



(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)



1-0027367

(51)<sup>7</sup> A61K 38/39

(13) B

(21) 1-2016-00434

(22) 08/07/2014

(86) PCT/US2014/045687 08/07/2014

(87) WO2015/006287 15/01/2015

(30) 61/843,662 08/07/2013 US

(45) 25/02/2021 395

(43) 27/06/2016 339A

(73) INTERNATIONAL DEHYDRATED FOODS, INC. (US)

P.O. Box 10347, Springfield, MO 65808, United States of America

(72) DAKE, Roger, L. (US); LYNCH, Stephanie (US); DURHAM, Paul, L. (US); CADY, Ryan, J. (US); HAWKINS, Jordan, L. (US).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHẾ PHẨM ĐIỀU CHẾ TỪ CÁC BỘ PHẬN GIA CẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm điều chế từ các bộ phận gia cầm và phương pháp điều chế chế phẩm này. Nguyên liệu gia cầm đã chọn được chế biến để thu được chế phẩm canh thang chứa hàm lượng protein cao. Chế phẩm canh thang này chứa một số axit amin thiết yếu ở hàm lượng cao hơn đáng kể so với chế phẩm canh thang điều chế tại hộ gia đình và các chế phẩm khác có bán trên thị trường. Chế phẩm canh thang này đặc biệt hữu hiệu trong phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh về khớp đồng thời có các giá trị dinh dưỡng và có lợi cho sức khỏe khác.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến chế phẩm điều chế từ các bộ phận gia cầm và phương pháp điều chế chế phẩm này.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Chế phẩm canh thang từ gà là hỗn hợp chứa nhiều chất chiết thu được bằng cách hầm các bộ phận của gà hoặc toàn bộ con gà. Do các chế phẩm canh thang từ gà có thể có thành phần khác nhau, nên các chế phẩm này cũng có giá trị dinh dưỡng và có lợi cho sức khỏe khác nhau. Thành phần chính của chế phẩm canh thang từ gà là protein hòa tan gồm albumin và nhiều protein khác. Chế phẩm canh thang từ gà có thể chứa nhiều hợp chất khác. Ví dụ về các hợp chất này bao gồm chất khoáng, hợp chất hữu cơ, nucleotit, chất chuyển hóa, lipid, phospholipit, vitamin và các hợp chất khác. Theo phương pháp chế biến truyền thống tại hộ gia đình, chế phẩm canh thang từ gà được điều chế bằng cách hầm một hoặc nhiều bộ phận gia cầm trong nước và/hoặc hơi nước trong thời gian dài. Các chế phẩm canh thang điều chế từ nguyên liệu khác nhau có thể có thành phần khác nhau. Ngay cả khi cùng loại nguyên liệu được sử dụng, sự khác biệt đôi chút của các quy trình chế biến cũng có thể tạo ra các chế phẩm canh thang có thành phần khác nhau.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm canh thang điều chế từ gia cầm và phương pháp điều chế chế phẩm này và mô tả việc sử dụng chế phẩm này. Theo một phương án, chế phẩm này có thể được điều chế từ gia cầm, ví dụ gà, gà tây, hoặc các gia cầm khác. Theo một phương án khác, chế phẩm theo sáng chế có thể được điều chế từ bộ phận của các nguồn động vật khác. Theo một phương án khác, chế phẩm này có thể được điều chế dưới dạng chế phẩm canh thang, chế phẩm đậm đặc, chế phẩm chiết xuất, hoặc chế phẩm dạng bột.

Theo một khía cạnh, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa các hợp chất có lợi với hàm lượng cao. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa các hợp chất có lợi với hàm lượng cao hơn các chế phẩm canh thang có bán trên thị trường. Theo một khía cạnh khác, một hoặc nhiều thành phần khác có thể được bổ sung vào chế phẩm

canh thang này để đạt được các giá trị có lợi cho sức khỏe mà không có nguồn gốc từ chế phẩm canh thang điều chế từ gà. Ví dụ về các thành phần bổ sung này có thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở chiết xuất gừng, chiết xuất cà phê, chiết xuất nhân sâm, chiết xuất chè xanh, chiết xuất của các thực vật khác như chiết xuất vỏ cây liễu hoặc cây nhũ hương, curcumin/turmeric, axit béo omega-3, dầu cá, dầu nhuễn thể, dầu táo, chiết xuất pycnogenol từ vỏ cây thông biển, chiết xuất hạt nho, chiết xuất hạt lanh, ribonucleaza, angiogenin, lactoferrin, lactoferrin giàu ribonucleaza, S-adenosyl metionin, collagen, protein collagen hoặc peptit collagen, gelatin, chiết xuất quả bơ/đậu tương không có khả năng xà phòng hóa, chiết xuất hoa hublông, màng vỏ trứng, polypeptit có nguồn gốc từ sữa, như casein hoặc nước sữa, metylsulfonylmetan, chiết xuất cây ngọc giá, chiết xuất cây móng quỳ, bromelain, axit glutamic, ca cao, chiết xuất cây la hán, vitamin E, vitamin D3, chiết xuất quả óc chó, v.v. Theo một khía cạnh, chế phẩm canh thang theo sáng chế có thể chứa collagen, protein collagen và/hoặc peptit collagen với hàm lượng tương đối cao. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm canh thang theo sáng chế có thể chứa collagen, protein collagen và/hoặc peptit collagen một cách tự nhiên với hàm lượng tương đối cao. Theo một khía cạnh khác, collagen, protein collagen và/hoặc peptit collagen có thể được bổ sung với hàm lượng tương đối cao vào chế phẩm canh thang theo sáng chế dưới dạng thành phần bổ sung.

### **Mô tả văn tắt hình vẽ**

Fig.1 là hình ảnh thể hiện đặc tính protein bằng cách nhuộm protein được phân tách bằng phương pháp điện di trên gel SDS-PAGE.

Fig.2 là hình ảnh thể hiện mức độ biểu hiện PKA bị ức chế đáng kể ở chuột thử nghiệm được sử dụng chế phẩm canh thang AAC1 so với chuột thử nghiệm được sử dụng chế phẩm có bán trên thị trường TSN.

Fig.3 là biểu đồ thể hiện hiệu quả giảm đau của chế phẩm AAC1 so với chế phẩm có bán trên thị trường.

Fig.4 là hình ảnh thể hiện đặc tính protein bằng cách nhuộm protein được phân tách bằng phương pháp điện di trên gel SDS-PAGE và xác định phân bố trọng lượng phân tử.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Theo phương pháp chế biến truyền thống tại hộ gia đình, chế phẩm canh thang từ gà hoặc gà tây có thể được điều chế bằng cách hầm trong thời gian dài trong nồi không đáy kín hoặc ở nhiệt độ cao trong nồi áp suất. Trái lại, sáng chế đề xuất chế phẩm canh thang có thành phần đồng nhất và phương pháp điều chế chế phẩm này. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp chọn lọc và chế biến nguyên liệu, hầm nguyên liệu, và phân tách và tinh chế chế phẩm canh thang thu được.

Theo một phương án, nguyên liệu từ gia cầm hoặc các nguồn động vật khác có thể được nghiền thành các miếng có kích cỡ nhỏ để tối ưu hóa hiệu suất chiết nhiều hợp chất có lợi. Theo một khía cạnh, nguyên liệu gia cầm có thể được nghiền thành các miếng có kích cỡ nhỏ hơn khoảng 2cm, 1cm, 5mm, 4mm, 3mm, 2mm, hoặc nhỏ hơn 2mm. Việc xử lý cơ học các bộ phận gia cầm thành các miếng có kích cỡ nhỏ trước khi hầm có thể giúp chiết xuất tối ưu một số hợp chất. Theo một phương án khác, do các bộ phận gia cầm đã được xử lý cơ học thành các miếng có kích cỡ rất nhỏ trước khi hầm, nên điều kiện hầm êm dịu hơn (ví dụ, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 100°C) hoặc thời gian hầm ngắn hơn (nằm trong khoảng từ 8 phút đến 300 phút) có thể được sử dụng để thu được chế phẩm canh thang từ các bộ phận gia cầm đã xử lý này. Điều kiện hầm êm dịu và thời gian hầm ngắn như vậy có thể giúp ngăn ngừa bất hoạt một số hợp chất mà sẽ bị bất hoạt khi các phương pháp chế biến và hầm thông thường được sử dụng. Do ngăn ngừa được sự mất hoạt tính của các hợp chất này, nên chế phẩm canh thang theo sáng chế có lợi cho sức khỏe hơn các chế phẩm canh thang khác không được điều chế theo phương pháp của sáng chế.

Theo một phương án khác, các bộ phận gia cầm gồm xương và sụn có thể được phân tách cơ học và nghiền thành các miếng có kích cỡ nhỏ hơn 5mm, 4mm, 3mm, 2mm, hoặc 1mm. Theo một khía cạnh, không cần bước loại bỏ các phần thịt còn sót khỏi xương. Các miếng nhỏ này có thể được hầm ở nhiệt độ khoảng 70°C, 100°C, 110°C, 120°C, hoặc ở nhiệt độ cao 150°C, trong ít nhất 8 phút, 15 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, hoặc 6 giờ hoặc lâu hơn để chiết xuất tối ưu một số thành phần và/hoặc hợp chất có lợi.

Theo một phương án khác, chế phẩm canh thang theo sáng chế có đặc tính protein khác biệt so với các chế phẩm canh thang khác có bán trên thị trường khi phân tích bằng phương pháp điện di trên gel SDS-PAGE. Theo một khía cạnh, ít nhất 10%, 20%, 30%,

40%, 50%, 70%, hoặc 90% protein tổng số trong chế phẩm theo sáng chế có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 10 kD (kilo-Dalton) đến 70 kD. Theo một khía cạnh khác, ít nhất 95% protein trong chế phẩm theo sáng chế có trọng lượng phân tử nhỏ hơn 100 kD. Theo một khía cạnh khác, các phương pháp có thể được sử dụng để làm giảm tiếp trọng lượng phân tử của protein trong chế phẩm canh thang này đến trị số nhỏ hơn 10 kD, 5 kD, hoặc thậm chí nhỏ hơn 3 kD để làm tăng khả năng đồng hóa bởi đối tượng. Ví dụ, một hoặc nhiều enzym phân giải protein có thể được sử dụng để làm giảm trọng lượng phân tử của protein trong chế phẩm canh thang này.

Theo một phương án khác, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa các axit amin prolin và histidin, trong đó tỷ lệ khối lượng giữa prolin và histidin ít nhất bằng 4:1. Theo một khía cạnh, chế phẩm theo sáng chế chứa prolin với hàm lượng ít nhất bằng 8% (khối lượng/khối lượng), 10% hoặc cao hơn tính theo hàm lượng chất rắn. Theo một khía cạnh khác, tỷ lệ khối lượng giữa prolin và histidin ít nhất bằng 6:1.

Theo một phương án khác, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa các axit amin glyxin và histidin, trong đó tỷ lệ khối lượng giữa glyxin và histidin ít nhất bằng 6:1. Theo một khía cạnh, chế phẩm theo sáng chế chứa glyxin với hàm lượng ít nhất bằng 12% (khối lượng/khối lượng), 14% hoặc cao hơn tính theo hàm lượng chất rắn. Theo một khía cạnh khác, tỷ lệ khối lượng giữa glyxin và histidin ít nhất bằng 10:1.

Theo một phương án khác, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa các axit amin hydroxyprolin và histidin, trong đó tỷ lệ khối lượng giữa hydroxyprolin và histidin ít nhất bằng 4:1. Theo một khía cạnh, chế phẩm theo sáng chế chứa hydroxyprolin với hàm lượng ít nhất bằng 7% (khối lượng/khối lượng), 8% hoặc cao hơn tính theo hàm lượng chất rắn. Theo một khía cạnh khác, tỷ lệ khối lượng giữa hydroxyprolin và histidin ít nhất bằng 6:1.

Theo một phương án khác, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa prolin, glyxin, hydroxyprolin và histidin. Theo một khía cạnh, tỷ lệ khối lượng giữa glyxin và histidin ít nhất bằng 6:1. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm theo sáng chế chứa glyxin với hàm lượng ít nhất bằng 12% (khối lượng/khối lượng) tính theo hàm lượng chất rắn. Theo một khía cạnh khác, tỷ lệ khối lượng giữa prolin và histidin ít nhất bằng 4:1. Theo một khía cạnh khác, tỷ lệ khối lượng giữa hydroxyprolin và histidin ít nhất bằng 6:1.

Theo một phương án khác, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa prolin và các axit amin khác, và hàm lượng prolin ít nhất bằng 10% khối lượng tổng axit amin có trong chế phẩm. Theo một phương án khác, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa glyxin và các axit amin khác, và hàm lượng glyxin ít nhất bằng 20% khối lượng tổng axit amin có trong chế phẩm. Theo một phương án khác, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa hydroxyprolin và các axit amin khác, và hàm lượng hydroxyprolin ít nhất bằng 8% khối lượng tổng axit amin có trong chế phẩm.

Theo một phương án khác, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều axit amin mạch nhánh (ví dụ, valin, leucin và isoleucin), và hàm lượng axit amin mạch nhánh trong chế phẩm cao hơn hàm lượng axit amin mạch nhánh trong các chế phẩm canh thang khác. Theo một khía cạnh, tổng hàm lượng axit amin mạch nhánh, bao gồm valin, leucin và isoleucin, ít nhất bằng 5%, 6%, hoặc 7% khối lượng tổng axit amin có trong chế phẩm.

Theo một phương án khác, chế phẩm canh thang theo sáng chế có tỷ lệ khối lượng giữa protein và ẩm nằm trong khoảng từ 999:1 đến 1:999, hoặc nằm trong khoảng từ 200:1 đến 10:1. Ví dụ, tỷ lệ khối lượng giữa protein và ẩm bằng 200:1 có nghĩa là chế phẩm này chứa 200 phần nước và 1 phần đậm (protein). Theo một phương án khác, chế phẩm canh thang theo sáng chế có tỷ lệ khối lượng giữa protein và ẩm nằm trong khoảng từ 150:1 đến 40:1, hoặc nằm trong khoảng từ 135:1 đến 67:1.

