



(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)



1-0028821

(51)⁷ A61K 38/39; A23J 1/04; A23L 1/305; (13) B
A61K 38/17; C07K 14/00; A61K 47/48;
A61Q 19/08; C07K 1/00; A23J 1/02

(21) 1-2013-01431

(22) 29/09/2011

(86) PCT/EP2011/067028 29/09/2011

(87) WO 2012/065782 A2 24/05/2012

(30) 10 2010 060 564.6 15/11/2010 DE

(45) 25/07/2021 400

(43) 25/09/2013 306A

(73) GELITA AG (DE)

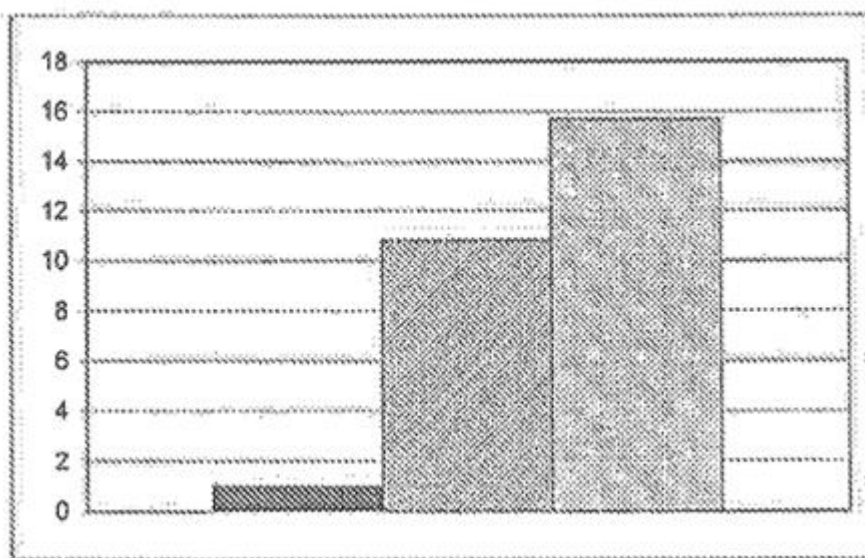
Uferstraße 7, 69412 Eberbach, Germany

(72) HAUSMANN, Stephan (DE); GIESEN-WIESE, Monika (DE); OESSER, Steffen (DE).

(74) Trung tâm Tư vấn sở hữu trí tuệ và đầu tư (LUVINA LAW FIRM)

(54) SẢN PHẨM THỦY PHÂN CỦA COLAGEN DÙNG ĐỂ CẢI THIỆN SỨC KHỎE DA, TÓC VÀ/HOẶC MÓNG TAY NGƯỜI

(57) Sáng chế đề cập đến sản phẩm thủy phân của collagen dùng để cải thiện sức khỏe da, tóc và/hoặc móng tay con người, trong đó ít nhất là 90% trọng lượng sản phẩm thủy phân của collagen có trọng lượng phân tử nhỏ hơn 3.500 Da và sản phẩm thủy phân của collagen chứa ít nhất bốn chuỗi axit amin đặc trưng với trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 600 đến 1.200 Da.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến sản phẩm thủy phân của collagen dùng để cải thiện sức khỏe da, tóc và/hoặc móng tay người.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong thời gian gần đây được biết rằng hiệu ứng ưu việt có thể đạt được liên quan đến sức khỏe của da, cũng như tóc và/hoặc móng tay người khi sử dụng sản phẩm thủy phân của collagen qua đường miệng (xem ví dụ, Vivian Zague: "A new view concerning the effects of collagen hydrolysate by the oral intake on skin properties" trong Dermatol Res. Arch. 2008 (9) 479-483). Cải thiện sức khỏe của da trong bối cảnh này được hiểu là tất cả các ảnh hưởng tích cực trên các đặc tính và chức năng tự nhiên của da, trong đó các đặc tính và chức năng này bị suy giảm bởi hậu quả của cả sự lão hóa lẫn ảnh hưởng tiêu cực khác nhau của môi trường. Bổ sung một lượng sản phẩm thủy phân của collagen cũng có tác dụng có lợi trên các đặc tính của tóc và/hoặc móng tay.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là tăng cường hơn nữa tác động tích cực của sản phẩm thủy phân của collagen trên sức khỏe của da, tóc và/hoặc móng tay và đề xuất sản phẩm thủy phân của collagen có hiệu quả đặc biệt này.

Để đạt được mục đích này, sáng chế đề xuất sản phẩm thủy phân của collagen trong đó ít nhất 90% trọng lượng của sản phẩm thủy phân của collagen có trọng lượng phân tử nhỏ hơn 3.500 Da, và trong đó sản phẩm thủy phân của collagen chứa ít nhất bốn chuỗi axit amin đặc trưng với trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 600 đến 1.200 Da.

Sản phẩm thủy phân của collagen chứa chuỗi axit amin với độ dài chuỗi hoặc khối lượng phân tử khác nhau, được tạo ra trong quá trình phân bố của các chuỗi axit amin

trong collagen, trong đó sự phân bố trọng lượng phân tử của các chuỗi axit amin khác nhau có thể tùy thuộc đáng kể vào điều kiện thủy phân. Thật ngạc nhiên rằng một sản phẩm thủy phân của collagen với các thuộc tính nói trên có tác dụng đặc biệt thuận lợi trên sức khỏe của da ở những khía cạnh khác nhau, tức là thể hiện kết quả tốt hơn một cách đáng kể so với sản phẩm thủy phân của collagen sử dụng trước đó có chứa một tỷ lệ nhỏ chuỗi axit amin có phân tử thấp và/hoặc không chứa các chuỗi axit amin đặc trưng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1A đến 1C: Đồ thị biểu diễn sự kích thích tổng hợp collagen dạng I, biglycan hoặc versican;

Hình 2A và 2B: Đồ thị biểu diễn sự gia tăng độ ẩm cho da trên những con chuột không có lông;

Hình 3: Đồ thị biểu diễn việc kích thích tổng hợp của CE-protein;

Hình 4A đến 4C: Phổ khối MALDI của các sản phẩm thủy phân của collagen khác nhau; và

Hình 5A và 5B: Đồ thị biểu diễn việc kích thích tổng hợp collagen loại I, decorin và versican.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sự phân bố trọng lượng phân tử của sản phẩm thủy phân của collagen nằm trong giới hạn ít nhất từ 90% trọng lượng là dưới 3.500 Da và có thể được xác định rất chính xác ví dụ như bằng máy sắc ký rây phân tử qua sử dụng tiêu chuẩn hiệu chỉnh của các đoạn collagen.

Thông thường có ít nhất 45% trọng lượng của sản phẩm thủy phân của collagen có trọng lượng phân tử nhỏ hơn 1.500 Da, tức là một tỷ lệ nhất định các chuỗi axit amin của sản phẩm thủy phân của collagen là đặc biệt ngắn. Nó chỉ ra rằng sản phẩm thủy phân của collagen đang được sử dụng chỉ chứa một số lượng nhỏ thành phần phân tử thấp đặc biệt này lại có thể có tác động rất rõ rệt đến sức khỏe của da.

