kiện axit trong khoảng thời gian từ 5 đến 10 giờ.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nấm men được làm giàu selen được cho tiếp xúc với điều kiện axit trong khoảng 8 giờ.

9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc cho nấm men được làm giàu selen tiếp xúc với điều kiện axit xảy ra ở nhiệt độ lớn hơn nhiệt độ trong phòng.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 100°C.

11. Phương pháp theo điểm 9, trong đó nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 85°C.

12. Phương pháp theo điểm 9, trong đó nhiệt độ bằng 80°C.

13. Phương pháp theo điểm 1, trong đó selenoglycoprotein được kết tủa từ pha lỏng ở

nhiều điều kiện pH khác nhau để tạo ra nhiều phân đoạn phụ thuộc pH của selenoglycoprotein hòa tan.

14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó nhiều phân đoạn phụ thuộc pH của selenoglycoprotein hòa tan được tạo ra ở giá trị độ pH bằng 1,85, 3,0, 4,0 và 6,0.

15. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc tách enoglycoprotein đã kết tủa khỏi pha lỏng bao gồm ly tâm để tạo ra viên tròn của selenoglycoprotein đã kết tủa sau đó là loại bỏ pha lỏng khỏi selenoglycoprotein đã kết tủa.

16. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này được sử dụng để tạo ra phân đoạn của selenoglycoprotein hòa tan được kết tủa ở giá trị được chọn từ nhóm bao gồm độ pH bằng 1,85, 3,0, 4,0 và 6,0.

17. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nấm men được làm giàu selen là nấm men được làm giàu selen không còn sống, đã được làm khô chứa 2% selen vô cơ hoặc ít hơn.

18. Phương pháp theo điểm 1, trong đó selenoglycoprotein hòa tan hòa tan ở độ pH dưới 1,5, 2, 3, 4, 5, hoặc 6, tốt hơn là 4, 5, hoặc 6.

19. Phương pháp theo điểm 1, trong đó, ở bước c), việc làm tăng độ pH của pha lỏng bao gồm việc làm tăng mức pH của pha lỏng lên 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, hoặc 6,0.

20. Chế phẩm chứa selenoglycoprotein hòa tan, trong đó selenoglycoprotein hòa tan chứa hai hoặc nhiều phân đoạn phụ thuộc pH của selenoglycoprotein, trong đó selenoglycoprotein hòa tan thu được bằng cách chiết axit đối với selenoglycoprotein hòa tan từ nấm men được làm giàu selen và sau đó cho nấm men được làm giàu selen tiếp xúc với điều kiện axit, thông qua sự kết tủa phụ thuộc pH lần lượt ở hai hoặc nhiều giá trị độ pH khác nhau của selenoglycoprotein hòa tan, trong đó selenoglycoprotein hòa tan được tạo ra bằng phương pháp bao gồm các bước:

a) cung cấp nấm men được làm giàu selen;

b) cho nấm men được làm giàu selen tiếp xúc với điều kiện axit sau đó là ly tâm để tạo ra:

i) viên tròn chứa nguyên liệu không tan được trong axit; và

ii) pha lỏng chứa chất chiết của nấm men được làm giàu selen hòa tan

trong điều kiện axit;

c) làm kết tủa selenoglycoprotein từ pha lỏng chứa chất chiết của nấm men được làm giàu selen hòa tan trong điều kiện axit bằng cách làm tăng độ pH của pha lỏng lên 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, hoặc 6,0; và

d) tách selenoglycoprotein đã kết tủa khỏi pha lỏng.

21. Chế phẩm theo điểm 20, trong đó selenoglycoprotein hòa tan hòa tan ở độ pH dưới 1,5, 2, 3, 4, 5, hoặc 6.

22. Chế phẩm theo điểm 21, trong đó selenoglycoprotein hòa tan hòa tan ở độ pH dưới 4, 5, hoặc 6.

23. Chế phẩm theo điểm 20, trong đó chế phẩm này còn chứa chất mang.

24. Chế phẩm theo điểm 23, trong đó chất mang được chọn từ nhóm bao gồm polymersom, polyme giải phóng chậm, viên nang nano, và polyme được khắc phân tử, tốt hơn là:

trong đó chất mang là polyme giải phóng chậm, hoặc

trong đó chất mang là polymersom được sử dụng để bao nang selenoglycoprotein, tốt hơn là:

trong đó polymersom bao gồm copolyme khối poly(etylen oxit) (PEO), hoặc

trong đó polymersom bao gồm copolyme hai khối poly(ϵ -caprolacton) (PCL), hoặc:

trong đó polymersom bao gồm copolyme hai khối gốc poly(etylen oxit)-khối-poly(ϵ -caprolacton) (PEO-b-PCL), hoặc

trong đó polymersom thu được từ việc liên hợp poly(axit lactic), poly(glycolit), poly(axit lactic-coglycolic) hoặc poly(3-hydroxybutyrat) với PEO.

25. Chế phẩm theo điểm 24, trong đó đường kính trung bình của selenoglycoprotein được bao nang bằng polymersom là 50-300 nm.

Fig.1

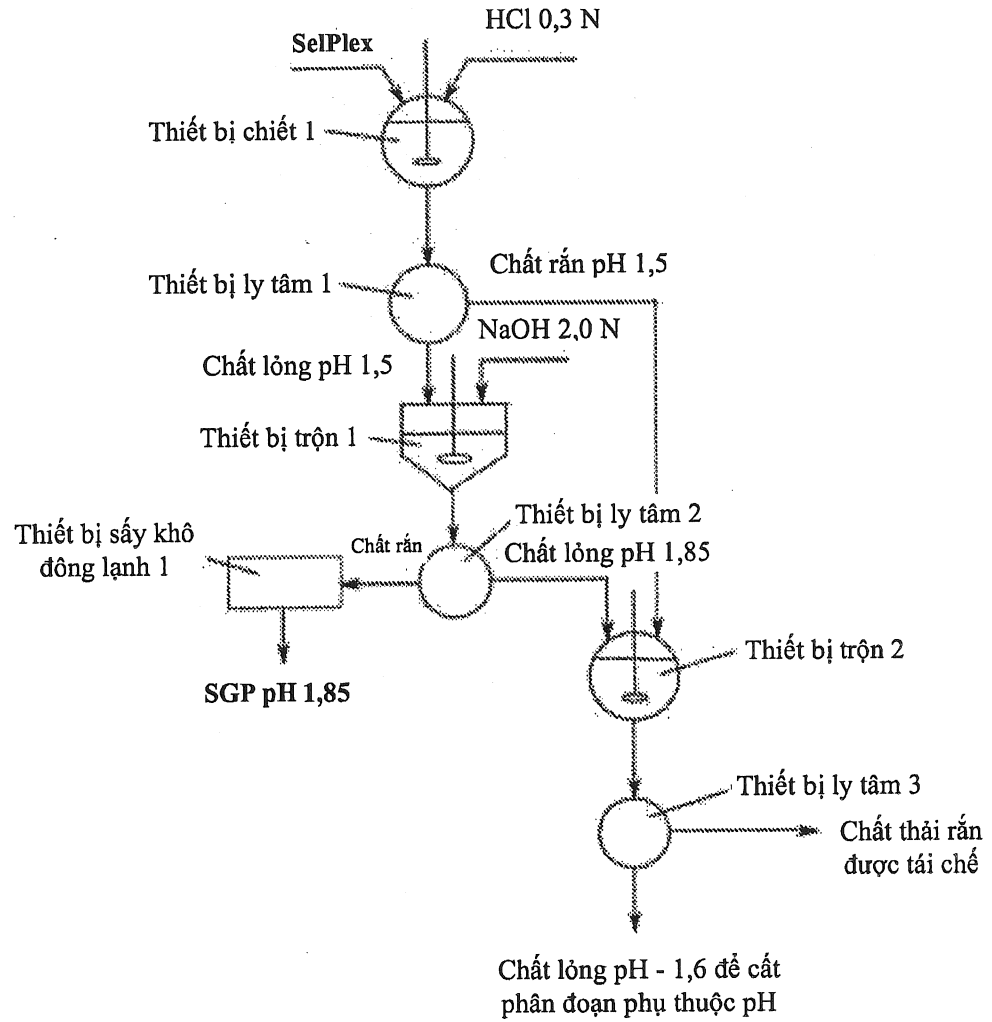


Fig.2

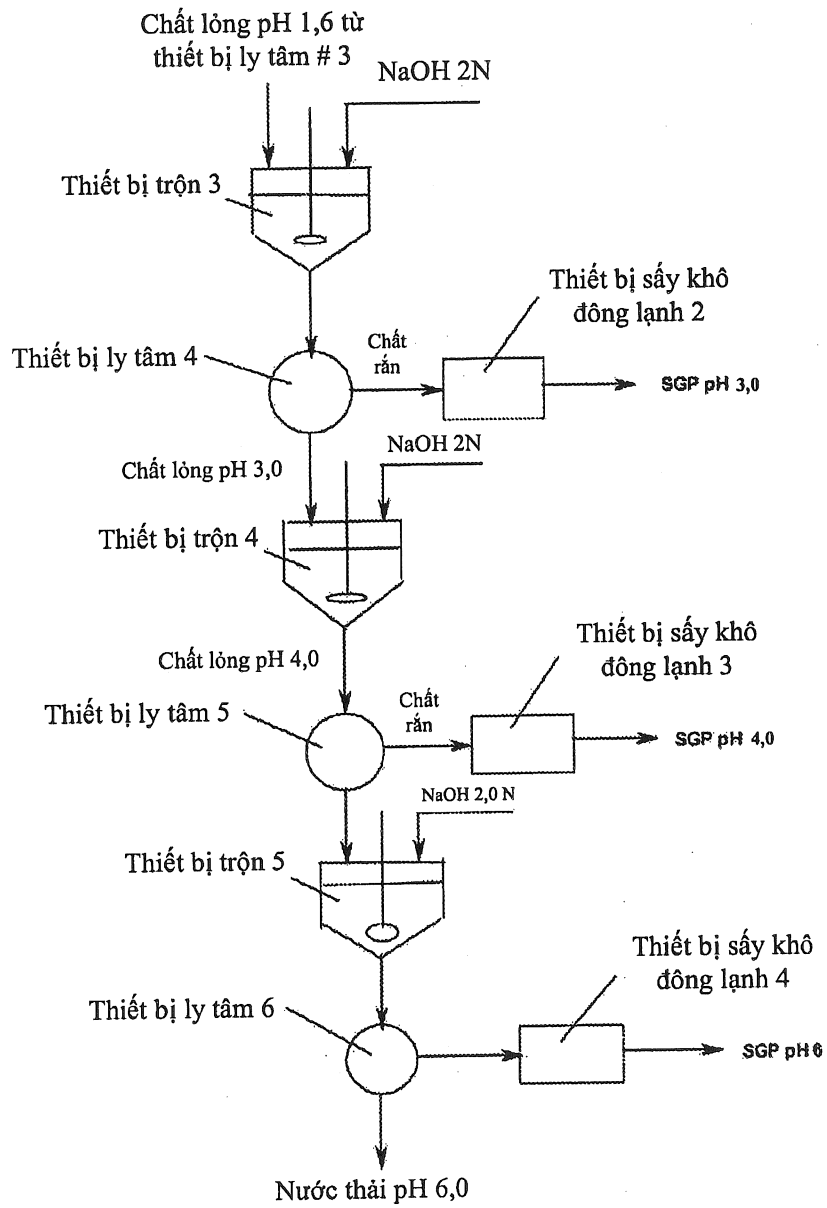
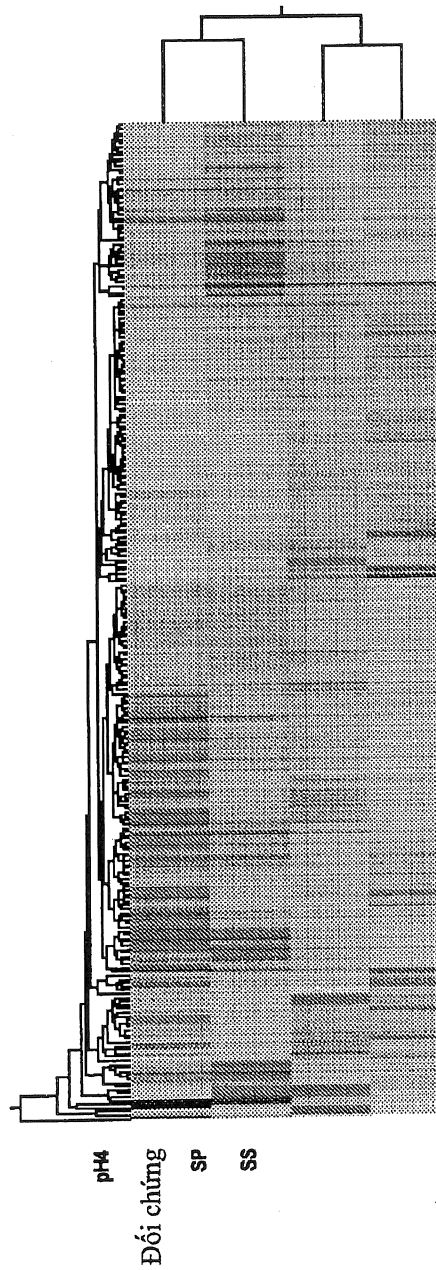