Chondroitin sulfat (CS) có nhiều trong sụn và có lợi cho sức khỏe của khớp. Việc chọn lọc nguyên liệu và quy trình điều chế có thể góp phần tạo ra chế phẩm có hàm lượng chondroitin sulfat cao hơn. Theo một phương án, chế phẩm canh thang theo sáng chế có thể chứa chondroitin sulfat với hàm lượng ít nhất bằng 6%, 7%, 8%, hoặc 10% tính theo tổng hàm lượng chất rắn khô có trong chế phẩm này, như được đo bằng thử nghiệm phân giải bằng enzym và phương pháp phân tích LC-UV. Ví dụ, xem Ji et al., *Journal of AOAC International*, Vol. 90, No. 3, 659-69 (2007), được kết hợp vào chế bằng cách viện dẫn.

Theo một khía cạnh, chế phẩm này có thể ở dạng lỏng để dễ sử dụng hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể ở dạng chế phẩm lỏng đậm đặc như chế phẩm đậm đặc. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm này có thể ở dạng rắn, như bột hoặc bột nhão.

Theo một phương án, chế phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều polyphenol, trong đó hàm lượng của polyphenol ít nhất bằng 4000 $\mu$ g/mL đương lượng axit galic (GAE – Gallic Acid Equivalent) như được đo bằng thử nghiệm Folin-Ciocalteu.

Chế phẩm canh thang theo sáng chế khác biệt ở chỗ chế phẩm này có thành phần đồng nhất như mô tả nêu trên. Chế phẩm canh thang theo sáng chế cũng khác biệt ở phương pháp điều chế chế phẩm này. Hơn nữa, chế phẩm canh thang theo sáng chế cũng có giá trị sức khỏe rất cao cho đối tượng. Các đối tượng được chia thành hai nhóm, một nhóm tiêu thụ (hoặc sử dụng) lượng hữu hiệu của chế phẩm canh thang theo sáng chế mỗi ngày, trong khi đó nhóm còn lại tiêu thụ nước, hoặc các chế phẩm canh thang khác. Sau đó, các dấu hiệu khác nhau có thể được đánh giá và so sánh giữa hai nhóm này.

Theo một phương án, chế phẩm theo sáng chế có thể làm giảm đáng kể tình trạng đau ở đối tượng khi được sử dụng cho đối tượng so với đối tượng không được sử dụng chế phẩm này. Thuật ngữ “đáng kể” được dùng trong bản mô tả để chỉ mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê quan sát được giữa nhóm điều trị và nhóm đối chứng.

Protein kinaza A là nhóm enzym phụ thuộc AMP mạch vòng được biểu hiện trong bệnh viêm. Theo một phương án khác, chế phẩm này có thể làm giảm đáng kể mức độ biểu hiện protein kinaza A gây ra bởi tình trạng căng thẳng ở đối tượng được sử dụng chế phẩm này so với đối tượng đối chứng không được sử dụng chế phẩm này. Theo một khía cạnh, chế phẩm này làm giảm mức độ biểu hiện protein kinaza A 20%, 30%, 50% hoặc cao hơn ở đối tượng được sử dụng chế phẩm này so với đối tượng đối chứng không được sử dụng chế phẩm này.

Theo một phương án khác, chế phẩm theo sáng chế có thể làm giảm đáng kể hoạt tính của xyclooxygenaza (COX)-2 như được đo bằng thử nghiệm sàng lọc chất ức chế COX. Theo một khía cạnh, mức độ ức chế COX-2 là lớn hơn 20%, 30%, hoặc 40%, so với đối tượng không được sử dụng chế phẩm này. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm theo sáng chế ức chế đáng kể COX-1 như được đo bằng thử nghiệm sàng lọc chất ức chế COX. Theo một khía cạnh khác, tỷ lệ ức chế giữa COX-2 và COX-1, tức là COX-2/COX-1 gây ra bởi chế phẩm theo sáng chế nằm trong khoảng từ 2 đến 30, nằm trong khoảng từ 5 đến 20, hoặc nằm trong khoảng từ 10 đến 20.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh, bao gồm việc cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm theo sáng chế. Theo một phương án

khác, phương pháp theo sáng chế có thể còn bao gồm bước sàng lọc các đối tượng cần điều trị. Theo một khía cạnh, đối tượng là đối tượng có nguy cơ mắc một hoặc nhiều bệnh. Theo một khía cạnh khác, đối tượng là đối tượng mắc một hoặc nhiều bệnh. Ví dụ về các bệnh này có thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở bệnh về khớp, bệnh viêm, bệnh tự miễn, bệnh đái tháo đường, rối loạn chuyển hóa, rối loạn nhận thức và tình trạng kết hợp của các bệnh này.

Theo một khía cạnh, lượng hữu hiệu của chế phẩm này là lượng hữu hiệu làm giảm đáng kể mức độ biểu hiện protein kinaza A gây ra bởi tình trạng căng thẳng so với đối tượng đối chứng không được sử dụng chế phẩm này. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm này có thể làm giảm mức độ biểu hiện protein kinaza A ít nhất là 50% ở đối tượng được sử dụng chế phẩm này so với đối tượng đối chứng không được sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm này.

Theo một khía cạnh khác, lượng hữu hiệu của chế phẩm này là lượng hữu hiệu ức chế hoạt tính COX-2 ít nhất bằng 20% ở đối tượng đồng thời không ức chế đáng kể hoạt tính COX-1. Theo một khía cạnh khác, tỷ lệ ức chế giữa COX-2 và COX-1 gây ra bởi chế phẩm này nằm trong khoảng từ 2 đến 30.

Theo một khía cạnh khác, lượng hữu hiệu của chế phẩm này là lượng hữu hiệu làm giảm đáng kể tình trạng đau so với đối tượng đối chứng không được sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm này.

ARN mạch ngắn là phân tử ARN kích cỡ nhỏ có khả năng điều hòa biểu hiện gen. ARN mạch ngắn liên quan đến quá trình phát triển và tiến triển của nhiều bệnh viêm. Theo một phương án, khi được sử dụng cho đối tượng, chế phẩm này có thể làm giảm mức độ biểu hiện của ARN mạch ngắn ở đối tượng được sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm này so với đối tượng đối chứng không được sử dụng chế phẩm này. Ví dụ về các ARN mạch ngắn này có thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các ARN có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1- SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.18- SEQ ID NO.26, và SEQ ID NO.28-SEQ ID NO.43.

Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế giúp phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm và/hoặc bệnh tự miễn. Theo một khía cạnh, chế phẩm này làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất một ARN mạch ngắn ở đối tượng được sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm này so với mức độ biểu hiện ARN mạch ngắn tương tự ở đối tượng đối

chúng không được sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm này. Ví dụ về ARN mạch ngắn liên quan đến các phương pháp này bao gồm một hoặc nhiều ARN có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1- SEQ ID NO.16, và SEQ ID NO.18- SEQ ID NO.26.

Theo một phương án khác, phương pháp theo sáng chế giúp phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh đái tháo đường và/hoặc rối loạn chuyển hóa. Theo một khía cạnh, chế phẩm này làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất một ARN mạch ngắn ở đối tượng được sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm này so với mức độ biểu hiện ARN mạch ngắn tương tự ở đối tượng đối chứng không được sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm này. Ví dụ về ARN mạch ngắn liên quan đến các phương pháp này bao gồm một hoặc nhiều ARN có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8-SEQ ID NO.33.

Theo một phương án khác, phương pháp theo sáng chế giúp phòng ngừa và/hoặc điều trị rối loạn nhận thức. Theo một khía cạnh, chế phẩm này làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất một ARN mạch ngắn ở đối tượng được sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm này so với mức độ biểu hiện ARN mạch ngắn tương tự ở đối tượng đối chứng không được sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm này. Ví dụ về ARN mạch ngắn liên quan đến các phương pháp này bao gồm những không chỉ giới hạn ở một hoặc nhiều ARN có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.34-SEQ ID NO.43. Ví dụ về rối loạn nhận thức bao gồm bệnh tâm thần phân liệt, bệnh tự kỷ, bệnh Alzheimer, và các bệnh tương tự khác.

Theo một phương án khác, khi được sử dụng cho đối tượng, chế phẩm này có thể làm tăng mức độ biểu hiện của ARN mạch ngắn ở đối tượng được sử dụng lượng hữu hiệu của chế phẩm này so với đối tượng đối chứng không được sử dụng chế phẩm này. Ví dụ về các ARN mạch ngắn này có thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các ARN có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.17 và SEQ ID NO.27.

Súp gà và chế phẩm canh thang từ gà đã được sử dụng nhiều cho người trong hàng thế kỷ. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện đã kiểm chứng được nhiều lợi ích sức khỏe của súp gà hoặc chế phẩm canh thang từ gà. Theo phương pháp điều chế tại hộ gia đình, súp gà hoặc chế phẩm canh thang từ gà được điều chế bằng cách hầm toàn bộ con gà hoặc các bộ phận chính của gà trong nồi nước trong thời gian dài. Súp hoặc chế phẩm canh thang điều chế theo phương pháp này có thể không có được tác dụng tăng cường sức khỏe tối đa của súp hoặc chế phẩm canh thang do một số hợp chất có thể bị mất trong

quá trình hầm hoặc trong quá trình chế biến, đồng thời các hợp chất khác có thể không được chiết xuất ra khỏi các bộ phận của gà.

Sáng chế đề xuất phương pháp cải tiến bằng cách chế biến các bộ phận của gà trước khi hầm và bằng cách kiểm soát nhiệt độ chế biến và thời gian hầm để tối ưu hóa hiệu suất chiết các hợp chất có lợi đồng thời giảm thiểu sự mất hoạt tính do các điều kiện chế biến khắc nghiệt.

Nguyên liệu gia cầm đã được chọn được chế biến theo phương pháp theo sáng chế để thu được chế phẩm canh thang chứa hàm lượng protein cao. Một số axit amin có thể có mặt với hàm lượng tương đối cao hơn so với chế phẩm canh thang điều chế tại hộ gia đình hoặc các chế phẩm khác có bán trên thị trường. Như được thể hiện trong nhiều nghiên cứu trên động vật được mô tả trong sáng chế, chế phẩm canh thang theo sáng chế có thể hữu hiệu trong phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh về khớp và các bệnh lý tiềm ẩn. Chế phẩm này cũng có thể tạo ra các giá trị dinh dưỡng và có lợi cho sức khỏe như làm giảm bệnh viêm.

Thuật ngữ “chế phẩm canh thang” và “súp” được dùng trong bản sáng chế để chỉ chế phẩm lỏng chứa ít nhất một chất hòa tan và cũng được dùng trong bản sáng chế để chỉ dạng chế phẩm sẵn sàng để sử dụng, chế phẩm đậm đặc, nguyên liệu ở dạng lỏng hoặc dạng rắn.

Chế phẩm canh thang từ gia cầm theo sáng chế có thể chứa hàm lượng tương đối cao của nhiều axit amin. Các axit amin này có thể có mặt ở dạng protein hoặc axit amin tự do trong chế phẩm canh thang. Các axit amin tổng số bao gồm cả các axit amin có mặt ở dạng protein lẫn các axit amin có mặt ở dạng axit amin tự do. Thuật ngữ “tỷ lệ giữa các axit amin khác nhau trong chế phẩm canh thang” được dùng trong bản mô tả để chỉ tỷ lệ khối lượng giữa các axit amin tổng số.

Thuật ngữ “chất rắn khô” hoặc “chất rắn” được dùng trong bản mô tả để chỉ các thành phần của chế phẩm lỏng còn lại sau khi toàn bộ chất lỏng tự do được loại bỏ khỏi thành phần chất lỏng. Khi chế phẩm canh thang chứa nước, chất lỏng tự do là nước.

Thuật ngữ “đường dùng” được dùng trong bản mô tả để chỉ đường phân phối chế phẩm vào cơ thể từng đối tượng, như đường miệng tiêu hóa.

Thuật ngữ “đối tượng” được dùng trong bản mô tả để chỉ động vật có vú, bao gồm người.

Thuật ngữ “đáng kể” được dùng trong bản mô tả để chỉ mức độ khác biệt ít nhất nằm trong khoảng từ 10% đến 20%.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Các ví dụ sau chỉ nhằm mục đích minh họa các phương án chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế. Nguyên liệu, thuốc thử, hóa chất, và các nguyên liệu khác được sử dụng là thành phần hoặc thuốc thử mẫu, và các cải biến khác nhau có thể được thực hiện dựa trên phân mô tả nêu trên nằm trong phạm vi của sáng chế. Trừ khi có quy định khác trong sáng chế, thành phần, thuốc thử, quy trình hướng dẫn, và các phương pháp khác được sử dụng trong các hệ thống và thử nghiệm trong phần ví dụ thực hiện sáng chế chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

#### **Ví dụ 1**

**Điều chế chế phẩm canh thang từ các bộ phận của gà tây**

Trong ví dụ này, các bộ phận của gà tây được sử dụng để điều chế chế phẩm canh thang và chất lượng và các giá trị có lợi cho sức khỏe của chế phẩm canh thang này được đánh giá. Cụ thể, nguyên liệu gà tây được phân tách cơ học và các bộ phận này được nghiền mịn đến kích cỡ nhỏ hơn 2mm để tối ưu hóa hiệu suất chiết. Các bộ phận đã nghiền mịn từ gà tây được hầm từ từ đến nhiệt độ 90,56°C (195°F) trong hơi nước trong khoảng 15 phút hoặc ngắn hơn. Sau đó, chế phẩm canh thang này được phân tách ra khỏi phần không hòa tan bằng cách gạn. Chất béo giải phóng trong chế phẩm canh thang cũng được loại bỏ khỏi chế phẩm canh thang này bằng thiết bị phân tách ly tâm. Chế phẩm canh thang này được cô trong thiết bị làm bay hơi, làm lạnh, và đóng gói để tiêu thụ trên thị trường.