Trọng lượng phân tử trung bình (M_w trọng lượng trung bình) của sản phẩm thủy phân của collagen sử dụng theo sáng chế nằm trong phạm vi khoảng từ 1.700 đến khoảng 2.300 Da.

Sự hiện diện của các chuỗi axit amin đặc trưng góp phần làm tăng hiệu quả của sản phẩm thủy phân của collagen, có thể được đặc biệt xác định bằng phương tiện quang phổ khối lượng-MALDI, qua đó các chuỗi axit amin đặc trưng xuất hiện trong phổ quang phổ khối lượng là những đỉnh. Ít nhất bốn chuỗi axit amin đặc trưng được xác định sự phân bố trọng lượng phân tử bằng quang phổ khối lượng-MALDI, ít nhất một đỉnh có cường độ gấp đôi, tiếp theo ít nhất một đỉnh có cường độ gấp bốn so với các đỉnh xung quanh.

Một phương án được ưu tiên của sáng chế là các sản phẩm thủy phân của collagen chứa một chuỗi axit amin giữa 620 và 690 Da, một chuỗi axit amin giữa 790 và 860 Da, một chuỗi axit amin giữa 980 và 1.050 Da và một chuỗi axit amin giữa 1175 và 1245 Da. Các chuỗi axit amin này phân biệt sản phẩm thủy phân của collagen theo sáng chế với sản phẩm thủy phân của collagen đã được biết đến trên cơ sở cấu trúc đặc trưng.

Sản phẩm thủy phân của collagen có thể bổ sung các chuỗi axit amin đặc trưng giữa 1.500 và 3.500 Da, đó cũng là một điểm đặc biệt để phân biệt với sản phẩm thủy phân của collagen sản xuất theo kỹ thuật chuẩn đã biết.

Các sản phẩm thủy phân của collagen tốt nhất là có một tỷ lệ hydroxyprolin từ 12% trọng lượng hoặc hơn. Các hydroxyprolin axit amin hình thành bởi quá trình thủy phân hậu dịch mã của prolin trong collagen, do đó một tỷ lệ cao của hydroxyprolin trong sản phẩm thủy phân của collagen là thước đo về sự vắng mặt đáng kể của mô liên kết protein khác (ví dụ elastin và proteoglycan), tùy thuộc vào phương pháp sản xuất mà một số lượng nhất định các đoạn của nó có thể được chứa trong sản phẩm thủy phân của collagen.

Sẽ thuận lợi nếu sản phẩm thủy phân của collagen được sản xuất bằng cách thủy phân gelatin với enzym. Gelatin bao gồm collagen biến tính có được từ các nguồn khác

nhau, nó được các nhà chuyên môn làm ra từ các công nghệ đã được biết đến như từ các mô liên kết hoặc từ xương của nhiều loại động vật. Trong phạm vi của sáng chế này, gelatin sử dụng như nguyên liệu ban đầu cho sản phẩm thủy phân của collagen tốt nhất là nên lấy từ da của động vật có vú, đặc biệt là từ da heo hoặc trâu, bò, mặc dù việc sử dụng gelatin từ gia cầm là không loại trừ.

Quá trình thủy phân gelatin bằng enzym thường diễn ra theo nguyên tắc bởi ít nhất một endoproteaza, trong phạm vi sáng chế nó được ưu tiên sử dụng nhiều endoproteaza (tức là ít nhất hai endoproteaza khác nhau), điều đó ảnh hưởng đến thành phần các axit amin của các sản phẩm thủy phân của collagen tương ứng và làm tăng hiệu quả tích cực của các sản phẩm thủy phân trên sức khỏe của da, tóc và/hoặc móng tay.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, các sản phẩm thủy phân của collagen được tạo bởi các tác động liên tục của ít nhất hai endoproteaza với tính đặc trưng khác nhau, đặc biệt là của ít nhất hai metaloproteaza khác nhau và/hoặc proteaza serin, tức là với tác động của proteaza, mà trong mỗi trường hợp những chuỗi axit amin của các phân tử collagen tách ra trước cũng như sau đó các axit amin xác định. Sẽ thuận lợi khi các metaloproteaza và/hoặc proteaza serin là enzym từ vi khuẩn vi sinh *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aspergillus oryzae* và *Aspergillus melleus*.

Bằng cách chọn endoproteaza phù hợp, không chỉ có thể thu được sự phân bố trọng lượng phân tử đặc trưng của sản phẩm thủy phân của collagen, mà còn ảnh hưởng tới các vị trí đầu nối của chuỗi axit amin có chứa các chuỗi axit amin trong quá trình thủy phân. Trong lĩnh vực này, một ví dụ ưu tiên nếu ít nhất 50% các đuôi N-axit amin của sản phẩm thủy phân của collagen là axit amin kỵ nước, đặc biệt là alanin, leuxin và isoleuxin.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng các chất sản phẩm thủy phân của collagen để kích thích tổng hợp sinh học protein nền ngoại bào bởi các tế bào da. Các tế bào da được tổng hợp từ các nguyên bào sợi đặc biệt, trong đó ngoài collagen (chủ yếu là dạng I), còn có elastin và proteoglycan. Sự hình thành của các protein với một số lượng đầy đủ quyết định việc tạo ra hoặc tái sinh protein nền ngoại bào của da, điều đó cũng quyết định đáng

kể cho các tính chất riêng của da, như sức căng và độ đàn hồi cũng như cân bằng độ ẩm của nó.

Các tế bào da bao gồm tế bào sừng, những tế bào này chịu trách nhiệm tạo nên keratin của lớp da ngoài cùng cũng như hình thành tóc và móng tay. Do đó, sự kích thích các tế bào khi sử dụng sản phẩm thủy phân của collagen theo sáng chế có thể mang lại sự cải thiện chức năng bảo vệ của da cũng như sức khỏe của tóc và/hoặc móng tay.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng các chất sản phẩm thủy phân của collagen để tăng sức căng của da và/hoặc làm giảm sự hình thành các nếp nhăn. Các tính chất của da thường bị xấu đi do qui luật của sự lão hóa cũng như hệ quả của ảnh hưởng môi trường, chẳng hạn như, bức xạ tia cực tím hoặc các độc tố. Bởi vì các collagen và elastin chịu trách nhiệm đối với sức căng, độ đàn hồi của da đặc biệt với protein nền, do vậy có thể tăng cường tổng hợp những chất này bằng việc sử dụng kích thích sản phẩm thủy phân của collagen theo sáng chế với một lượng đặc biệt, qua đó những ảnh hưởng có hại cho sức khỏe của da có thể được cải thiện đáng kể.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng các chất sản phẩm thủy phân của collagen để tăng độ ẩm của da. Một đóng góp đáng kể cho khả năng liên kết một lượng độ ẩm đầy đủ cho da được thực hiện bởi các chất nền ngoại bào chứa proteoglycan (ví dụ versican, biglycan và decorin), sự tổng hợp của nó được hiển thị bởi kích thích của các sản phẩm thủy phân của collagen sử dụng theo sáng chế. Độ ẩm của da cũng có thể bị giảm đi bởi ảnh hưởng xấu của môi trường như tia cực tím, mất độ ẩm thường xuyên thường dẫn tới giảm độ mềm mại, bị nứt nẻ và thừa chất keratin (đồi mồi) ở da.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng sản phẩm thủy phân của collagen để cải thiện chức năng bảo vệ của da. Đóng vai trò quan trọng trong chức năng bảo vệ này được gọi là CE-protein (protein "giảm cơ biểu bì hóa sừng"), trong đó chứng minh rằng quá trình tổng hợp sinh học của involucrin, loricrin và filaggrin được kích thích bởi các sản phẩm thủy phân của collagen phân tử thấp. Vì vậy, sử dụng sản phẩm thủy phân của collagen theo sáng chế sẽ hạn chế giảm độ ẩm và tăng cường chức năng bảo vệ cũng như làm tốt hơn khả năng bảo vệ tự nhiên của da chống lại vi trùng gây bệnh và các chất độc hại.