Fig.3



* Màu trắng = điều hoà giảm, Màu xám = không thay đổi, Màu đen = điều hoà tăng sự biểu hiện gen tương đối

Fig.4

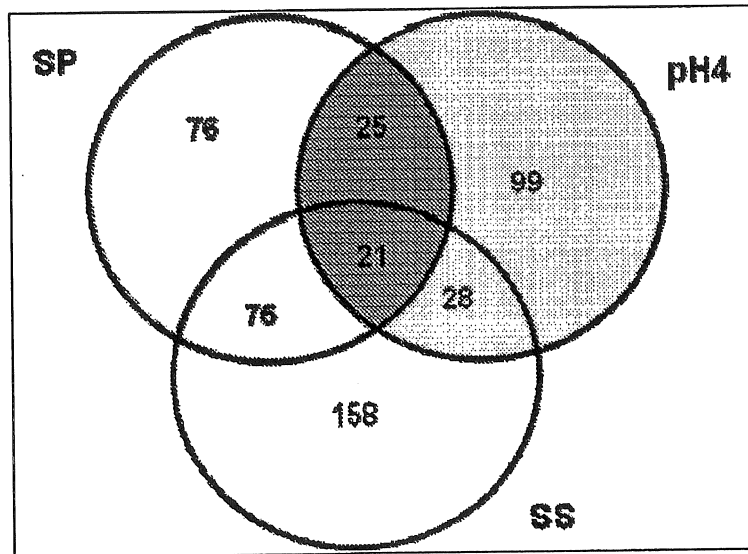