#### **Ví dụ 2**

**Điều chế chế phẩm canh thang từ các bộ phận của gà**

Trong ví dụ này, các bộ phận đã được băm nhỏ của gà chứa xương và sụn gà được hầm trong nước ở nhiệt độ lớn hơn 121,11°C (250°F) trong hơn 6 giờ để chiết xuất tối ưu một số thành phần và/hoặc hợp chất có lợi. Chế phẩm canh thang thu được từ quy trình này được ký hiệu là “AAC1” để dùng làm mẫu chuẩn nội. Cụ thể, nguyên liệu xương gà

băm nhỏ đã qua kiểm tra USDA còn lại sau khi loại bỏ các cơ chính được hầm trong nước trong thùng hầm làm bằng thép không gỉ kích cỡ lớn. Sau khi hầm, phần chế phẩm canh thang dạng lỏng được phân tách ra khỏi phần chất rắn không hòa tan bằng cách gạn. Chế phẩm canh thang này được cô trong thiết bị làm bay hơi, sau đó sấy khô và đóng gói trong các đồ chứa có dán nhãn.

### Ví dụ 3

So sánh đặc tính protein và axit amin của các chế phẩm canh thang khác nhau

Protein là phân tử kích cỡ lớn chứa một hoặc nhiều chuỗi axit amin thực hiện nhiều chức năng trong các hệ sinh học bao gồm, thực hiện chức năng như các enzym, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình truyền thông tin trong tế bào, và tạo ra cấu trúc hỗ trợ cho tế bào. Người, cũng như các động vật khác, thu nhận các axit amin thiết yếu từ protein được tiêu thụ dưới dạng nguồn dinh dưỡng do không có các enzym cần thiết để tổng hợp các axit amin này. Sự tiêu thụ protein dẫn đến quá trình phân cắt chúng thành các axit amin thông qua quá trình tiêu hóa. Sau đó, các axit amin có thể được sử dụng để sinh tổng hợp protein trong sản sinh và duy trì hệ cơ, sản sinh glucoza, đóng vai trò là nguồn dinh dưỡng nitơ, và đóng vai trò là nguồn năng lượng sinh học khi cần. Mục tiêu của nghiên cứu này là để xác định hàm lượng và kích cỡ của protein trong chế phẩm canh thang từ gà AAC1 so với chế phẩm điều chế tại hộ gia đình.

Một mẫu chế phẩm theo sáng chế (AAC1) và một mẫu khác được điều chế theo phương pháp chế biến tại hộ gia đình (điều chế tại hộ gia đình) được so sánh. Tỷ lệ phần trăm chất rắn (khối lượng/thể tích) trong chế phẩm AAC1 bằng 8%, trong khi đó tỷ lệ phần trăm (khối lượng/thể tích) trong chế phẩm điều chế tại hộ gia đình bằng 1,7%.

Trước khi định lượng protein bằng phương pháp Bradford, mỗi mẫu được pha loãng trong nước cất thành dung dịch có nồng độ cuối cùng bằng 1% khối lượng/thể tích. Đường chuẩn được dựng bằng cách sử dụng albumin huyết thanh bò ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 0 đến 3,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Toàn bộ các mẫu được phân tích lặp lại ba lần. Hàm lượng protein tổng số được xác định bằng máy đọc đĩa ở bước sóng 595nm. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1 Hàm lượng protein tổng số trong các mẫu chế phẩm canh thang

| Mẫu                               | Trị số                  | Kết quả                 | Kết quả trung bình | Hàm lượng | SD    | CV  |
|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|-----------|-------|-----|
| Chế phẩm AAC1                     | 0,446<br>0,461<br>0,474 | 1,558<br>1,693<br>1,821 | 1,691              | 1,691     | 0,132 | 7,8 |
| Chế phẩm điều chế tại hộ gia đình | 0,544<br>0,549          | 2,496<br>2,544          | 2,52               | 2,52      | 0,034 | 1,3 |

Để hiệu chỉnh độ sai lệch về tỷ lệ phần trăm chất rắn trong các chế phẩm AAC1 (8%) và chế phẩm điều chế tại hộ gia đình (1,7%), trị số protein tính theo dung dịch 1% trong chế phẩm AAC1 và chế phẩm điều chế tại hộ gia đình được nhân với tỷ lệ % chất rắn ban đầu tương ứng của chúng. Hàm lượng protein tổng số đã điều chỉnh cuối cùng trong chế phẩm AAC1 và chế phẩm điều chế tại hộ gia đình được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2 Hàm lượng protein tổng số đã điều chỉnh trong chế phẩm canh thang AAC1 và chế phẩm điều chế tại hộ gia đình

| Mẫu                               | Hàm lượng cuối cùng đã điều chỉnh | % AAC1 |
|-----------------------------------|-----------------------------------|--------|
| Chế phẩm AAC1                     | 13,6 $\mu$ g/ $\mu$ L             | -      |
| Chế phẩm điều chế tại hộ gia đình | 4,3 $\mu$ g/ $\mu$ L              | 31,6%  |

Để xác định đặc tính protein của mỗi mẫu, thể tích tương đương của các mẫu chế phẩm AAC1 và chế phẩm điều chế tại hộ gia đình (15,6 $\mu$ L) được trộn với dung dịch đệm Laemmli và chất khử, gia nhiệt ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, và phân tách trên gel Bis Tris 4-12%. Khoảng kích cỡ tương đối của protein được xác định bằng cách so sánh với chất chuẩn protein có bán trên thị trường (nằm trong khoảng từ 4,5 kDa đến 300 kDa). Điện thế không đổi 150V được đặt vào gel trong 30 phút, cho phép phân tách protein trong mỗi mẫu. Protein được hiện thị trên gel bằng chất nhuộm SimplyBlue™.

Các kết quả được thể hiện trong Fig.1. Bảng 1 thể hiện đặc tính protein của chế phẩm điều chế tại hộ gia đình, bảng 2 thể hiện đặc tính protein của chế phẩm canh thang AAC1, và bảng 3 thể hiện đặc tính protein của chất chuẩn trọng lượng phân tử. Căn cứ trên đặc tính protein, chế phẩm AAC1 có hàm lượng protein cao gấp 3 lần chế phẩm điều chế tại hộ gia đình. Protein trong chế phẩm điều chế tại hộ gia đình có khoảng phân bố trọng lượng phân tử rộng, chứa cả protein trọng lượng phân tử lớn (lên đến khoảng 300-500 kD) lẫn protein trọng lượng phân tử nhỏ (khoảng 5-15kD). Trái lại, phần lớn (tức là

lớn hơn 50%) protein trong chế phẩm AAC1 có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 70 kDa đến 15 kDa.

Hàm lượng của từng axit amin cũng được phân tích. Hàm lượng của từng axit amin trong chế phẩm canh thang theo sáng chế, chế phẩm điều chế tại hộ gia đình, cũng như các chế phẩm khác có bán trên thị trường được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3 Thành phần axit amin của các chế phẩm canh thang khác nhau

| Hàm lượng axit amin tính theo hàm lượng chất rắn ( 100%) | 3823                    | Chế phẩm có bán trên thị trường | Chế phẩm điều chế tại hộ gia đình 1 | Chế phẩm điều chế tại hộ gia đình 2 | Chế phẩm AAC1-1 | Chế phẩm AAC1-2 | Chế phẩm AAC1-3 |
|----------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| -                                                        | % khối lượng/khối lượng | %                               |                                     |                                     |                 |                 |                 |
| Taurin                                                   | 2,50                    |                                 |                                     |                                     |                 |                 |                 |
| Axit aspartic                                            | 3,63                    | 2,44                            | 3,63                                | 3,47                                | 7,04            | 5,34            | 5,38            |
| Threonin                                                 | 1,44                    | 0,76                            | 1,52                                | 1,42                                | 1,75            | 2,13            | 1,79            |
| Serin                                                    | 1,56                    | 1,34                            | 1,96                                | 1,89                                | 2,08            | 1,88            | 2,40            |
| Axit glutamic                                            | 10,25                   | 6,98                            | 9,44                                | 9,26                                | 10,52           | 9,50            | 10,14           |
| Prolin                                                   | 3,53                    | 3,05                            | 5,93                                | 5,57                                | 9,59            | 10,66           | 11,07           |
| Hydroprolin                                              | 2,19                    | 2,99                            | 5,31                                | 4,92                                | na              | 7,00            | 9,39            |
| Glyxin                                                   | 5,97                    | 7,38                            | 8,79                                | 9,47                                | 18,02           | 15,41           | 17,68           |
| Lanthionin                                               | 0,06                    | 0,00                            | 0,00                                | 0,00                                | 0,00            | 0,00            | 0,00            |
| Alanin                                                   | 3,91                    | 3,37                            | 4,60                                | 4,58                                | 8,06            | 7,53            | 7,53            |
| Xystein                                                  | 0,44                    | 0,29                            | 0,34                                | 0,40                                | 0,00            | 0,25            | 0,17            |
| Valin                                                    | 1,44                    | 0,73                            | 1,43                                | 1,42                                | 2,44            | 2,19            | 2,21            |
| Isoleucin                                                | 1,13                    | 0,47                            | 1,18                                | 1,02                                | 1,54            | 1,59            | 1,59            |
| Leucin                                                   | 2,72                    | 1,51                            | 2,48                                | 2,32                                | 3,38            | 3,47            | 3,43            |
| Metionin                                                 | 0,81                    | 0,52                            | 0,93                                | 0,77                                | 1,01            | 1,06            | 1,10            |
| Tyrosin                                                  | 0,88                    | 0,44                            | 0,81                                | 0,65                                | 1,09            | 1,00            | 0,90            |
| Phenylalanin                                             | 1,00                    | 0,73                            | 9,53                                | 7,03                                | 2,30            | 2,16            | 1,98            |
| Hydroxylysin                                             | 0,16                    | 0,00                            | 0,00                                | 0,00                                | 0,00            | 0,00            | 0,00            |
| Histidin                                                 | 2,03                    | 2,56                            | 2,70                                | 1,73                                | 1,32            | 1,16            | 1,00            |
| Ornithin                                                 | 2,25                    | 0,00                            | 0,00                                | 0,00                                | 0,00            | 0,00            | 0,00            |
| Lysin                                                    | 3,75                    | 2,67                            | 3,07                                | 3,00                                | 3,96            | 3,66            | 3,05            |
| Arginin                                                  | 3,06                    | 2,79                            | 4,01                                | 3,75                                | 8,24            | 6,69            | 6,61            |
| Tryptophan                                               | 0,16                    | 0,06                            | 0,12                                | 0,09                                |                 | 0,22            | 0,15            |
| <b>Tổng số</b>                                           | 54,84                   | 41,08                           | 67,80                               | 62,79                               | 82,35           | 82,88           | 87,55           |

Ví dụ 4

So sánh hàm lượng chondroitin sulfat trong các chế phẩm canh thang khác nhau

Chondroitin sulfat là hợp chất tạo cấu trúc quan trọng có trong sụn và ảnh hưởng đến tình trạng sức khỏe của khớp. Chondroitin sulfat đã được biết là có tác dụng làm giảm lượng nhiều chất trung gian gây viêm như iNOS, PGE2, COX-2 (Gwendolyn, Spine 2011), và NFkB (Vallières, Osteoarthritis Cartilage, 2010). Mục tiêu của nghiên cứu này là để xác định hàm lượng chondroitin sulfat trong các mẫu chế phẩm canh thang từ gà khác nhau. Hàm lượng chondroitin sulfat tổng số trong các chế phẩm canh thang từ gà được phân tích bằng phương pháp phân giải bằng enzyme và phương pháp phân tích LC-UV (Ji, Journal of AOAC International, 2007). Kết quả được tính theo diện tích trên đường cong so với mẫu chuẩn và giới hạn định lượng là 8mg chondroitin sulfat/g chất khô (Bảng 4). Trong toàn bộ các chế phẩm canh thang từ gà được thử nghiệm, thì chế phẩm AAC1 có hàm lượng chondroitin sulfat cao nhất (8,797% khối lượng/khối lượng).

Bảng 4 Hàm lượng chondroitin sulfat (CS)

| Mẫu                                                        | Hàm lượng trung bình (mg) | Hàm lượng chất rắn (mg/g) | Hàm lượng chất rắn (% kl/kl) |
|------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Bột chế phẩm canh thang từ gà AAC1                         | 17,480                    | 87,971                    | 8,797                        |
| Bột chế phẩm canh thang từ gà H814                         | 15,443                    | 67,553                    | 6,755                        |
| Chế phẩm đông lạnh đậm đặc TSN                             | 10,886                    | 52,059                    | 5,206                        |
| Chế phẩm đông lạnh đậm đặc IDF Gà 823                      | 8,627                     | 42,104                    | 4,210                        |
| Chế phẩm canh thang điều chế từ xương lưng tại hộ gia đình | 5,866                     | 28,258                    | 2,826                        |
| Chế phẩm đông lạnh đậm đặc từ gà tây 824                   | 5,243                     | 26,227                    | 2,623                        |
| Bột chế phẩm canh thang từ gà HML 34511                    | 4,979                     | 24,335                    | 2,434                        |
| Bột chế phẩm canh thang từ gà A1004                        | 3,817                     | 18,305                    | 1,830                        |
| Bột chế phẩm canh thang từ gà P1301                        | 3,075                     | 15,054                    | 1,505                        |
| Chế phẩm canh thang điều chế từ các bộ phận của gà         | 2,185                     | 10,99                     | 1,09                         |
| Chế phẩm canh thang điều chế từ cổ gà tại hộ gia đình      | 1,937                     | 9,361                     | 0,936                        |

Ví dụ 5

So sánh hàm lượng polyphenol trong các chế phẩm canh thang từ gà khác nhau

Hàm lượng polyphenol trong các chế phẩm canh thang từ gà khác nhau được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu cải tiến (Slinkard, *American Journal of Enology and Viticulture*, 1977). Polyphenol là nhóm hợp chất hóa học được biết đến là có đặc tính chống oxy hóa và chống viêm. Mặc dù cả chế phẩm canh thang AAC1 và chế phẩm điều chế tại hộ gia đình đều chứa polyphenol, nhưng chế phẩm AAC1 chứa 4828,8 $\mu$ g/mL GAE polyphenol, tức là gấp khoảng 7 lần hàm lượng GAE polyphenol trong chế phẩm canh thang điều chế tại hộ gia đình (687,7 $\mu$ g/mL GAE) được điều chế từ cùng các bộ phận của gà.