Việc sử dụng của sản phẩm thủy phân của collagen theo sáng chế cũng dẫn đến bổ sung thêm tác dụng chống oxy hóa trong lĩnh vực da, có thể giảm tổn thương ADN (đột biến), ví dụ do bức xạ tia cực tím hoặc các chất gây đột biến. Những đột biến như vậy là một trong những nguyên nhân gây lão hóa sớm của tế bào và do đó thúc đẩy các triệu chứng lão hóa của da (giảm độ căng, hình thành các nếp nhăn, vv), vì vậy quá trình này có thể bị ức chế bởi việc sử dụng theo sáng chế.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, các sản phẩm thủy phân của collagen được cung cấp qua đường miệng. Trong trường hợp ăn uống, sản phẩm thủy phân của collagen thường được chuyển bằng hệ thống tuần hoàn máu đến các địa điểm cần tác động, đặc biệt cho các tế bào da hơn là sử dụng tại chỗ. Ngoài ra, ứng dụng hình thức này về nguyên tắc ít tốn kém hơn cho người sử dụng.

Các sản phẩm thủy phân của collagen tốt nhất là nên sử dụng như là một thực phẩm bổ sung dinh dưỡng. Các sản phẩm thủy phân của collagen thường được sử dụng ở đây để cải thiện sức khỏe của da với ý nghĩa chăm sóc sức khỏe nói chung hoặc là một sự ứng dụng mỹ phẩm; sự bổ sung dinh dưỡng như vậy có thể được gọi là "thực phẩm dinh dưỡng" hoặc "mỹ phẩm dinh dưỡng". Tuy nhiên, cũng có thể sử dụng sản phẩm thủy phân của collagen trong phạm vi của sáng chế để điều trị rối loạn lâm sàng, ví dụ như hiện nay khi viêm da dị ứng, trong đó bệnh nhân có xu hướng gia tăng khô da, da nứt nẻ.

Bổ sung dinh dưỡng có thể được cung cấp dưới bất kỳ hình thức yêu thích nào, ví dụ như trong dạng viên nén, viên nang, viên bọc đường, dạng viên hoặc dung dịch (ví dụ trong ống hay trong đồ uống).

Các sản phẩm thủy phân của collagen bằng một cách khác cũng có thể được chứa trong các sản phẩm thực phẩm hoặc sản phẩm thực phẩm cao cấp, ví dụ trong bánh kẹo hoặc trong bột hòa tan để pha đồ uống. Theo cách này người sử dụng có thể dùng các sản phẩm thủy phân trong quá trình dinh dưỡng bình thường mà không cần nỗ lực bổ sung thêm (được gọi là "thực phẩm chức năng"). Trong bối cảnh này, đặc biệt thuận lợi nếu sản phẩm thủy phân của collagen không có mùi vị.

Sẽ là hợp lý nếu hàng ngày sử dụng khoảng 1,5-5 g, tốt hơn là khoảng 2-3 g, tốt hơn nữa là 2,3-2,7 g sản phẩm thủy phân của collagen. Đã được chứng minh rằng sức khỏe của da có thể được cải thiện đáng kể trong vòng một vài tuần do số lượng thủy phân này được đưa vào qua đường miệng.

Sản phẩm thủy phân của collagen theo sáng chế được sử dụng tại chỗ, tức là sử dụng trong các hình thức sản phẩm mỹ phẩm để áp dụng cho da, tóc và/hoặc móng tay. Các sản phẩm thủy phân của collagen có thể, trong trường hợp này, được đưa vào, đặc biệt là trong một loại kem, thuốc mỡ, một kem dưỡng da hoặc gel. Sẽ là thuận lợi nếu sản phẩm thủy phân của collagen được thêm vào một sản phẩm chăm sóc cơ thể, chẳng hạn như một sữa tắm hoặc dầu gội tóc, ví dụ như với một lượng khoảng từ 5 đến 10% trọng lượng.

Lợi thế này và các lợi thế tiếp theo của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn với sự trợ giúp của các ví dụ sau đây có sự tham khảo các hình đồ thị.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất và tính chất của sản phẩm thủy phân của collagen:

Để sản xuất một sản phẩm thủy phân của collagen theo sáng chế, nguyên liệu ban đầu được sử dụng là dung dịch gelatin da heo trong nước (loại A, 200-250 g Bloom) với nồng độ từ 20 đến 40% trọng lượng (chất khô). Gelatin được thủy phân bằng enzym liên tiếp bởi hai endoproteaza có nguồn gốc từ vi khuẩn khác nhau ở nhiệt độ từ 50 đến 60 độ C trong thời gian từ 120 đến 180 phút, trong đó enzym đầu tiên được sử dụng là một endoproteaza từ *Bacillus subtilis* hoặc vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* và enzym thứ hai là một endoproteaza từ vi khuẩn *Bacillus licheniformis*. Kết thúc các enzym được bất hoạt bằng nhiệt và dung dịch được làm khô bằng sấy phun.

Sự phân bố trọng lượng phân tử của sản phẩm thủy phân của collagen thu được có thể được xác định bằng phương pháp sắc ký thẩm thấu gel với các thông số sau:

Pha tĩnh: TSK 2000 SW XL (Tosoh Bioscience GmbH)

Pha động: 0,4 mol/l natri dihydrogen phosphat pH 5.3

Tốc độ dòng chảy: 0,5 ml/phút

Cân chỉnh tiêu chuẩn: xác định collagen –Dạng- I -mảnh (FILK, Freiberg)

Đầu dò: Bức Xạ Tia Cực Tím - Đầu dò Knauer K-2501 ở 214 nm

Kết quả phân tích xác định sự phân phối trọng lượng phân tử của sản phẩm thủy phân của collagen theo sáng chế (gọi là sản phẩm thủy phân phân tử thấp) được trình bày trong bảng 1. Để so sánh, sự phân bố trọng lượng phân tử của một sản phẩm thủy phân của collagen thương mại được xác định bằng phương pháp tương tự cũng được trình bày ở bảng 1 (gọi là sản phẩm thủy phân phân tử cao) dưới đây:

Bảng 1

Trọng lượng phân tử	Sản phẩm thủy phân phân tử thấp	Sản phẩm thủy phân phân tử cao
> 7,500 Da	< 5 % trọng lượng	< 10 % trọng lượng
3,500-7,500 Da	khoảng 12 – 18 % trọng lượng	khoảng 25-35 % trọng lượng
1,500–3,500 Da	khoảng 25 – 31 % trọng lượng	khoảng 29 – 35 % trọng lượng
500 – 1,500 Da	khoảng 40 – 46 % trọng lượng	khoảng 24 – 30 % trọng lượng
< 500 Da	khoảng 5 – 10 % trọng lượng	khoảng 2 – 5 % trọng lượng

Hàm lượng hydroxyprolin trong các sản phẩm thủy phân phân tử thấp là khoảng 12 đến 13% trọng lượng, và có thể xác định bằng phương pháp quang phổ sau khi oxy hóa với cloramin-T và chuyển hóa với p-dimethylaminobenzaldehyt. Hơn 50% các đuôi N-axit amin của các sản phẩm thủy phân là axit amin kỵ nước, đặc biệt là alanin, leuxin và isoleuxin.

Ví dụ 2: Sự kích thích tổng hợp protein chất nền ngoại bào:

Kích thích tổng hợp collagen (dạng I) cũng như các proteoglycan biglycan và versican đã được nghiên cứu trong ống nghiệm trên các nguyên bào sợi da người (tế bào da). Với mục đích này, trong mỗi trường hợp các tế bào được ủ trong 24 giờ với 0,5 mg/ml của sản phẩm thủy phân phân tử thấp hoặc chất thủy phân phân tử cao và sau đó sự hiện thị của (RNA) axit ribonucleic-collagen, axit ribonucleic-biglycan và axit

ribonucleic-versican được đọc bằng kỹ thuật thời gian thực PCR và một nửa định lượng được xác định (dựa trên đối chứng không có sản phẩm thủy phân).

Các kết quả được biểu diễn bằng những biểu đồ hình cột, trong đó hình 1A cho collagen dạng I, hình 1B cho biglycan và hình 1C cho versican, trong từng trường hợp các đồ thị đưa ra là giá trị trung bình của ít nhất 18 lần đo. Biểu thị (RNA) axit ribonucleic so với đối chứng (= 1) được biểu thị trên trục hoành. Cột lấp đầy bên trái là đối chứng, cột gạch chéo ở trung tâm là của các sản phẩm thủy phân phân tử cao (chất so sánh) và cột chấm bên phải là thủy phân phân tử thấp (theo sáng chế).

Điều đó chỉ ra rằng sự tổng hợp của ba protein chất nền ngoại bào được kích thích bởi hai sản phẩm thủy phân của collagen, trong đó tác động tích cực của thủy phân phân tử thấp trong mỗi trường hợp rõ rệt hơn so với thủy phân phân tử cao. Trong trường hợp của collagen, bên cạnh elastin chịu trách nhiệm chính cho độ căng và độ đàn hồi của da và trong trường hợp versican, chất đóng vai trò quan trọng trong việc cân bằng độ ẩm của da, thì việc làm tăng hiệu quả trên bởi các sản phẩm thủy phân phân tử thấp là đặc biệt rõ ràng.

Ví dụ 3: Tăng độ ẩm của da:

Ảnh hưởng của sản phẩm thủy phân của collagen tới độ ẩm da được nghiên cứu trực tiếp trên những con chuột không có lông. Thiết lập một hệ thống mô hình bằng những con chuột không có lông thường được sử dụng trong nghiên cứu da và những nhận biết thu được từ đó, về nguyên tắc có thể được chuyển sang cho da con người (xem ví dụ, T. Fujimura và cộng sự; J. Dermatol . Sci. 2000 (24) 105-111 và Y. Nishimori và cộng sự; J. Invest.Dermatol 2001 (117) 1458-1463).

Những con chuột được cho ăn hàng ngày với 150 μ g sản phẩm thủy phân của collagen cho mỗi kg trọng lượng cơ thể trong thời gian ba tuần và nhóm đối chứng được nhận thay thế bằng BSA. Đồng thời, tất cả các con chuột này đều bị chiếu hàng tuần một lượng bức xạ tia cực tím-B là 18 mJ/cm² bề mặt da, qua đó độ ẩm da bị suy giảm.

Bằng máy đo Corneometer CM 825 (nhà sản xuất: Courage & Khazaka) độ ẩm của da được đo sau một tuần và sau ba tuần. Nguyên tắc đo được dựa vào việc thay đổi điện dung của một tụ điện đo bởi hằng số điện môi của nước kết hợp với lớp da phía trên, mà hằng số điện môi này khác nhiều so với hằng số điện môi của hầu hết các vật liệu khác.

Các kết quả được trình bày trên đồ thị cột, hình 2A là số đo sau một tuần và hình 2B là số đo sau ba tuần, các đồ thị trong mỗi trường hợp là giá trị trung bình và sai số chuẩn của 7 lần đo. Độ ẩm so với chất đối chứng (= 1) được hiển thị trên trục hoành. Cột lấp đầy bên trái là chất đối chứng, cột gạch chéo ở trung tâm là các sản phẩm thủy phân phân tử cao (để so sánh) và cột chấm chấm bên phải là các sản phẩm thủy phân phân tử thấp (theo sáng chế).

Có thể thấy rằng sự gia tăng độ ẩm cho da do tác động của thủy phân phân tử thấp sau một tuần hay sau ba tuần trong mỗi trường hợp đều lớn do tác động của các sản phẩm thủy phân phân tử cao. Đây là bằng chứng về hiệu quả đặc biệt của các sản phẩm thủy phân sử dụng theo sáng chế trong việc cải thiện sức khỏe của da.

Ví dụ 4: Kích thích sự tổng hợp CE-protein (protein "giảm cơ biểu bì hóa sừng"):

Cái gọi là protein "giảm cơ biểu bì hóa sừng" đóng vai trò quan trọng trong chức năng bảo vệ của da chống lại sự xâm nhập của vi khuẩn gây bệnh và các chất độc hại. Sự tổng hợp các CE-protein involucrin, loricrin và filaggrin được xác định trên những con chuột không có lông, mà trước đó được cho ăn hàng ngày trong năm tuần với 150 mg sản phẩm thủy phân của collagen cho mỗi kg trọng lượng cơ thể (như mô tả ở trên). Hàm lượng các protein tương quan với nhóm đối chứng (được cho ăn với BSA) được xác định bằng phương pháp điện di protein trên gel SDS polyacrylamit và phương pháp Western blot với kháng thể đặc trưng sau khi chiết các protein từ da.

Các kết quả được hiển thị bằng đồ thị cột trong hình 3, trong đó mỗi đồ thị trong mỗi trường hợp là giá trị trung bình và sai số chuẩn từ 7 lần đo. Số lượng protein -CE sau khi được cho ăn với thủy phân phân tử thấp tương quan với đối chứng (= 1) được hiển

thị trên trục hoành. Cột bên trái là của involucrin, cột trung tâm là của loricrin và cột bên phải là của filaggrin.