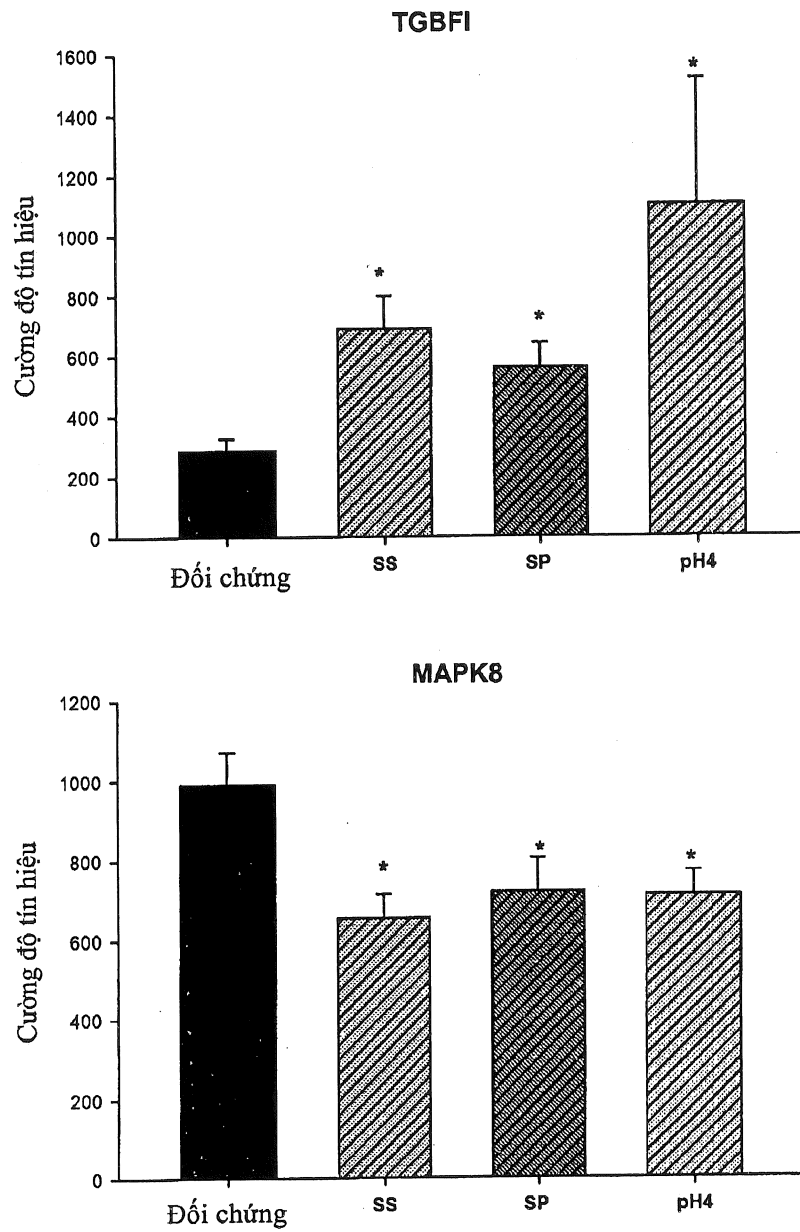
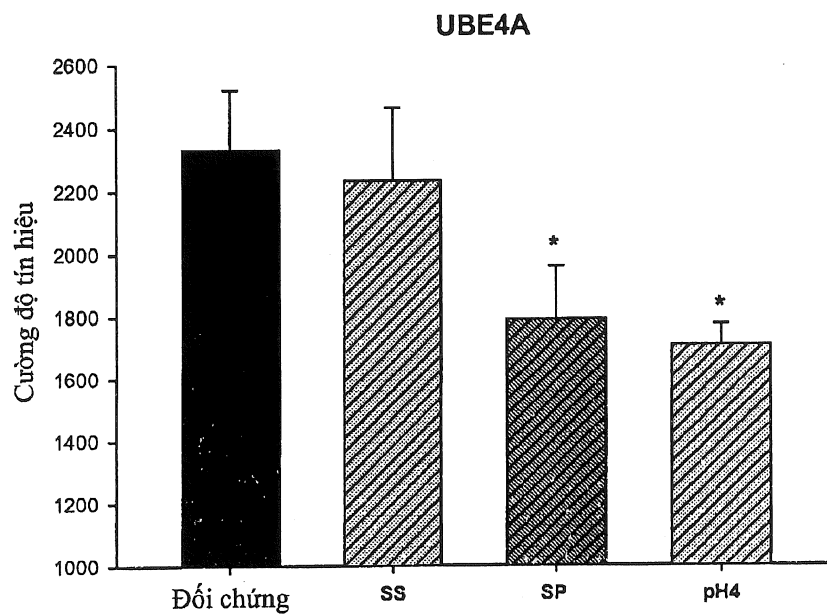
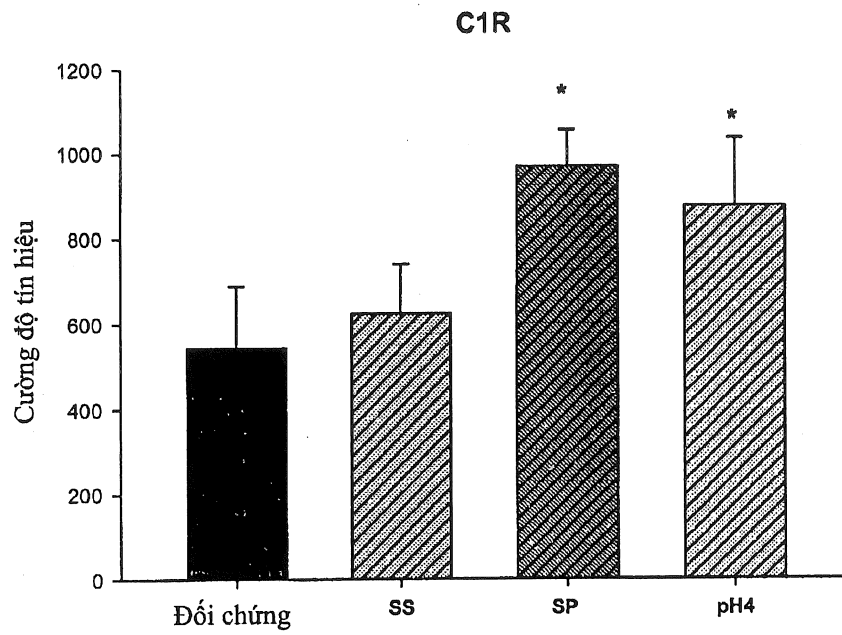