#### Ví dụ 6

Tác dụng của chế phẩm canh thang đối với nhóm enzym COX

Họ enzym COX cần thiết cho quá trình tổng hợp prostanoit, như prostaglandin. COX-1 là hoạt chất cấu thành trong khi đó COX-2 là hoạt chất cảm ứng, do đó được điều hòa tăng trong bệnh viêm và đau. Các hợp chất phong bế hoạt tính COX-2 đồng thời không ảnh hưởng đến COX-1 là đặc biệt được quan tâm do chúng có khả năng ức chế bệnh viêm đồng thời không gây ra các tác dụng không muốn gây ra bởi sự phong bế hoạt tính COX-1. Mức độ ức chế và độ đặc hiệu với COX của chế phẩm canh thang từ gà điều chế theo phương pháp theo sáng chế được đánh giá.

Bằng cách sử dụng thử nghiệm ức chế enzym COX *in vitro* (Abcam), các mẫu chế phẩm canh thang từ gà được đánh giá về khả năng phong bế hoạt tính COX-1 và COX-2 theo quy trình của nhà sản xuất. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5 Mức độ ức chế chọn lọc COX-1 và COX-2

| Mẫu                                                        | Enzym | % ức chế | Tỷ lệ ức chế COX-2/COX-1 |
|------------------------------------------------------------|-------|----------|--------------------------|
| Bột chế phẩm IDF AAC1                                      | COX-1 | -2,3     |                          |
|                                                            | COX-2 | 42,4     | 18,34                    |
| Chế phẩm đông lạnh IDF 823                                 | COX-1 | -51,5    |                          |
|                                                            | COX-2 | 22,1     | 0,43                     |
| Chế phẩm canh thang điều chế từ xương lưng tại hộ gia đình | COX-1 | -17,9    |                          |
|                                                            | COX-2 | 28,1     | 1,57                     |
| Chế phẩm canh thang điều chế từ cổ gà tại hộ gia đình      | COX-1 | -32,5    |                          |
|                                                            | COX-2 | 25,3     | 0,78                     |
| Chế phẩm từ gà tây IDF 824                                 | COX-1 | -21,7    |                          |
|                                                            | COX-2 | 32,7     | 1,51                     |
| Chế phẩm canh thang từ gà K                                | COX-1 | -25,5    |                          |

|                                                                        |       |       |      |
|------------------------------------------------------------------------|-------|-------|------|
|                                                                        | COX-2 | 30,8  | 1,21 |
| Chế phẩm canh thang có bán trên thị trường TSN                         | COX-1 | -5,1  |      |
|                                                                        | COX-2 | 26,3  | 5,16 |
| Chế phẩm canh thang có bán trên thị trường H814                        | COX-1 | -39,9 |      |
|                                                                        | COX-2 | 11,3  | 0,28 |
| Chế phẩm canh thang có bán trên thị trường A1004                       | COX-1 | -9,2  |      |
|                                                                        | COX-2 | 36,7  | 4,01 |
| Chế phẩm canh thang có bán trên thị trường HML                         | COX-1 | -27,0 |      |
|                                                                        | COX-2 | 27,3  | 1,01 |
| Chế phẩm canh thang có bán trên thị trường PLNT                        | COX-1 | -19,9 |      |
|                                                                        | COX-2 | 47,1  | 2,36 |
| Chế phẩm canh thang điều chế từ cùng nguồn nguyên liệu tại hộ gia đình | COX-1 | -5,2  |      |
|                                                                        | COX-2 | 3,5   | 0,67 |

Chế phẩm canh thang được ghi nhãn “chế phẩm canh thang điều chế từ cùng nguồn nguyên liệu tại hộ gia đình” là chế phẩm được điều chế phương pháp chế biến truyền thống trong hộ gia đình với cùng loại nguyên liệu như được sử dụng để điều chế chế phẩm AAC1. Như được thể hiện trong Bảng 5, chế phẩm canh thang từ gà AAC1 có tỷ lệ ức chế COX-2/COX-1 mạnh nhất (18,34) với mức độ ức chế hoạt tính COX-2 lớn hơn 40 so với các chế phẩm khác có bán trên thị trường hoặc “chế phẩm canh thang điều chế từ cùng nguồn nguyên liệu tại hộ gia đình”.

#### Ví dụ 7

Tác dụng của chế phẩm canh thang theo sáng chế đối với bệnh về khớp bằng cách điều hòa protein kinaza A

Rối loạn khớp thái dương hàm (TMD) là bệnh ảnh hưởng đến khớp thái dương hàm hoặc khớp xương hàm (TMJ), cơ nhai, hoặc cả hai. TMD được cho là gây ra bởi sự hoạt hóa neuron thần kinh và tế bào thần kinh đệm nằm trong hệ thần kinh sinh ba (Tjakkes et al., 2010). Tỷ lệ mắc các triệu chứng TMD đã được ghi nhận là lên đến 93% dân số với tỷ lệ mắc khác nhau (Zhao et al., 2011). Hơn nữa, sự phát triển của TMD cũng có thể dẫn đến phát triển trạng thái mãn cảm của rối loạn này.

Protein kinaza A là enzym thuộc nhóm enzym phụ được AMP mạch vòng đóng vai trò là hợp chất tiền viêm trong hệ thần kinh ngoại biên và hệ thần kinh trung ương. Mức độ biểu hiện của PKA tăng bởi các neuron thần kinh cảm thụ đau đã được ghi nhận trong trạng thái mãn cảm. Mục tiêu của nghiên cứu này là để nghiên cứu tác dụng của chế phẩm canh thang có bán trên thị trường, chế phẩm canh thang điều chế tại hộ gia đình, và chế phẩm canh thang theo sáng chế. Các chế phẩm này có thể chứa một số hợp

chất chống viêm có một số tác dụng trên TMD. Các hợp chất này có thể phát huy tác dụng thông qua PKA trong điều hòa phát triển và tiến triển của TMD.

Ba chế phẩm canh thang từ gà (AAC1, TSN, và chế phẩm canh thang điều chế tại hộ gia đình) được đánh giá trong ví dụ này. Chế phẩm canh thang AAC1 (8% chất rắn) được điều chế ở hàm lượng bằng 0,5% (khối lượng/thể tích). Trước tiên, 5g bột chế phẩm canh thang được nạp vào chai đã được hấp, sạch. Sau đó, chai này được nạp với 1L nước lọc đến vạch và hỗn hợp này được khuấy để cho phép bột hòa tan trong nước. Chế phẩm canh thang điều chế tại hộ gia đình (1,7%) cũng được thử nghiệm dưới dạng mẫu đối chứng. Để đạt được liều lượng cho phép so sánh chế phẩm AAC1 và chế phẩm canh thang điều chế tại hộ gia đình, và chế phẩm canh thang điều chế tại hộ gia đình được pha loãng 16 lần với nước lọc bằng cách nạp 62,5mL chế phẩm canh thang gốc và pha loãng chế phẩm canh thang này thành 1L. Chế phẩm canh thang có bán trên thị trường TSN cũng được thử nghiệm dưới dạng một mẫu đối chứng khác. Để đảm bảo TSN được thử nghiệm ở hàm lượng giống như hàm lượng của chế phẩm AAC1, dung dịch thử nghiệm cho TSN (33,3% chất rắn) được điều chế theo cùng cách thức. Chế phẩm canh thang TSN được để ấm cho đến khi toàn bộ chế phẩm canh thang gốc này không ở dạng keo. Khối lượng của các chế phẩm canh thang được gia tăng 16,7g và nạp vào các chai sạch như mô tả nêu trên. Sau đó, chai này được nạp với 1L nước lọc đến vạch. Sau đó, toàn bộ các dung dịch được đặt vào bể siêu âm ấm trong 30 phút để cho phép toàn bộ các thành phần của các chế phẩm canh thang được hòa tan hoàn toàn. Các chế phẩm canh thang được bảo quản trong tủ lạnh cho đến khi sử dụng cho chuột thử nghiệm qua chai nước trong 2 tuần trước khi gây rối loạn khớp thái dương hàm.

Các chuột đực Sprague-Dawley trưởng thành (200g-300g) được sử dụng trong ví dụ này. Các chuột được chia thành ba nhóm, mỗi nhóm được cho sử dụng với nước, chế phẩm có bán trên thị trường (TSN), hoặc chế phẩm canh thang AAC1 theo sáng chế. .

Lực cơ học được tác động lên mỗi nhóm và các mô tủy sống trên chứa các mẫu dây thần kinh sinh ba tủy sống (STN) được thu nhận và xử lý để thấm miễn dịch. Trước khi thấm miễn dịch, các lát được đặt ở nhiệt độ phòng và phủ bằng PBS 1x trong 5 phút. PBS được loại bỏ, và dịch lỏng được thay bằng 5% huyết thanh lừa đẳng trương-dung dịch triton 0,1% trong 20 phút. Sau đó, các mô được rửa bằng 5 mL PBS 1x. Các dung dịch pha loãng làm việc chứa kháng thể của tổ kháng PKA của chuột (BD Biosciences,

San Jose, CA;1:500) được điều chế using 5% huyết thanh lừa đẳng trương. Các kháng thể sơ cấp được ủ lên các mô (100 $\mu$ L/mô) trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các mẫu được rửa với 5mL 0,1% Tween 20-PBS và 2mL PBS 1x. Các dung dịch pha loãng làm việc chứa kháng thể Alexa 488® của lừa kháng IgG của thỏ được điều chế bằng cách pha loãng kháng thể gốc 1:200 trong PBS 1x. Kháng thể thứ cấp được ủ lên lát mẫu (100 $\mu$ L/mô) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng đồng thời bảo vệ tránh ánh sáng. Các lát được rửa một lần nữa bằng 5mL 0,1% Tween 20-PBS và 2mL PBS 1x, và đếm để phân tích huỳnh quang bằng môi trường đếm huỳnh quang Vectashield chứa chất màu huỳnh quang DAPI. Các lát được che bằng kính bảo vệ, bịt kín bằng thuốc màu bôi móng tay trong suốt, và bảo quản ở nhiệt độ 4°C cho đến khi thu được các hình ảnh quan sát trên kính hiển vi.

Hình ảnh Zeiss Z1 được chụp bằng máy ảnh Apotome được sử dụng để thu nhận hình ảnh Z ở độ phóng đại 10x của vùng V3 ở hạch thần kinh sinh ba và sừng tủy của STN. Phần mềm Zen 2011 được sử dụng để hiệu chỉnh đều tín hiệu nền của mỗi hình ảnh trước khi phân tích. Các hình ảnh thang độ xám jpeg được mở bằng phần mềm ImageJ, trong đó 10 vùng không trùng lặp quan tâm (RIO) với diện tích bằng nhau được đặt lên các vùng biểu hiện protein trên mỗi hình ảnh, và cường độ điểm ảnh tích hợp được đo. Các cường độ nền cũng được thu nhận bằng cùng quy trình, và tính trung bình. Sau đó, cường độ nền trung bình thu được từ mỗi hình ảnh được trừ đi từ mỗi trị số cường độ tích hợp từ diện tích vùng quan tâm. Cường độ tích hợp đã trừ đi được tính trung bình và tỷ lệ thay đổi được tính toán dưới dạng tỷ lệ thay đổi trung bình  $\pm$  SEM từ cường độ TMD đối chứng. Mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê được xác định bằng phép kiểm định Mann-Whitney U trên phần mềm SPSS, và được xem là có sự khác biệt khi  $p \leq 0,05$ .

Dữ liệu trên Fig.2 cho thấy rằng mức độ biểu hiện PKA tăng gây ra bởi tình trạng mở hàm kéo dài bị ức chế đáng kể ở chuột sử dụng chế phẩm AAC1 khi so với mức độ biểu hiện PKA ở chuột sử dụng nước hoặc chế phẩm có bán trên thị trường (TSN). Trên Bảng 6, kết quả của một số thử nghiệm được thể hiện dưới dạng tỷ lệ thay đổi trung bình về cường độ thẩm miễn dịch khi so với cường độ trung bình của nước được đo theo cùng cách thức.

Bảng 6 Chế phẩm AAC1 ức chế mức độ biểu hiện PKA có tác dụng điều trị hiệu quả chứng cứng hàm gây ra bởi tình trạng mở hàm kéo dài

| Chế phẩm<br>canh thang | Tỷ lệ thay đổi<br>trung bình | Trị số P<br>(so với TMD) | Trị số P<br>(so với TSN) |
|------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Nước (TMD)             | $1,00 \pm 0,06$              | 1,000                    | 0,239                    |
| AAC1                   | $0,75 \pm 0,02$              | 0,001                    | 0,000                    |
| TSN                    | $0,94 \pm 0,04$              | 0,239                    | 1,000                    |

Chế phẩm canh thang AAC1 theo sáng chế có khả năng điều hòa hữu hiệu mức độ biểu hiện PKA trong STN sau khi xuất hiện tình trạng cứng khớp khi so với chế phẩm canh thang có bán trên thị trường. Dựa trên sự khác biệt về thành phần của AAC1 và chế phẩm canh thang điều chế tại hộ gia đình, các tác giả sáng chế dự đoán rằng chế phẩm AAC1 sẽ hiệu quả hơn trong ức chế mức độ biểu hiện PKA gây ra bởi tình trạng cứng khớp trong STN.

#### Ví dụ 8

Đáp ứng cảm thụ đau của chế phẩm AAC1 so với các chế phẩm canh thang khác

Rối loạn khớp thái dương hàm (TMD), được đặc trưng bởi sự gia tăng tình trạng đau và cảm giác đau mặc dù có sự suy giảm tín hiệu cảm thụ đau đầu vào (Herb et al., 2006). Mức độ nhạy cảm tăng này có thể góp phần làm phát triển trạng thái mãn cảm của các dây thần kinh dẫn đến làm cứng khớp, cơ, dây chằng, và gân. Người bệnh bị rối loạn khớp thái dương hàm thường xuất hiện các triệu chứng ảnh hưởng bất lợi đến các khía cạnh khác của cuộc sống (Sessle, 2008). Một số người bệnh TMD phát triển các triệu chứng biến đổi đáp ứng bảo vệ có thể làm hạn chế hoặc giảm thiểu các hoạt động hàng ngày của họ. Đáp ứng bảo vệ này được gọi là “đáp ứng cảm thụ đau”. Mục tiêu của nghiên cứu này là để xác định liệu chế phẩm canh thang AAC1 từ gà có thể làm giảm đáp ứng cảm thụ đau gây ra bởi tình trạng cứng khớp thái dương hàm đáp ứng với kích thích cơ học hay không, và cơ chế tác dụng của chế phẩm này so với chế phẩm điều chế tại hộ gia đình và chế phẩm canh thang có bán trên thị trường.