Nó cho thấy rằng sự tổng hợp của cả ba CE-protein khảo sát đều được kích thích bởi sản phẩm thủy phân của collagen theo sáng chế qua đường miệng, thậm chí còn tăng hơn ba lần trong trường hợp của involucrin.

Ví dụ 5: Tác dụng chống oxy hóa của sản phẩm thủy phân của collagen:

Tác dụng chống oxy hóa của sản phẩm thủy phân của collagen phân tử thấp được xác định trong một hệ tế bào tự do bằng xét nghiệm Malondialdehyt.

Nó cho thấy sự hình thành của oxy hoạt tính được giảm đi trung bình khoảng 7% bởi sản phẩm thủy phân của collagen. Qua đó trong khu vực của da tần số tổn thương DNA có thể được giảm, các triệu chứng lão hóa có thể được khắc phục bằng cách sử dụng theo sáng chế.

Ví dụ 6: Phân tích sự phân bố trọng lượng phân tử bằng phương tiện quang phổ khối lượng MALDI:

Các sản phẩm thủy phân của collagen phân tử thấp theo sáng chế được sản xuất trong ví dụ 1 có trọng lượng phân tử trung bình khoảng 2.000 Da (sản phẩm thủy phân A), được so sánh với hai sản phẩm thủy phân của collagen thương mại với một trọng lượng phân tử trung bình khoảng 2.100 Da (sản phẩm thủy phân B) và khoảng 2.900 Da (sản phẩm thủy phân C).

Sự phân bố trọng lượng phân tử của ba sản phẩm thủy phân được phân tích chính xác bằng phương tiện quang phổ khối lượng MALDI (MS- MALDI). Với phương pháp này, các mẫu được điều chỉnh với axit trifloaxetic đến nồng độ 10 µg/µl và sau đó làm sạch bằng vật liệu µC₁₈. Các mẫu được chuẩn bị với chất nền HCCA (axit alpha-xyano-4-hydroxyxinamic) nhỏ vào khay mẫu MALDI và phổ khối lượng được xác định bằng máy quang phổ khối lượng Ultraflex-III-TOF/TOF (nhà sản xuất: Bruker Daltonics).

Hình 4A đến 4C hiển thị phổ khối lượng tương ứng cũng như sự phân chia trọng lượng phân tử của sản phẩm thủy phân của collagen A, B, C, trong đó trọng lượng phân tử

cũng như số khối lượng được hiển thị trên trục tung và cường độ được hiển thị trên trục hoành. So sánh ba phổ trong bảng 2 cho thấy cường độ các đỉnh tương ứng với sản phẩm thủy phân A theo sáng chế bao gồm các chuỗi axit amin đặc trưng mạnh gấp hai đến bốn lần so với các đỉnh xung quanh:

Bảng 2

Khoảng 656 Da
Khoảng 825 Da
Khoảng 1.014 Da
Khoảng 1.211 Da
Khoảng 1.927 Da
Khoảng 2.410 Da
Khoảng 3.433 Da

Đặc biệt, bốn chuỗi axit amin từ 600 và 1.500 Da không có tương đương với hai sản phẩm thủy phân thương mại B và C, và đây là tính đặc trưng của sản phẩm thủy phân A.

Ví dụ 7: Kích thích sự tổng hợp protein nền ngoại bào:

Sự kích thích trong tổng hợp collagen (dạng I) cũng như các proteoglycan decorin và versican được nghiên cứu trong ống nghiệm trên các nguyên bào sợi da người (tế bào da). Để tiến hành, trong mỗi trường hợp các tế bào được ủ trong 24 giờ, với 0,5 mg/ml sản phẩm thủy phân A, B và C và sự hiện diện của collagen-RNA, decorin-RNA và versican-RNA sau đó được xác định bằng kỹ thuật Thời gian thực-PCR và đánh giá một nửa định lượng. Decorin đóng vai trò quan trọng trong sự hình thành của các sợi collagen trong da.

Các kết quả được trình bày trên đồ thị hình cột cho sản phẩm thủy phân B là hình 5A và cho sản phẩm thủy phân C là hình 5B, trong đó trong mỗi trường hợp hiển thị RNA của sản phẩm thủy phân thương mại B hoặc C so với RNA hiển thị của sản phẩm thủy phân A theo sáng chế (= 1) được biểu diễn trên trục hoành. Cột bên trái là của

colagen dạng I, cột giữa là của decorin và cột bên phải là của versican. Trong từng trường hợp đây là giá trị trung bình của ít nhất 7 phép đo cũng như sai số chuẩn.

Dữ liệu cho thấy điều thú vị là, trong tất cả ba protein nền sự kích thích tổng hợp của RNA sản phẩm thủy phân A thấp hơn đáng kể so với hai sản phẩm thủy phân B và C, trong khi trọng lượng phân tử trung bình trong số đó chỉ cao hơn một chút. Các chuỗi axit amin đặc trưng của sản phẩm thủy phân A đóng vai trò quyết định tới tác động tích cực của nó.

Ví dụ 8: Công thức ví dụ cho các thực phẩm (bổ sung) và các sản phẩm mỹ phẩm:

Một số công thức điển hình cho việc sử dụng sản phẩm thủy phân của colagen theo sáng chế được đưa ra dưới đây, những công thức này có thể được sửa đổi theo nhiều cách khác nhau:

Viên nang (Thực phẩm bổ sung dinh dưỡng):

Glyxerin	53,67% trọng lượng
Sản phẩm thủy phân của colagen	21,95% trọng lượng
Gelatin	10,08% trọng lượng
Bột đậu Guar	6,00% trọng lượng
Chất tạo nhũ	5,00% trọng lượng
Axit xitric	2,00% trọng lượng
Hương (cassis)	0,50% trọng lượng
Tinh dầu cam	0,50% trọng lượng
Axesulfam K (Đường ăn kiêng)	0,30% trọng lượng

Sôcôla:

Bột ca cao uớt	51,0% trọng lượng
Đường mía	22,4% trọng lượng
Bơ ca cao	16,6% trọng lượng

Sản phẩm thủy phân của collagen	10,0% trọng lượng
---------------------------------	-------------------

Đồ uống:

Nước	63,00% trọng lượng
Dung dịch Lô hội đậm đặc	31,00% trọng lượng
Sản phẩm thủy phân của collagen	4,00% trọng lượng
Đường mía	1,50% trọng lượng
Axit xitric	0,26% trọng lượng
Hương liệu và màu	0,24% trọng lượng
Chất tạo ngọt	0,0031% trọng lượng

Dầu gội đầu:

Nước	58,8% trọng lượng
Natri laureth-11 carboxylat	18,0% trọng lượng
Cocoamidopropyl betain	9,0% trọng lượng
Sản phẩm thủy phân của collagen	6,0% trọng lượng
PEG-6 caprylic/capric glyxerit	3,0% trọng lượng
PEG-150 distearat	2,5% trọng lượng
Laureth-7	2,0% trọng lượng
Kali sorbat	0,5% trọng lượng
Nước hoa	0,2% trọng lượng