Fig.5



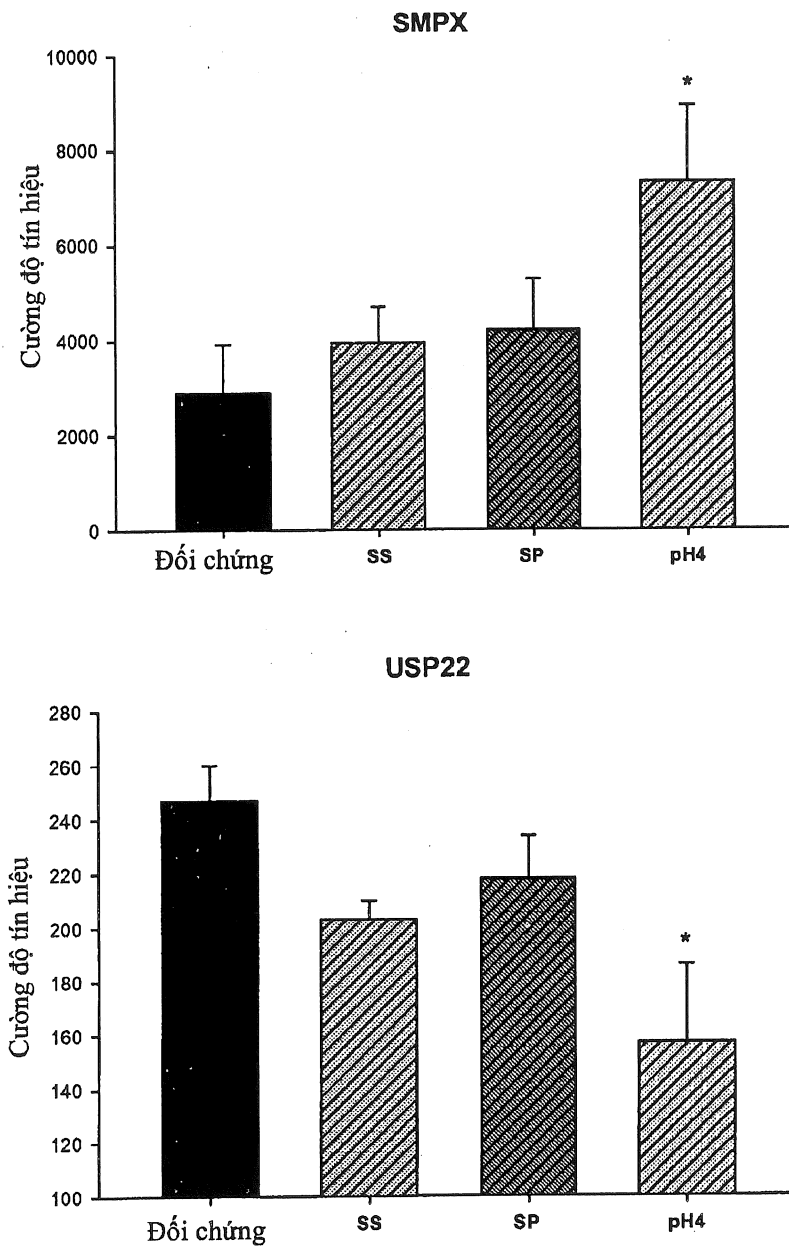
* $p < 0,05$

Fig.6



* $p < 0,05$

Fig.7



* $p < 0,05$

Fig.8