Ba chế phẩm canh thang từ gà (AAC1, TSN, và chế phẩm điều chế tại hộ gia đình) được đánh giá trong ví dụ này. Chế phẩm canh thang AAC1 (8% chất rắn) được điều chế ở 0,5% (khối lượng/thể tích), trong khi đó chế phẩm canh thang điều chế tại hộ gia đình (1,7%) được thử nghiệm ở liều lượng cho phép so sánh tương quan tỷ lệ phần trăm chất rắn giữa AAC1 và chế phẩm canh thang điều chế tại hộ gia đình. Do đó, chế phẩm canh thang điều chế tại hộ gia đình được pha loãng 8 lần với nước lọc bằng cách nạp 62,5mL chế phẩm canh thang gốc, và pha loãng chế phẩm canh thang này thành 1L. Để thử nghiệm cạnh tranh chế phẩm canh thang có bán trên thị trường ở cùng hàm lượng, dung

dịch thử nghiệm cho TSN (33,3% chất rắn) được điều chế theo cùng cách thức with the modification that chế phẩm canh thang được để ấm cho đến khi toàn bộ chế phẩm canh thang gốc này không ở dạng keo.

Khối lượng của các chế phẩm canh thang được gia tăng 16,7g và nạp vào các chai sạch như mô tả nêu trên. Sau đó, chai này được nạp với 1L nước lọc đến vạch. Sau đó, toàn bộ các dung dịch được đặt vào bể siêu âm ấm trong 30 phút để cho phép toàn bộ các thành phần của các chế phẩm canh thang được hòa tan hoàn toàn. Các chế phẩm canh thang được đặt trong tủ lạnh cho đến khi sử dụng cho chuột thử nghiệm qua chai nước trong 2 tuần trước khi gây rối loạn khớp thái dương hàm.

Các chuột đực Sprague-Dawley trưởng thành (200g-300g) được nuôi nhốt riêng trong lồng nhựa sạch đạt tiêu chuẩn (VWR, West Chester, PA) và được cho ăn lẫn uống nước đầy đủ trong phòng với chu trình 12 giờ chiếu sáng/12 giờ trong bóng tối. Ba ngày liên tiếp trước khi thử nghiệm, các chuột thử nghiệm được đưa vào thiết bị giữ Ugo Basile Durham (Ugo Basile, Collegeville, PA) trong 5 phút để thích nghi với điều kiện thử nghiệm. Trong khoảng thời gian thích nghi này, các nang lông và lớp biểu bì nằm trong lớp cơ rắn và vùng khớp thái dương hàm của mặt được kích thích bằng cách cọ xát nhẹ vùng này với đầu côn pipet. Quá trình kích thích này được sử dụng để cải thiện tình trạng thích nghi của các chuột thử nghiệm với quy trình thử nghiệm, do đó giảm thiểu được một số phản ứng sai lệch đối với các sợi thử nghiệm. Đáp ứng cảm thụ đau ban đầu được đánh giá bằng phương pháp von Frey cải tiến. Một loạt các sợi von Frey đã hiệu chỉnh được tác động với lực gia tăng lên vùng da bao phủ lớp cơ rắn. Trước khi tác động, vùng cơ được chạm nhẹ với đầu sợi thử nghiệm để đảm bảo vị trí thích hợp. Khi vị trí thích hợp được thiết lập, chuyên gia không rõ các điều kiện thử nghiệm tác động lực vừa đủ lên vị trí này để uốn cong sợi. Các phản ứng được quan sát sau khi tác động lực lên vùng da bao phủ lớp cơ rắn và trước khi uốn cong sợi, được kiểm tra bằng một chuyên gia khác và ghi lại. Mỗi sợi được tác động 5 lần, và ghi lại dưới dạng số lượng phản ứng thu được từ 5 lần tác động của mỗi sợi đã hiệu chỉnh đặc hiệu. Các phép đo được thực hiện trên cả lớp cơ rắn bên phải và bên trái của mỗi chuột, và tính trung bình để thu được số lượng phản ứng trung bình thực hiện bằng 5. Đọc tín hiệu nền trước 2 tuần sử dụng toàn bộ các chế phẩm canh thang từ ga và đọc lại một lần nữa 24 giờ trước khi gây rối loạn khớp thái dương hàm.

Một số đáp ứng cảm thụ đau sau 2 giờ, 3 ngày, hoặc 7 ngày ở chuột thử nghiệm bị rối loạn khớp thái dương hàm do chấn thương được đo. Kết quả của thử nghiệm này, như được thể hiện trên Fig.3, cho thấy rằng chế phẩm AAC1 làm giảm đáng kể một số đáp ứng cảm thụ đau sau 2 giờ, 3 ngày, hoặc 7 ngày ở chuột thử nghiệm bị rối loạn khớp thái dương hàm do chấn thương. Chế phẩm AAC1 làm giảm đáng kể một số đáp ứng cảm thụ đau so với động vật bị rối loạn khớp thái dương hàm chỉ được sử dụng nước. Chế phẩm TSN không làm giảm đáp ứng cảm thụ đau ở thời điểm đo bất kỳ. Do đó, trong khi chế phẩm AAC1 làm giảm đáp ứng cảm thụ đau ở chuột thử nghiệm bị bệnh viêm mãn tính thu được từ mô hình chuột thử nghiệm bị rối loạn khớp thái dương hàm kéo dài, nhưng chế phẩm có bán trên thị trường không có tác dụng này. Dựa trên kết quả thu được từ các ví dụ nêu trên, cũng như dữ liệu thu được trong ví dụ này, các tác giả sáng chế dự đoán rằng chế phẩm điều chế tại hộ gia đình sẽ không làm giảm đáng kể đáp ứng cảm thụ đau gây ra bởi tình trạng cứng khớp thái dương hàm.

#### Ví dụ 9

Tác dụng của chế phẩm canh thang đối với các bệnh lý khác nhau thông qua các thay đổi biểu sinh

Mục tiêu của nghiên cứu này để đánh giá tác dụng của việc sử dụng hàng ngày chế phẩm canh thang từ gà đến ARN mạch ngắn liên quan đến sự phát triển và tiến triển của các bệnh và tình trạng viêm thần kinh. ARN mạch ngắn là các phân tử ARN kích thước nhỏ (thường có chiều dài khoảng 22 nucleotit) đóng vai trò quan trọng trong điều hòa bộ gen của động vật bao gồm người. Các hợp chất này kiểm soát sự biểu hiện của hàng ngàn gen. Quan trọng là, các thay đổi trong biểu hiện ARN mạch ngắn liên quan đến sự phát triển và tiến triển của nhiều bệnh lý và bệnh viêm.

Các chuột đực Sprague-Dawley trưởng thành (200g-300g) được nuôi nhốt riêng trong lồng nhựa sạch đạt tiêu chuẩn (VWR, West Chester, PA) và được cho ăn lẫn uống nước đầy đủ trong phòng với chu trình 12 giờ chiếu sáng/12 giờ trong bóng tối. Chế phẩm canh thang từ gà AAC1 (8% chất rắn) và chế phẩm canh thang điều chế tại hộ gia đình (1,7% chất rắn) được sử dụng trong thử nghiệm này. Chế phẩm canh thang AAC1 được điều chế ở 1% (khối lượng/thể tích) bằng cách nạp 10g (1%) bột chế phẩm canh thang vào chai đã được hấp, sạch. Sau đó, chai này được nạp với 1L nước lọc đến vạch. Để so sánh tỷ lệ phần trăm chất rắn giữa chế phẩm AAC1 và chế phẩm canh thang điều

chế tại hộ gia đình, và chế phẩm canh thang điều chế tại hộ gia đình được pha loãng 8 lần với nước lọc bằng cách nạp 125mL chế phẩm canh thang gốc, và pha loãng chế phẩm canh thang này thành 1L. Sau đó, các dung dịch được đặt vào bể siêu âm ấm trong 30 phút để cho phép toàn bộ các thành phần của các chế phẩm canh thang hòa tan hoàn toàn. Các chế phẩm canh thang được đặt vào tủ lạnh cho đến khi sử dụng. Các chuột thử nghiệm được cho sử dụng 300mL chế phẩm canh thang hai ngày một lần trong tổng cộng 4 tuần. Các mẫu dây thần kinh sinh ba tủy sống (STN) và vỏ não trán (FC) được thu nhận từ các chuột thử nghiệm, đồng thời các mẫu mô tụy được thu nhận bằng phẫu thuật mổ bụng. Khi được chiết tách, các mô được trữ lạnh ngay trong nitơ lỏng, và bảo quản ở nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$  cho đến khi ARN có thể được chiết tách.

Các mô được cân, và nạp vào ống Eppendorf dung tích 1,5mL (Eppendorf, Hauppauge, NY) chứa 600 $\mu\text{L}$  thuốc thử TRIzol® (Invitrogen, Grand Island, NY). Các mô được làm đồng nhất bằng chày nhựa trong tủ hút sạch không chứa ARNaza. Khi các mô đã được đồng nhất hoàn toàn, 600 $\mu\text{L}$  TRIzol được bổ sung vào mỗi mẫu, và lật ngược vài lần để đảm bảo trộn hoàn toàn. Khi được trộn, 120 $\mu\text{L}$  chloroform được nạp vào mỗi ống, và lật ngược nhanh. Sau đó, các mẫu được đặt vào nước đá trong 5 phút. Sau 5 phút, mẫu được ly tâm ở tốc độ 12,000 x g trong 15 phút ở nhiệt độ  $4^{\circ}\text{C}$  để phân tách các lớp hữu cơ và lớp nước. Khi được phân tách, lớp nước chứa ARN được loại bỏ và nạp vào ống sạch dung tích 1,5mL. Đồng thời, 120 $\mu\text{L}$  cloroform được nạp thêm vào mỗi ống, và lật ngược nhanh. Mẫu được ủ một lần nữa trên nước đá trong 5 phút và ly tâm ở tốc độ 12,000 x g trong 15 phút ở nhiệt độ  $4^{\circ}\text{C}$ . Khi được phân tách, lớp nước chứa ARN được loại bỏ và nạp vào ống sạch dung tích 1,5mL. Để kết tủa ARN, 1mL isopropanol lạnh được nạp vào mỗi ống. Sau đó, mỗi mẫu được lật ngược vài lần để đảm bảo trộn hoàn toàn. Sau đó, mẫu được ủ ở nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$  trong 30 phút và ly tâm ở tốc độ 12,000 x g trong 15 phút ở nhiệt độ  $4^{\circ}\text{C}$ . Trước tiên, các hạt ARN được hiển thị, và isopropanol được loại bỏ. Sau đó, các hạt ARN được rửa bằng etanol 75% không chứa ARNaza, và ly tâm 7,500 x g trong 10 phút ở nhiệt độ  $4^{\circ}\text{C}$ . Sau đó, etanol được loại bỏ và các hạt ARN được để khô. Sau đó, các hạt được tạo hỗn dịch lại trong nước không chứa ARNaza, và bảo quản ở nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$ .

ADN bổ sung được thu nhận từ các mẫu ARN tổng số (250 ng) bằng Kit miScript 2 RT (Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các mẫu được ủ ở nhiệt độ  $37^{\circ}\text{C}$  trong 1 giờ, sau đó ủ ở nhiệt độ  $95^{\circ}\text{C}$  trong 5 phút. Quy trình này được hoàn thành ngay, ở thời

điểm đó mẫu được đặt lên nước đá. Các mẫu không định lượng ngay được bảo quản ở nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$ , trong khi đó các mẫu cần định lượng ngay được pha loãng với  $200\mu\text{L}$  nước không chứa ARNaza theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các chip PCR định lượng gen Qiagen được sử dụng để xác định các thay đổi về mức độ biểu hiện ARN mạch ngắn bằng cách sử dụng các bảng phân tích tập trung vào bệnh đái tháo đường, bệnh viêm và bệnh tự miễn, và bệnh thần kinh. Hỗn hợp phản ứng QuantiText SYBR Green PCR (2X), đoạn môi miScript Universal (10X), khuôn ADN bổ sung, và nước không chứa ARNaza được để ấm đến nhiệt độ phòng trước khi sử dụng. Trong điều kiện môi trường sạch không chứa ARNaza, các thành phần sau được trộn với nhau theo lượng dưới đây vào đồ chứa sạch không chứa ARNaza theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Khi được trộn,  $25\mu\text{L}$  dung dịch phản ứng đã điều chế được nạp vào mỗi giếng của đĩa PCR định lượng 96 giếng bằng pipet đa kênh. Khi đã được nạp, các mẫu được phủ bằng tấm nhựa dính trong suốt, và mỗi giếng được bịt kín riêng. Mỗi đĩa được đặt vào máy PCR định lượng Applied Biosystems OneStep ở đó mỗi đĩa được ủ ban đầu ở nhiệt độ  $95^{\circ}\text{C}$  trong 15 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ ở các điều kiện sau:  $94^{\circ}\text{C}$  15 giây;  $55^{\circ}\text{C}$  trong 30 giây; và  $70^{\circ}\text{C}$  trong 30 giây. Dữ liệu được thu ở bước thứ hai của mỗi chu kỳ trong số 40 chu kỳ.

Khi mỗi thử nghiệm được hoàn thành, dữ liệu thô được phân tích bằng phần mềm OneStep. Trước khi phân tích, dữ liệu nền được thiết lập theo hướng dẫn của nhà sản xuất (chu kỳ 2- 2 chu kỳ trước khi khuếch đại, không lớn hơn chu kỳ 15). Dữ liệu nền là mức độ sai lệch trong chu kỳ đầu, ở đó không có sản phẩm khuếch đại có thể phát hiện. Tại thời điểm này, ngưỡng phát hiện cũng được thiết lập theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ngưỡng phát hiện được thiết lập bằng cách sử dụng đồ thị khuếch đại logarit để thu được đoạn tuyến tính logarit của đồ thị. Ngưỡng phát hiện được thiết lập bằng 1 cho toàn bộ các bảng phân tích. Điểm này cho phép ngưỡng phát hiện được thiết lập cao hơn dữ liệu nền, và ở nửa dưới đoạn tuyến tính của đồ thị cho toàn bộ các mẫu đối chứng. Các trị số CT thô được thu nhận trong các điều kiện này.