Yêu cầu bảo hộ

1. Sản phẩm thủy phân của collagen dùng để cải thiện sức khỏe của da, tóc và/hoặc móng tay của con người,

trong đó sản phẩm thủy phân của collagen có nguồn gốc từ động vật có vú hoặc gia cầm,

trong đó sản phẩm thủy phân của collagen được tạo ra bởi tác động liên tiếp của ít nhất hai loại enzym metaloproteaza và/hoặc enzym serin proteaza với đặc tính khác nhau,

trong đó ít nhất 90% trọng lượng của sản phẩm thủy phân của collagen có trọng lượng phân tử dưới 3.500 Da,

trong đó sản phẩm thủy phân của collagen chứa ít nhất bốn peptit đặc trưng có trọng lượng phân tử từ 600 đến 1.200 Da, và

trong đó ít nhất bốn peptit đặc trưng, trong phân bố trọng lượng phân tử được xác định bằng phương pháp quang phổ khối MALDI, có cường độ ít nhất gấp đôi cường độ xung quanh chúng, quang phổ khối MALDI được thực hiện bằng cách điều chỉnh mẫu sản phẩm thủy phân của collagen trong axit trifloaxetic 0,1% đến nồng độ cuối cùng là 10 µg/µl, tinh chế mẫu đã điều chỉnh bằng cách sử dụng vật liệu µC₁₈, chuẩn bị mẫu với ma trận axit alpha-xyano-4-hydroxyxinamic (HCCA) trên mục tiêu MALDI, và xác định phổ khối của mẫu bằng máy quang phổ khối TOF/TOF.

2. Sản phẩm thủy phân của collagen theo điểm 1, trong đó ít nhất 45% trọng lượng sản phẩm thủy phân của collagen có trọng lượng phân tử dưới 1.500 Da.

3. Sản phẩm thủy phân của collagen dùng để cải thiện sức khỏe của da, tóc và/hoặc móng tay của con người,

trong đó sản phẩm thủy phân của collagen có nguồn gốc từ động vật có vú hoặc gia cầm,

trong đó sản phẩm thủy phân của collagen được tạo ra bởi tác động liên tiếp của ít nhất hai loại enzym metaloproteaza và/hoặc enzym serin proteaza với đặc tính khác nhau,

trong đó ít nhất 90% trọng lượng của sản phẩm thủy phân của collagen có trọng lượng phân tử dưới 3.500 Da,

trong đó sản phẩm thủy phân của collagen chứa ít nhất bốn peptit đặc trưng mà chứa một peptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 620 đến 690 Da, một peptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 790 đến 860 Da, một peptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 980 đến 1.050 Da và một peptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 1.175 đến 1.245 Da, và

trong đó ít nhất bốn peptit đặc trưng, trong phân bố trọng lượng phân tử được xác định bằng phương pháp quang phổ khối MALDI, có cường độ ít nhất gấp đôi cường độ xung quanh chúng, quang phổ khối MALDI được thực hiện bằng cách điều chỉnh mẫu sản phẩm thủy phân của collagen trong axit trifloaxetic 0,1% đến nồng độ cuối cùng là 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, tinh chế mẫu đã điều chỉnh bằng cách sử dụng vật liệu μC_{18} , chuẩn bị mẫu với ma trận axit alpha-xyano-4-hydroxyxinamic (HCCA) trên mục tiêu MALDI, và xác định phổ khối của mẫu bằng máy quang phổ khối TOF/TOF.

4. Sản phẩm thủy phân của collagen theo điểm 1,

trong đó sản phẩm thủy phân của collagen còn chứa các peptit đặc trưng khác, mỗi peptit có trọng lượng phân tử từ 1.500 đến 3.500 Da, và

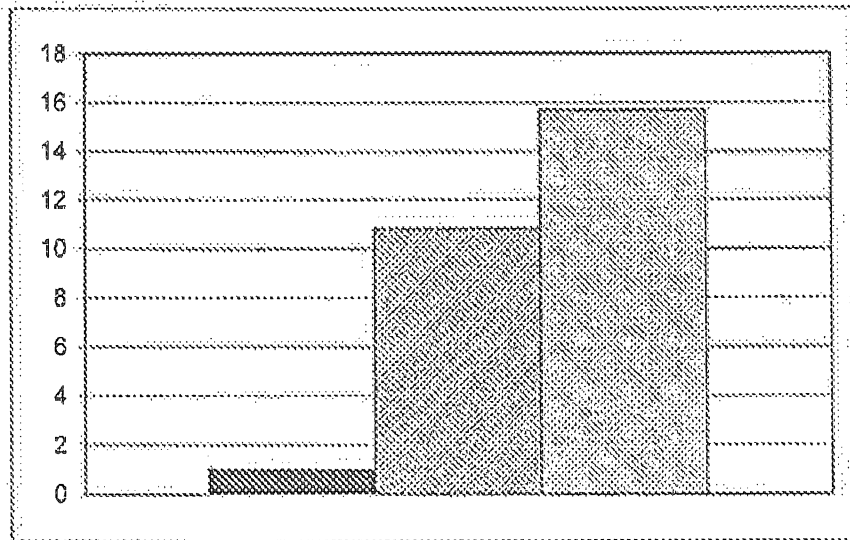
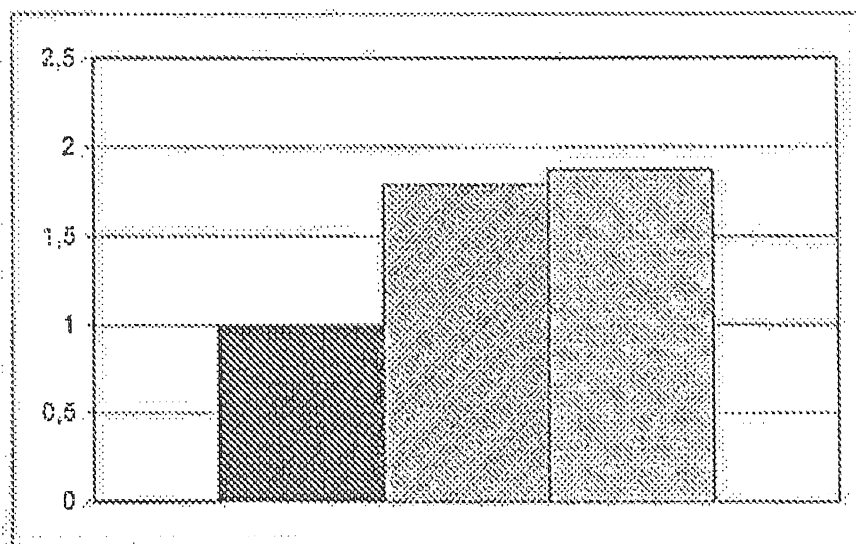
trong đó các peptit đặc trưng khác, trong phân bố trọng lượng phân tử được xác định bằng phương pháp quang phổ khối MALDI, có cường độ ít nhất gấp đôi cường độ xung quanh chúng, quang phổ khối MALDI được thực hiện bằng cách điều chỉnh mẫu sản phẩm thủy phân của collagen trong axit trifloaxetic 0,1% đến nồng độ cuối cùng là 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, tinh chế mẫu đã điều chỉnh bằng cách sử dụng vật liệu μC_{18} , chuẩn bị mẫu với ma trận axit alpha-xyano-4-hydroxyxinamic (HCCA) trên mục tiêu MALDI và xác định phổ khối của mẫu bằng máy quang phổ khối TOF/TOF.