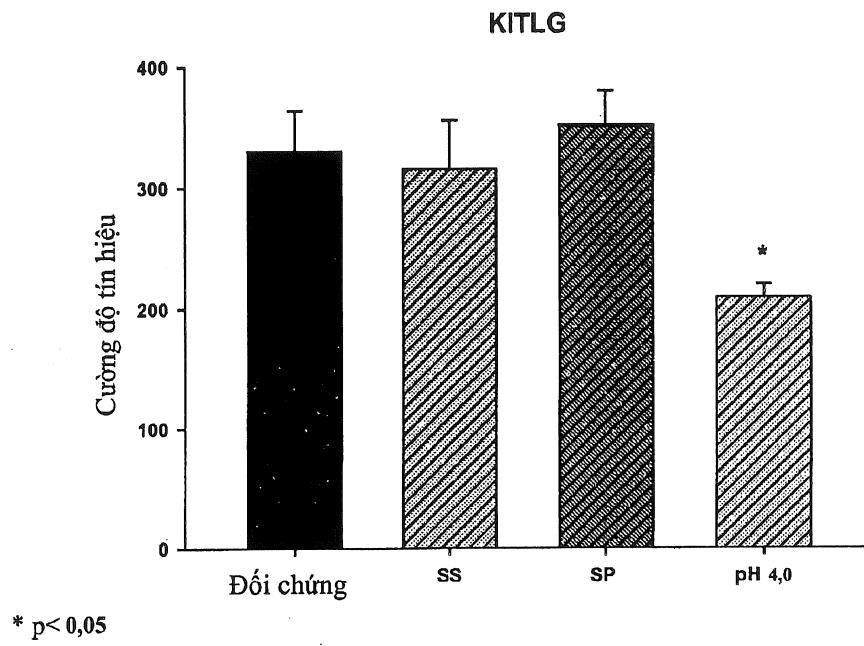
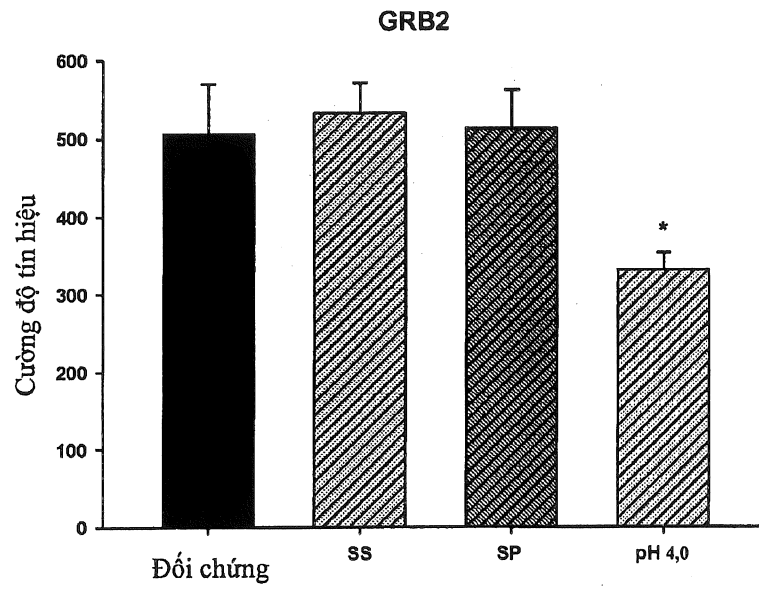
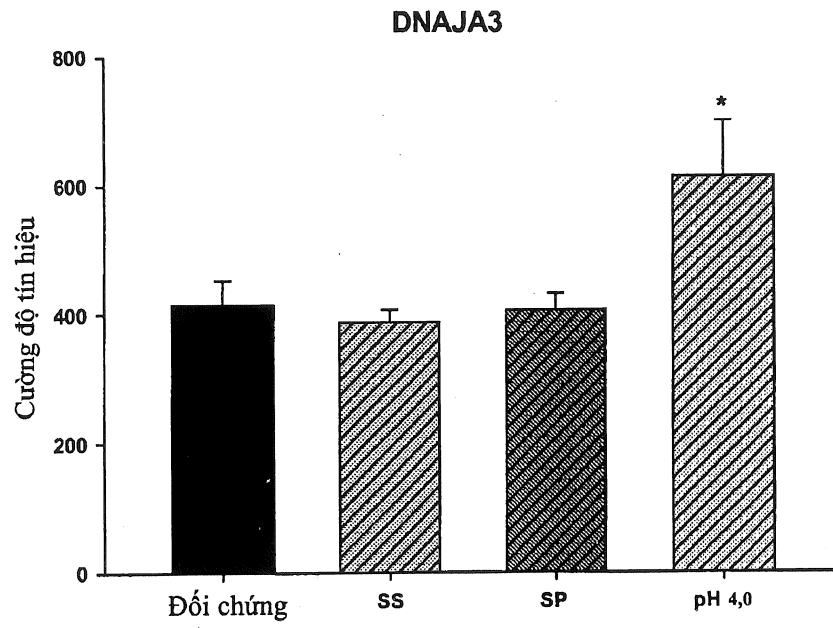