Để thu được trị số  $\Delta\text{CT}$ , các trị số CT thô từ một mẫu đối chứng ( $n=3$ ) và một mẫu chế phẩm canh thang từ gà ( $n=3$ ) cho mỗi bảng phân tích được phân tích bằng phần mềm phân tích ARN mạch ngắn miScript PCR Array Web-Based do nhà sản xuất cung cấp. Dữ liệu được chuẩn hóa với mức độ biểu hiện tối thiểu của 2 gen duy trì cấu trúc, do mức độ

biểu hiện của các gen này không thay đổi trong các điều kiện thử nghiệm. Khi các gen duy trì cấu trúc thích hợp được chọn, dữ liệu được thu nhận, và các trị số  $\Delta CT$  đã chuẩn hóa được tính toán bằng phần mềm web-based. Sau đó, trị số thu được từ phần mềm dữ liệu được phân tích bằng bảng số liệu excel. Để tính toán các trị số  $\Delta\Delta CT$  của các mẫu chế phẩm canh thang từ gà, phương trình sau được sử dụng:  $\Delta\Delta CT_{AAC1} = \Delta CT_{\text{mẫu đối chứng}} - \Delta CT_{\text{mẫu AAC1}}$ . Để xác định tỷ lệ thay đổi từ các mẫu biểu hiện đối chứng, phương trình sau được sử dụng: tỷ lệ thay đổi =  $2^{\Delta\Delta CT_{\text{mẫu AAC1}}}$ . Tỷ lệ thay đổi thu được từ 3 thử nghiệm độc lập được tính trung bình, và ghi lại dưới dạng tỷ lệ thay đổi trung bình  $\pm$  SDEV. Mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê được xác định bằng phép kiểm định Mann-Whitney U, và mức độ khác biệt được xác định khi  $p \leq 0,05$ .

Bảng 7 Mức độ thay đổi hàm lượng ARN mạch ngắn liên quan đến bệnh viêm và bệnh tự miễn đáp ứng với AAC1.

| Tên                    | Bệnh                      | Mô đích                           | Tỷ lệ thay đổi trung bình so với đối chứng AAC1 | Trị số P So với đối chứng | Trình tự                               |
|------------------------|---------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------|
| <b>rno-miR-101a-3p</b> | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Fos, Ptgs2, Rac1, Socs2, Spred1   | 1,00 $\pm$ 0,07<br>0,69 $\pm$ 0,07              | 0,05                      | UACAGUACUGUGAUAAACUGAA<br>SEQ ID NO.1  |
| <b>rno-miR-101b-3p</b> | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Fos, Ptgs2, Rac1, Socs2, Spred1   | 1,00 $\pm$ 0,06<br>0,68 $\pm$ 0,05              | 0,046                     | UACAGUACUGUGAUAGCUGAA<br>SEQ ID NO.2   |
| <b>rno-miR-106b-5p</b> | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | F3, Il25, Mgl1, Osm.              | 1,00 $\pm$ 0,06<br>0,65 $\pm$ 0,08              | 0,046                     | UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU<br>SEQ ID NO.3   |
| <b>rno-miR-125b-5p</b> | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Il16, Irf4, Stat3, Tnfsf4.        | 1,00 $\pm$ 0,05<br>0,78 $\pm$ 0,09              | 0,046                     | UCCCUGAGACCCUAAACUUGUGA<br>SEQ ID NO.4 |
| <b>rno-miR-140-5p</b>  | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Bmp2, Fgf9, Hdac7, Spred1, Vegfa. | 1,00 $\pm$ 0,09<br>0,78 $\pm$ 0,06              | 0,05                      | CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG<br>SEQ ID NO.5  |

|                       |                           |                                                                                |                            |       |                                          |
|-----------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-------|------------------------------------------|
| <b>rno-miR-142-3p</b> | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Ghr, Prlr, Rac1.                                                               | 1,00 ± 0,05<br>0,69 ± 0,04 | 0,05  | UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA<br>SEQ ID NO.6   |
| <b>rno-miR-16-5p</b>  | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Btla, Cd28, Fgf7, Ghr, Il10ra, Spred1, Vegfa.                                  | 1,00 ± 0,05<br>0,68 ± 0,10 | 0,046 | UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG<br>SEQ ID NO.7    |
| <b>rno-miR-17-5p</b>  | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | F3, Il25, Mgl, Osm.                                                            | 1,00 ± 0,10<br>0,54 ± 0,08 | 0,05  | CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG<br>SEQ ID NO.8   |
| <b>rno-miR-195-5p</b> | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Btla, Cd28, Fgf7, Ghr, Il10ra, Spred1, Vegfa                                   | 1,00 ± 0,06<br>0,65 ± 0,12 | 0,05  | UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC<br>SEQ ID NO.9     |
| <b>rno-miR-19a-3p</b> | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Bmp3, Cast, Cntfr, F3                                                          | 1,00 ± 0,13<br>0,45 ± 0,06 | 0,05  | UGUGCAAUAUCUAUGCAAAACUGA<br>SEQ ID NO.10 |
| <b>rno-miR-19b-3p</b> | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Bmp3, Cast, Cntfr, F3                                                          | 1,00 ± 0,09<br>0,42 ± 0,04 | 0,05  | UGUGCAAUAUCCAUGCAAAACUGA<br>SEQ ID NO.11 |
| <b>rno-miR-20a-5p</b> | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | F3, Il25, Mgl, Osm.                                                            | 1,00 ± 0,09<br>0,62 ± 0,01 | 0,046 | UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG<br>SEQ ID NO.12  |
| <b>rno-miR-20b-5p</b> | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | F3, Il25, Mgl, Osm.                                                            | 1,00 ± 0,06<br>0,62 ± 0,05 | 0,05  | CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG<br>SEQ ID NO.13  |
| <b>rno-miR-23a-3p</b> | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Ccl7, Cxcl12, Fas, Grem1, Il11, Il3, Il6ra, Kitlg, Mstn, Prkca, Prok2, Stat5b. | 1,00 ± 0,15<br>0,77 ± 0,12 | 0,05  | AUCACAUUGCCAGGGGAUUUCC<br>SEQ ID NO.14   |

|                        |                           |                                                                                |                            |      |                                         |
|------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|------|-----------------------------------------|
| <b>rno-miR-23b-3p</b>  | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Ccl7, Cxcl12, Fas, Grem1, Il11, Il3, Il6ra, Kitlg, Mstn, Prkca, Prok2, Stat5b. | 1,00 ± 0,14<br>0,74 ± 0,12 | 0,05 | AUCACAUUGCCAGGGAUUACC<br>SEQ ID NO.15   |
| <b>rno-miR-27a-3p</b>  | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Bmp3, Cd28, Csf1, Fgf1, Grem1, Irf4, Lifr, Mstn.                               | 1,00 ± 0,10<br>0,64 ± 0,04 | 0,05 | UUCACAGUGGCUAAGUCCGC<br>SEQ ID NO.16    |
| <b>rno-miR-291a-3p</b> | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Bcl6, Cyp26b1, Dock2, F3, Lefty1, Lefty2.                                      | 1,00 ± 0,44<br>8,13 ± 3,67 | 0,05 | AAAGUGCUUCCACUUUGUGUGCC<br>SEQ ID NO.17 |
| <b>rno-miR-29c-3p</b>  | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Hdac4, Il1rap, Lif, Pdgfa, Pdgfc, Tnfrsf1a, Vegfa                              | 1,00 ± 0,04<br>0,88 ± 0,02 | 0,05 | UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA<br>SEQ ID NO.18  |
| <b>rno-miR-30b-5p</b>  | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Hdac5, Il1a, Irf4, Lifr                                                        | 1,00 ± 0,11<br>0,64 ± 0,16 | 0,05 | UGUAAACAUCCUACACUCAGCU<br>SEQ ID NO.19  |
| <b>rno-miR-30d-5p</b>  | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Hdac5, Il1a, Irf4, Lifr                                                        | 1,00 ± 0,10<br>0,68 ± 0,16 | 0,05 | UGUAAACAUCCCCGACUGGAAG<br>SEQ ID NO.20  |
| <b>rno-miR-30e-5p</b>  | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Hdac5, Il1a, Irf4, Lifr                                                        | 1,00 ± 0,14<br>0,64 ± 0,06 | 0,05 | UGUAAACAUCCUUGACUGGAAG<br>SEQ ID NO.21  |
| <b>rno-miR-322-5p</b>  | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Btla, Cd28, Fgf7, Ghr, Il10ra, Spred1, Vegfa                                   | 1,00 ± 0,14<br>0,63 ± 0,14 | 0,05 | CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGGA<br>SEQ ID NO.22  |
| <b>rno-miR-34c-5p</b>  | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Areg, Bmp3, Il6ra, Kitlg, Nampt, Nfe2l1, Serpinf2                              | 1,00 ± 0,56<br>0,54 ± 0,14 | 0,05 | AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC<br>SEQ ID NO.23 |
| <b>rno-miR-410-3p</b>  | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Csf2, F3, Fgf7, Il4, Nr3c1, Vegfa                                              | 1,00 ± 0,10<br>0,67 ± 0,05 | 0,05 | AAUAUAACACAGAUGGCCUGU<br>SEQ ID NO.24   |

|                        |                           |                                                   |                                    |       |                                         |
|------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------|-------|-----------------------------------------|
| <b>rno-miR-449a-5p</b> | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | Areg, Bmp3, Il6ra, Kitlg, Nampt, Nfe211, Serpinf2 | $1,00 \pm 0,06$<br>$0,90 \pm 0,01$ | 0,046 | UGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGU<br>SEQ ID NO.25  |
| <b>rno-miR-93-5p</b>   | Bệnh viêm và bệnh tự miễn | F3, Il25, Mgl1, Osm                               | $1,00 \pm 0,01$<br>$0,66 \pm 0,04$ | 0,05  | CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG<br>SEQ ID NO.26 |

Bảng 8 Mức độ thay đổi hàm lượng ARN mạch ngắn liên quan đến bệnh đái tháo đường đáp ứng với chế phẩm AAC1.

| Tên                   | Mô đích                                                                          | Tỷ lệ thay đổi trung bình so với đối chứng AAC1 | Trị số P so với đối chứng | Trình tự                                |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------|
| <b>rno-miR-184</b>    | Bệnh béo phì, tế bào beta, điều hòa truyền tín hiệu insulin, giảm biểu hiện T2DM | $1,00 \pm 0,02$<br>$3,59 \pm 2,86$              | 0,05                      | UGGACGGAGAACUGAUAAAGGGU<br>SEQ ID NO.27 |
| <b>rno-miR-26b-5p</b> | Bệnh béo phì, tăng biểu hiện T1DM                                                | $1,00 \pm 0,18$<br>$0,53 \pm 0,10$              | 0,05                      | UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU<br>SEQ ID NO.28   |
| <b>rno-miR-29b-3p</b> | Bệnh béo phì, tăng sau khi suy giảm bài tiết glucosa-insulin                     | $1,00 \pm 0,33$<br>$0,30 \pm 0,12$              | 0,05                      | UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU<br>SEQ ID NO.29 |
| <b>rno-miR-29c-3p</b> | Bệnh béo phì nặng                                                                | $1,00 \pm 0,55$<br>$0,46 \pm 0,15$              | 0,05                      | UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA<br>SEQ ID NO.30  |
| <b>rno-miR-30a-5p</b> | Bệnh béo phì, hoạt hóa rối loạn chức năng tế bào beta gây độc glucosa            | $1,00 \pm 0,07$<br>$0,82 \pm 0,10$              | 0,05                      | UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG<br>SEQ ID NO.31  |
| <b>rno-miR-34a-5p</b> | Bệnh béo phì, tế bào beta                                                        | $1,00 \pm 0,13$<br>$0,42 \pm 0,06$              | 0,05                      | UGGCAGUGUCUAGCUGGUUGU<br>SEQ ID NO.32   |
| <b>rno-miR-370-3p</b> | Bệnh béo phì                                                                     | $1,00 \pm 0,21$<br>$0,32 \pm 0,10$              | 0,05                      | GCCUGCUGGGGUGGAACCGGU<br>SEQ ID NO.33   |

Bảng 9 Mức độ thay đổi hàm lượng ARN mạch ngắn liên quan đến bệnh thần kinh đáp ứng với chế phẩm AAC1.

| Tên                    | Bệnh                                                    | Tỷ lệ thay đổi trung bình so với đối chứng AAC1 | Trị số P so với đối chứng | Trình tự                                |
|------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------|
| <b>rno-miR-106b-5p</b> | Rối loạn tự kỷ, bệnh tâm thần phân liệt, bệnh Alzheimer | $1,00 \pm 0,10$<br>$0,77 \pm 0,13$              | 0,05                      | UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU<br>SEQ ID NO.34   |
| <b>rno-miR-138-5p</b>  | Phát triển, bệnh tâm thần phân liệt                     | $1,00 \pm 0,18$<br>$0,69 \pm 0,20$              | 0,05                      | AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG<br>SEQ ID NO.35 |
| <b>rno-miR-148b-3p</b> | Rối loạn tự kỷ                                          | $1,00 \pm 0,08$<br>$0,74 \pm 0,11$              | 0,05                      | UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU<br>SEQ ID NO.36  |
| <b>rno-miR-195-5p</b>  | Bệnh tâm thần phân liệt                                 | $1,00 \pm 0,05$<br>$0,87 \pm 0,04$              | 0,046                     | UAGCAGCACAGAAAUUUGGC<br>SEQ ID NO.37    |
| <b>rno-miR-19b-3p</b>  | Bệnh Alzheimer, bệnh thoái hóa tiểu não                 | $1,00 \pm 0,17$<br>$0,65 \pm 0,18$              | 0,05                      | UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA<br>SEQ ID NO.38 |
| <b>rno-miR-20b-5p</b>  | Bệnh tâm thần phân liệt                                 | $1,00 \pm 0,14$<br>$0,78 \pm 0,12$              | 0,05                      | CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG<br>SEQ ID NO.39 |
| <b>rno-miR-26b-5p</b>  | Bệnh tâm thần phân liệt, bệnh Alzheimer                 | $1,00 \pm 0,06$<br>$0,76 \pm 0,08$              | 0,05                      | UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU<br>SEQ ID NO.40   |
| <b>rno-miR-342-3p</b>  | Bệnh bò điên                                            | $1,00 \pm 0,06$<br>$0,81 \pm 0,08$              | 0,05                      | UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU<br>SEQ ID NO.41 |
| <b>rno-miR-409a-3p</b> | Bệnh tâm thần phân liệt                                 | $1,00 \pm 0,08$<br>$0,72 \pm 0,07$              | 0,05                      | AUGUUGCUCGGUGAACCCC<br>SEQ ID NO.42     |
| <b>rno-miR-598-3p</b>  | Rối loạn tự kỷ                                          | $1,00 \pm 0,12$<br>$0,77 \pm 0,07$              | 0,05                      | UACGUCAUCGUCGUCAUCGUUA<br>SEQ ID NO.43  |

Các mẫu tủy sống thu được từ các chuột thử nghiệm được sử dụng chế phẩm canh thang từ gà AAC1 1% trong 28 ngày đã ức chế đáng kể 26 ARN mạch ngắn liên quan đến bệnh viêm so với mức độ phát hiện được ở chuột được điều trị bằng các mẫu đối chứng. Ngạc nhiên là, ARN mạch ngắn thuộc nhóm 101 (Bảng 7), mà có khả năng ức chế Map Kinaza Phosphatase 1, đã bị ức chế bởi chế phẩm canh thang AAC1. Các mẫu vỏ não trán thu được từ các chuột thử nghiệm được sử dụng chế phẩm canh thang từ gà AAC1 1% cũng cho thấy mức độ biểu hiện của 10 ARN mạch ngắn liên quan đến sự phát triển của nhiều bệnh thần kinh đã giảm đáng kể. Các bệnh này bao gồm bệnh tự kỷ, bệnh tâm thần phân liệt, bệnh Alzheimer, bệnh thoái hóa tiểu não, và bệnh bò điên.