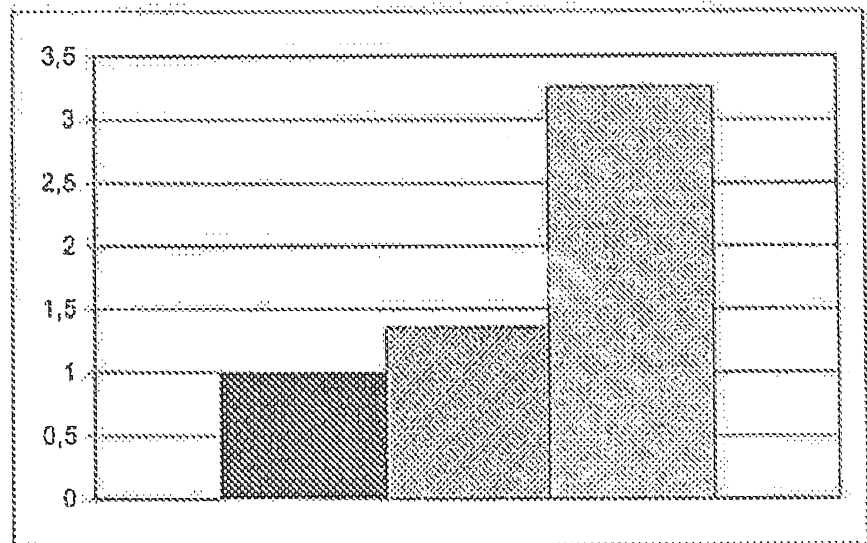
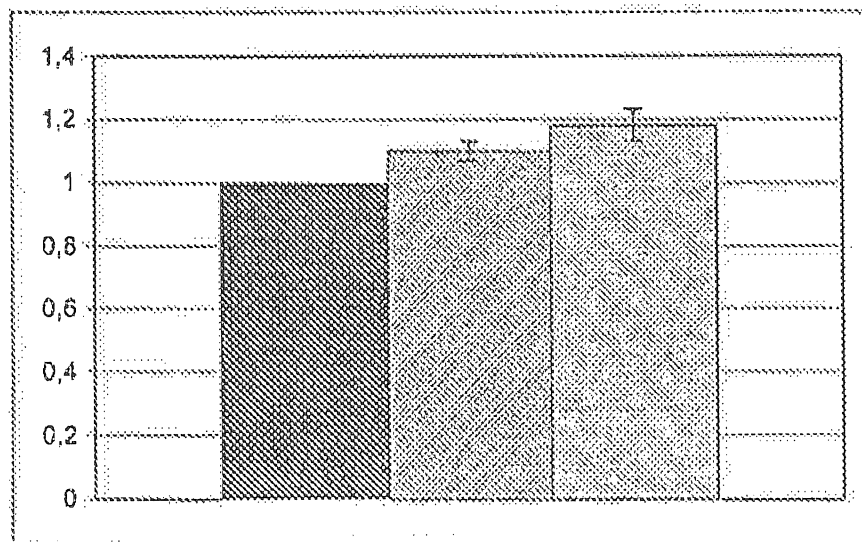
5. Sản phẩm thủy phân của collagen theo điểm 1, trong đó sản phẩm thủy phân của collagen có tỷ lệ hydroxyprolin từ 12% trọng lượng trở lên.

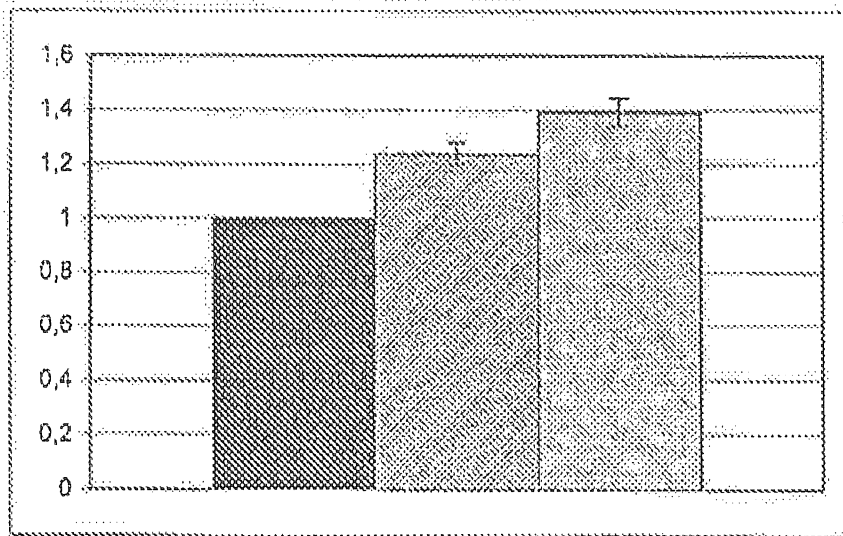
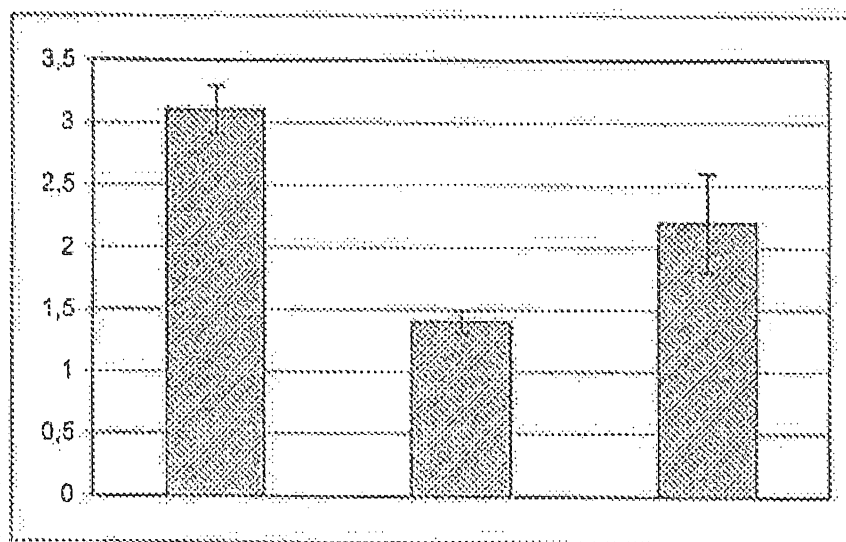
6. Sản phẩm thủy phân của collagen theo điểm 1, trong đó sản phẩm thủy phân của collagen được sản xuất bằng cách thủy phân gelatin bằng enzym.

7. Sản phẩm thủy phân của collagen theo điểm 1, trong đó metaloproteaza và/hoặc serin proteaza được chọn từ các enzym từ các vi sinh vật *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aspergillus oryzae* và *Aspergillus melleus*.