Fig.9



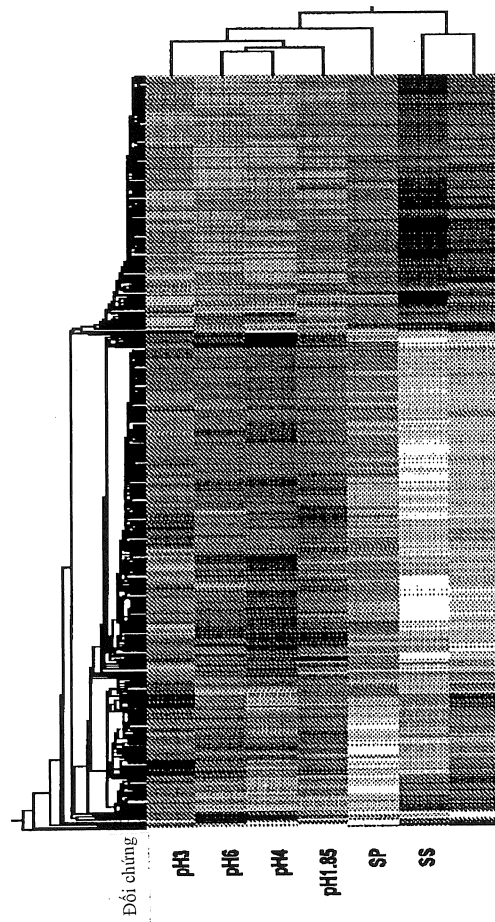
*p < 0,05

Fig.10



* $p < 0,05$

Fig.11



* Màu trắng = điều hoà giảm, Màu xám = không thay đổi, Màu đen = điều hoà tăng sự biểu hiện gen tương đối

Fig.12

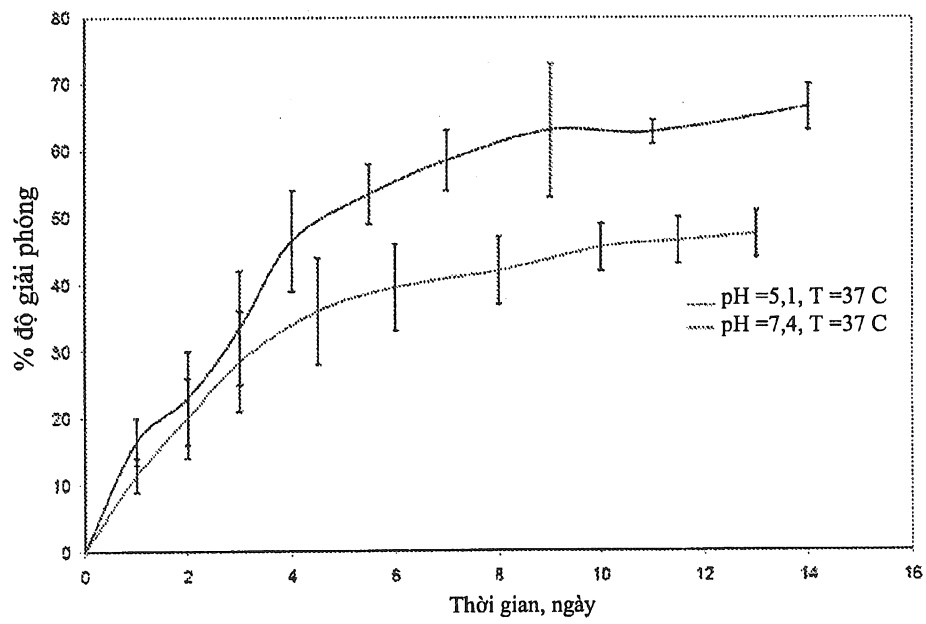


Fig.13