Các kết quả thu được từ nghiên cứu này cho thấy rằng chế phẩm canh thang từ gà AAC1 có thể hữu hiệu trong điều hòa phòng ngừa biểu sinh một số ARN mạch ngắn liên quan đến bệnh viêm thần kinh của hệ thần kinh trung ương, sự phát triển và tiến triển của một số bệnh thần kinh, cũng như các hội chứng chuyển hóa. Các dữ liệu này cho thấy chế phẩm canh thang từ gà AAC1 là hữu hiệu hơn trong điều hòa các ARN mạch ngắn này hơn chế phẩm điều chế tại hộ gia đình từ cùng loại nguyên liệu.

#### Ví dụ 10

##### Đặc tính protein và xác định phân bố trọng lượng phân tử protein

Mục tiêu của nghiên cứu này là để xác định mức độ khác biệt về đặc tính protein trong các mẫu chế phẩm canh thang từ gà khác nhau bằng phương pháp điện di trên gel. Phương pháp điện di trên gel được thực hiện trên toàn bộ các mẫu để phân tách hàm lượng protein theo trọng lượng phân tử. Hàm lượng protein được hiện thị bằng chất nhuộm màu xanh Simple. Trọng lượng phân tử của các băng protein có thể phân biệt được xác định.

Hai mẫu, mẫu đối chứng chứa phần lớn protein gà (băng 2) và chế phẩm canh thang AAC1 (băng 3) được pha loãng trong nước khử ion đến hàm lượng chất rắn cuối cùng bằng 1% và phân tích bằng phương pháp điện di trên gel SDS-PAGE (Fig.4) cùng với protein chỉ thị trọng lượng phân tử (băng 1). Phân bố trọng lượng phân tử của các băng protein chính được định lượng. Các dạng băng khác nhau có thể do các phương pháp xử lý khác nhau. Như được thể hiện trong Fig.4, chế phẩm AAC1 có dạng băng nhòe cho thấy mức độ phân giải protein cao mà có thể là do phương pháp điều chế chế phẩm này. Ít nhất 90% protein trong chế phẩm AAC1 là nằm trong khoảng từ 10kD đến 50 kD. Trái lại, mẫu đối chứng có phân bố trọng lượng phân tử rộng nằm trong khoảng từ 10 kD đến 300 kD.

Toàn bộ các nghiên cứu trên động vật được thể hiện trong bản mô tả được thực hiện theo các quy trình hướng dẫn đã được chấp thuận phù hợp với các nguyên tắc và quy định của chính phủ. Các thay đổi có thể được thực hiện trong các phương pháp và hệ thống nêu trên mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế. Do đó, cần lưu ý rằng đối tượng chứa trong phần mô tả nêu trên hoặc được thể hiện trong phần hình vẽ kèm theo chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế. Yêu cầu bảo hộ dưới đây được sử dụng để bao trùm các dấu hiệu cơ bản và đặc trưng được thể hiện trong

bản mô tả, cũng như các đoạn tuyên bố cụ thể trong phạm vi của phương pháp và hệ thống theo sáng chế có thể nằm trong phạm vi của sáng chế.

Mặc dù mỗi phương án nêu trên đã được minh họa với các thành phần khác nhau có các định hướng cụ thể tương ứng, cần được hiểu rằng hệ thống và phương pháp như được mô tả trong sáng chế có thể được thực hiện theo nhiều cách thức cụ thể với các thành phần khác nhau được đặt tại nhiều vị trí và định hướng chung và vẫn nằm trong phạm vi và tinh thần của sáng chế. Hơn nữa, các biến thể tương đương thích hợp có thể được sử dụng thay thế hoặc bổ sung cho các thành phần, chức năng khác và việc sử dụng các thành phần thay thế hoặc bổ sung này là hiển nhiên đối với chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này và do đó được xem là nằm trong phạm vi của sáng chế. Do đó, các ví dụ nêu trên chỉ được xem là minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế, và sáng chế không chỉ giới hạn ở các phần mô tả chi tiết nêu trên mà cũng có thể được cải biến trong phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Toàn bộ các tài liệu tham khảo được viện dẫn trong sáng chế, bao gồm các patent, đơn patent, bài báo khoa học và các tài liệu công bố khác, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> INTERNATIONAL DEHYDRATED FOODS, INC.  
 <120> CHẾ PHẨM ĐIỀU CHẾ TỪ CÁC BỘ PHẬN GIA CẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM NÀY  
 <130> 556818  
 <140> NA  
 <141> 2014-07-08  
 <160> 43  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 1  
 uacaguacug ugauaacuga a 21  
 <210> 2  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 2  
 uacaguacug ugauagcuga a 21  
 <210> 3  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 3  
 uaaagugcug acagugcaga u 21  
 <210> 4  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 4  
 ucccugagac ccuaacuugu ga 22  
 <210> 5  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 5  
 cagugguuuu acccuauggu ag 22  
 <210> 6  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 6  
 uguaguguuu ccuacuuuau gga 23  
 <210> 7  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 7  
 uagcagcacg uaaauauugg cg 22  
 <210> 8  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 8  
 caaagugcuu acagugcagg uag 23  
 <210> 9  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 9  
 uagcagcaca gaaauauugg c 21  
 <210> 10  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 10  
 ugugcaaauc uaugcaaaac uga 23  
 <210> 11  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 11  
 ugugcaaauc caugcaaaac uga 23  
 <210> 12  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Rattus norvegicus

|                           |    |
|---------------------------|----|
| <400> 12                  |    |
| uaaagugcuu auagugcagg uag | 23 |
| <210> 13                  |    |
| <211> 23                  |    |
| <212> ARN                 |    |
| <213> Rattus norvegicus   |    |
| <400> 13                  |    |
| caaagugcuc auagugcagg uag | 23 |
| <210> 14                  |    |
| <211> 21                  |    |
| <212> ARN                 |    |
| <213> Rattus norvegicus   |    |
| <400> 14                  |    |
| aucacauugc cagggauuuc c   | 21 |
| <210> 15                  |    |
| <211> 21                  |    |
| <212> ARN                 |    |
| <213> Rattus norvegicus   |    |
| <400> 15                  |    |
| aucacauugc cagggauuac c   | 21 |
| <210> 16                  |    |
| <211> 21                  |    |
| <212> ARN                 |    |
| <213> Rattus norvegicus   |    |
| <400> 16                  |    |
| uucacagugg cuaaguuccg c   | 21 |
| <210> 17                  |    |
| <211> 23                  |    |
| <212> ARN                 |    |
| <213> Rattus norvegicus   |    |
| <400> 17                  |    |
| aaagugcuuc cacuuugugu gcc | 23 |
| <210> 18                  |    |
| <211> 22                  |    |
| <212> ARN                 |    |
| <213> Rattus norvegicus   |    |
| <400> 18                  |    |
| uagcaccauu ugaaaucggu ua  | 22 |
| <210> 19                  |    |
| <211> 22                  |    |
| <212> ARN                 |    |
| <213> Rattus norvegicus   |    |
| <400> 19                  |    |
| uguaaacauc cuacacucag cu  | 22 |
| <210> 20                  |    |
| <211> 22                  |    |
| <212> ARN                 |    |
| <213> Rattus norvegicus   |    |
| <400> 20                  |    |
| uguaaacauc cccgacugga ag  | 22 |
| <210> 21                  |    |
| <211> 22                  |    |
| <212> ARN                 |    |
| <213> Rattus norvegicus   |    |
| <400> 21                  |    |
| uguaaacauc cuugacugga ag  | 22 |
| <210> 22                  |    |
| <211> 22                  |    |
| <212> ARN                 |    |
| <213> Rattus norvegicus   |    |
| <400> 22                  |    |
| cagcagcaau ucauguuuug ga  | 22 |
| <210> 23                  |    |
| <211> 23                  |    |
| <212> ARN                 |    |
| <213> Rattus norvegicus   |    |
| <400> 23                  |    |
| aggcagugua guuagcugau ugc | 23 |
| <210> 24                  |    |
| <211> 21                  |    |
| <212> ARN                 |    |
| <213> Rattus norvegicus   |    |
| <400> 24                  |    |
| aaauaaacac agauggccug u   | 21 |
| <210> 25                  |    |
| <211> 22                  |    |
| <212> ARN                 |    |
| <213> Rattus norvegicus   |    |
| <400> 25                  |    |
| uggcagugua uuguagcug gu   | 22 |

```

<210> 26
<211> 23
<212> ARN
<213> Rattus norvegicus
<400> 26
caaagugcug uucgugcagg uag 23
<210> 27
<211> 22
<212> ARN
<213> Rattus norvegicus
<400> 27
uggacggaga acugauaagg gu 22
<210> 28
<211> 21
<212> ARN
<213> Rattus norvegicus
<400> 28
uucaaguaau ucaggauagg u 21
<210> 29
<211> 23
<212> ARN
<213> Rattus norvegicus
<400> 29
uagcaccauu ugaaucagu guu 23
<210> 30
<211> 22
<212> ARN
<213> Rattus norvegicus
<400> 30
uagcaccauu ugaaucggu ua 22
<210> 31
<211> 22
<212> ARN
<213> Rattus norvegicus
<400> 31
uguaaacauc cucgacugga ag 22
<210> 32
<211> 22
<212> ARN
<213> Rattus norvegicus
<400> 32
uggcaguguc uuagcugguu gu 22
<210> 33
<211> 22
<212> ARN
<213> Rattus norvegicus
<400> 33
gccugcuggg guggaaccug gu 22
<210> 34
<211> 21
<212> ARN
<213> Rattus norvegicus
<400> 34
uaaagugcug acagucaga u 21
<210> 35
<211> 23
<212> ARN
<213> Rattus norvegicus
<400> 35
agcugguguu gugaauagg ccg 23
<210> 36
<211> 22
<212> ARN
<213> Rattus norvegicus
<400> 36
ucagugcauc acagaacuuu gu 22
<210> 37
<211> 21
<212> ARN
<213> Rattus norvegicus
<400> 37
uagcagcaca gaaauauugg c 21
<210> 38
<211> 23
<212> ARN
<213> Rattus norvegicus
<400> 38
ugugcaaauc caugcaaac uga 23
<210> 39
<211> 23

```

|            |                   |    |
|------------|-------------------|----|
| <212>      | ARN               |    |
| <213>      | Rattus norvegicus |    |
| <400>      | 39                |    |
| caaagugcuc | auagugcagg uag    | 23 |
| <210>      | 40                |    |
| <211>      | 21                |    |
| <212>      | ARN               |    |
| <213>      | Rattus norvegicus |    |
| <400>      | 40                |    |
| uucaaguaau | ucaggauagg u      | 21 |
| <210>      | 41                |    |
| <211>      | 23                |    |
| <212>      | ARN               |    |
| <213>      | Rattus norvegicus |    |
| <400>      | 41                |    |
| ucucacacag | aaaucgcacc cgu    | 23 |
| <210>      | 42                |    |
| <211>      | 19                |    |
| <212>      | ARN               |    |
| <213>      | Rattus norvegicus |    |
| <400>      | 42                |    |
| auguugcucg | gugaacccc         | 19 |
| <210>      | 43                |    |
| <211>      | 22                |    |
| <212>      | ARN               |    |
| <213>      | Rattus norvegicus |    |
| <400>      | 43                |    |
| uacgucaucg | ucgucaucgu ua     | 22 |

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm điều chế từ các bộ phận gia cầm, chứa lượng được gia tăng của chondroitin sulfat và có tỷ lệ nhất định giữa axit amin prolin và axit amin histidin có nguồn gốc từ các bộ phận gia cầm, trong đó hàm lượng của chondroitin sulfat có nguồn gốc từ các bộ phận gia cầm ít nhất bằng 6% khối lượng tính theo tổng lượng chất rắn khô của chế phẩm, và trong đó tỷ lệ khối lượng nhất định giữa axit amin prolin và axit amin histidin có nguồn gốc từ các bộ phận gia cầm ít nhất bằng 4:1, chế phẩm này được điều chế ở dạng lỏng hoặc dạng rắn, trong đó ít nhất 50% protein trong chế phẩm này có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 15kD đến 70kD.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này được điều chế ở dạng lỏng và còn chứa hợp chất polyphenol có nguồn gốc từ các bộ phận gia cầm với hàm lượng ít nhất bằng 4000 $\mu$ g/mL đương lượng axit galic.
3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó tỷ lệ khối lượng giữa prolin và histidin ít nhất bằng 6:1.
4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa prolin có nguồn gốc từ các bộ phận gia cầm với hàm lượng ít nhất bằng 8% (khối lượng/khối lượng) tính theo hàm lượng chất rắn.
5. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa glyxin có nguồn gốc từ các bộ phận gia cầm, trong đó tỷ lệ khối lượng giữa glyxin và histidin có nguồn gốc từ các bộ phận gia cầm ít nhất bằng 6:1, và trong đó hàm lượng glyxin ít nhất bằng 12% (khối lượng/khối lượng) tính theo hàm lượng chất rắn.
6. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó tỷ lệ khối lượng giữa glyxin và histidin có nguồn gốc từ các bộ phận gia cầm ít nhất bằng 10:1.
7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa hydroxyprolin có nguồn gốc từ các bộ phận gia cầm, trong đó tỷ lệ khối lượng giữa hydroxyprolin và histidin có nguồn gốc từ các bộ phận gia cầm ít nhất bằng 4:1, và trong đó hàm lượng hydroxyprolin ít nhất bằng 7% (khối lượng/khối lượng) tính theo hàm lượng chất rắn.
8. Chế phẩm theo điểm 7, trong đó tỷ lệ khối lượng giữa hydroxyprolin và histidin có nguồn gốc từ các bộ phận gia cầm ít nhất bằng 6:1.

9. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa prolin có nguồn gốc từ các bộ phận gia cầm, trong đó hàm lượng prolin ít nhất bằng 9% khối lượng tính theo tổng lượng axit amin.

10. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa hydroxyprolin có nguồn gốc từ các bộ phận gia cầm, trong đó hàm lượng hydroxyprolin ít nhất bằng 7% khối lượng tính theo tổng lượng axit amin.

11. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa một hoặc nhiều axit amin mạch nhánh có nguồn gốc từ các bộ phận gia cầm, axit amin mạch nhánh này là ít nhất một axit amin mạch nhánh được chọn từ nhóm bao gồm leucin, isoleucin, và valin, trong đó hàm lượng axit amin mạch nhánh ít nhất bằng 5% khối lượng tính theo tổng lượng axit amin có trong chế phẩm này.

12. Chế phẩm theo điểm 11, trong đó hàm lượng axit amin mạch nhánh có nguồn gốc từ các bộ phận gia cầm ít nhất bằng 6% khối lượng tính theo tổng lượng axit amin có trong chế phẩm này.

13. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa ít nhất một thành phần bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm chiết xuất gừng, chiết xuất cà phê, chiết xuất nhân sâm, chiết xuất chè xanh, chiết xuất vỏ cây liễu, chiết xuất cây nữ hương, curcumin/turmeric, axit béo omega-3, dầu cá, dầu nhuễn thể, dầu táo, chiết xuất pycnogenol từ vỏ cây thông biển, chiết xuất hạt nho, chiết xuất hạt lanh, ribonucleaza, angiogenin, lactoferrin, lactoferrin giàu ribonucleaza, S-adenosyl metionin, protein collagen, peptit collagen, gelatin, chiết xuất quả bơ không có khả năng xà phòng hóa, chiết xuất đậu tương không có khả năng xà phòng hóa, chiết xuất hoa hublông, màng vỏ trứng, polypeptit có nguồn gốc từ sữa, casein, nước sữa, metylsulfonylmetan, chiết xuất cây ngọc giá, chiết xuất cây móng quỳ, bromelain, axit glutamic, cacao, chiết xuất cây la hán, vitamin E, vitamin D3, chiết xuất quả óc chó, và hỗn hợp của chúng.

14. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa thành phần bổ sung là protein collagen.

15. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này có tỷ lệ khối lượng giữa protein và ẩm nằm trong khoảng từ 999:1 đến 1:999.

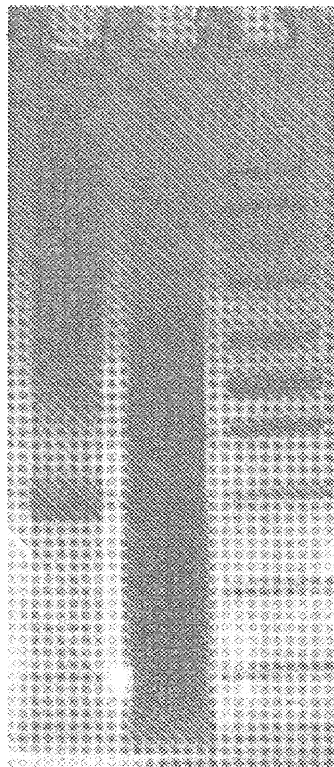
16. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó các bộ phận gia cầm có nguồn gốc từ gà.

17. Phương pháp điều chế chế phẩm từ các bộ phận gia cầm, bao gồm các bước:

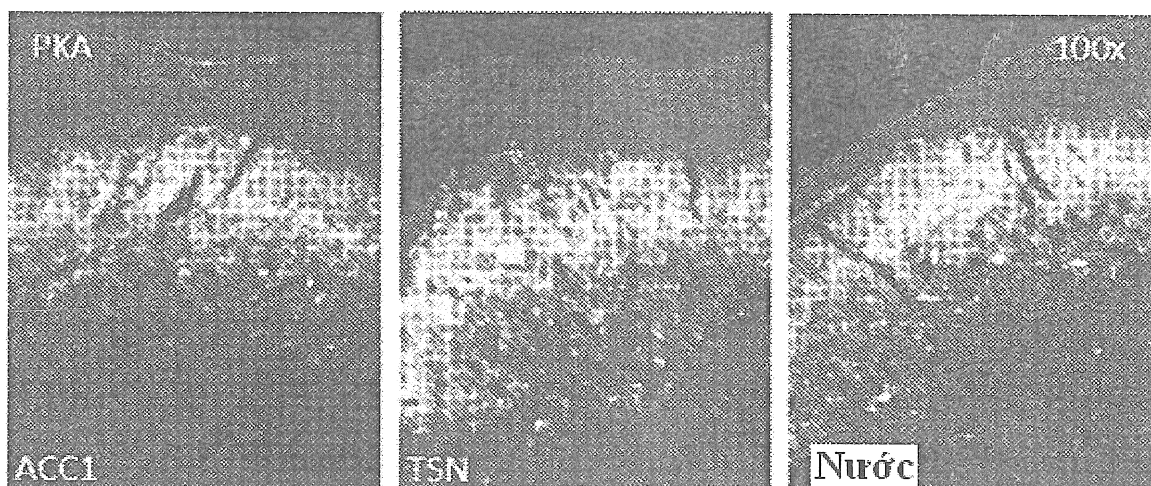
(a) nghiền toàn bộ con gia cầm hoặc các bộ phận của nó thành các miếng có kích cỡ trung bình nhỏ hơn 2cm,

(b) hầm các miếng thu được ở bước (a) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 150°C trong khoảng 8 đến 360 phút, và

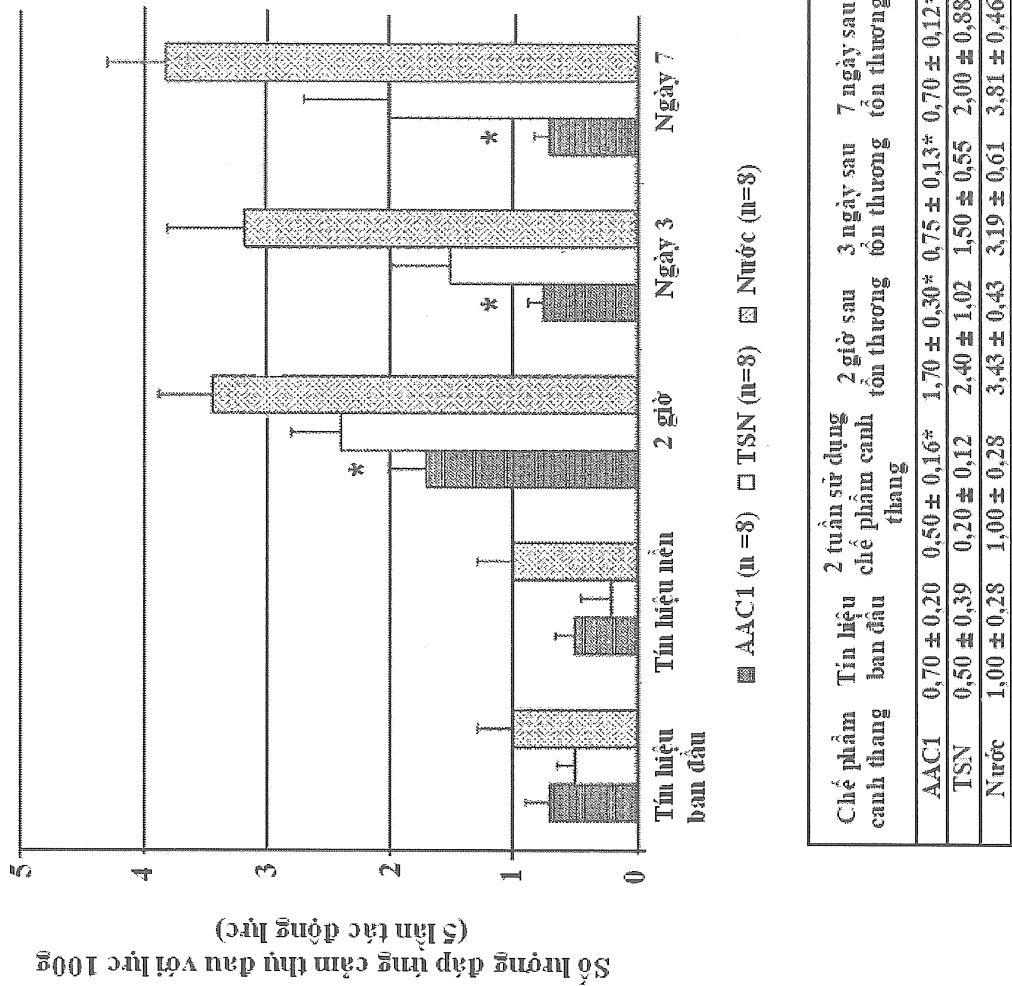
(c) loại bỏ các chất không hòa tan để thu được chế phẩm ở dạng lỏng, trong đó lượng chondroitin sulfat có trong chế phẩm này ít nhất bằng 7% khối lượng tính theo tổng lượng chất rắn khô.



**Fig.1**

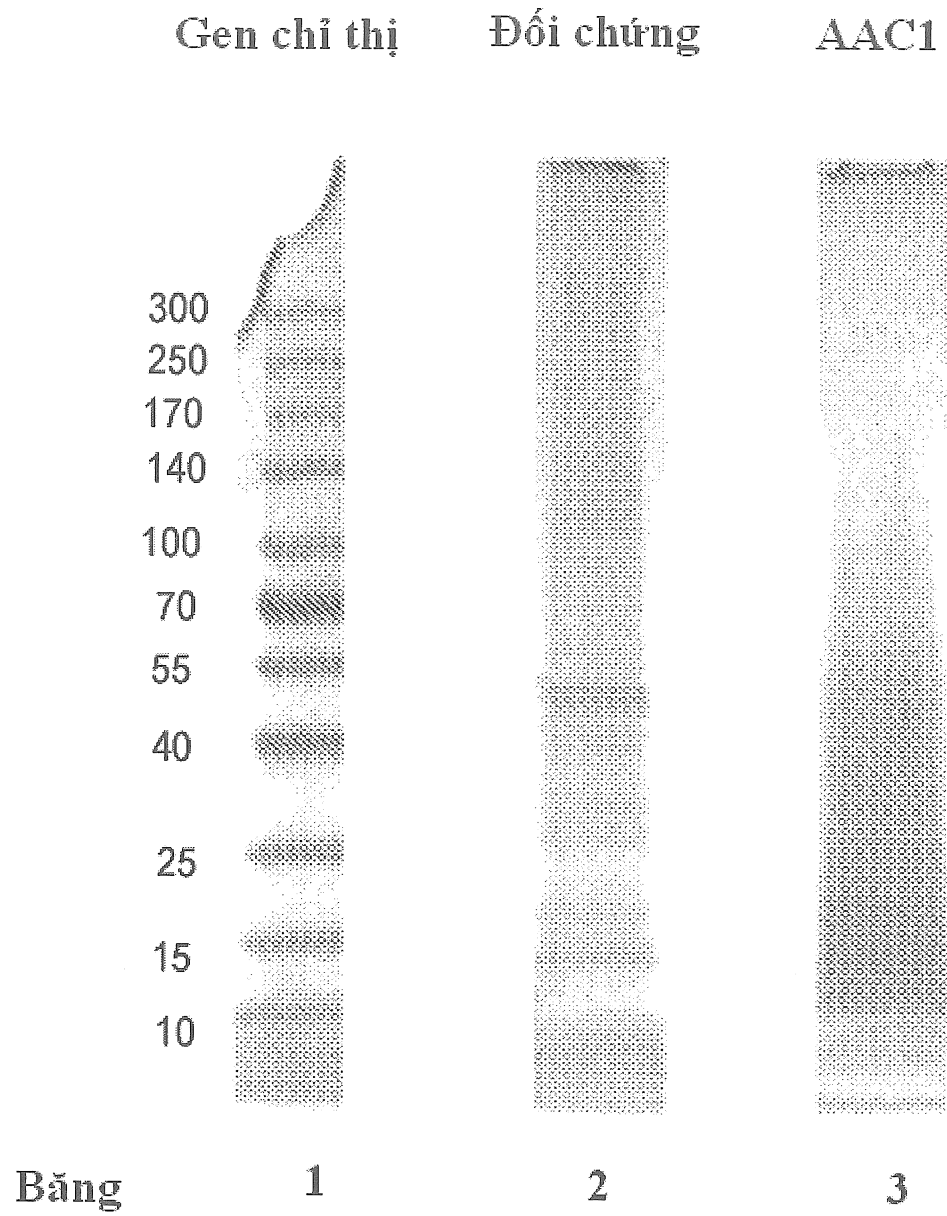


**Fig.2**



\* = mức độ khác biệt thu được từ TMD, # = mức độ khác biệt thu được từ TSN

Fig.3

**Fig.4**