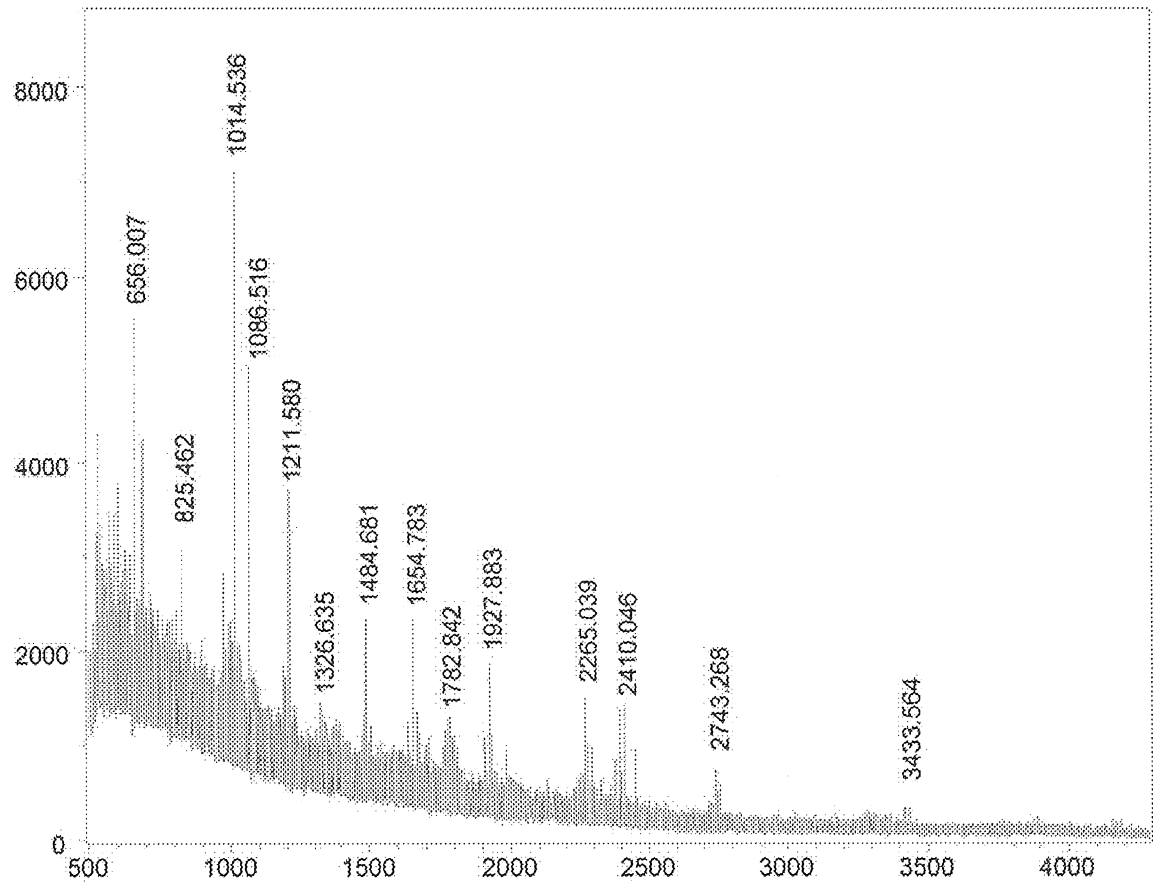
8. Sản phẩm thủy phân của collagen theo điểm 1, trong đó ít nhất 50% axit amin đầu cuối N của sản phẩm thủy phân của collagen là axit amin kỵ nước.

Hình 1A**Hình 1B**

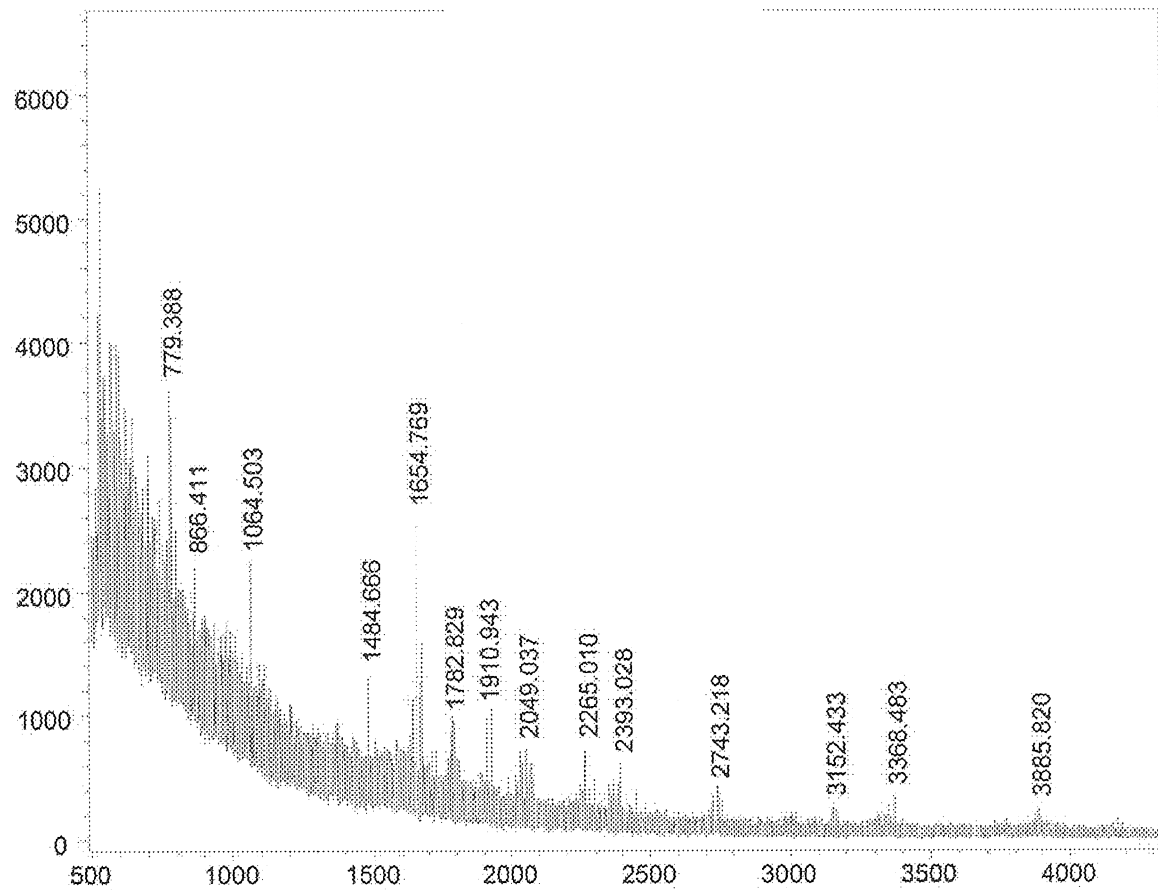
Hình 1C**Hình 2A**

Hình 2B**Hình 3**

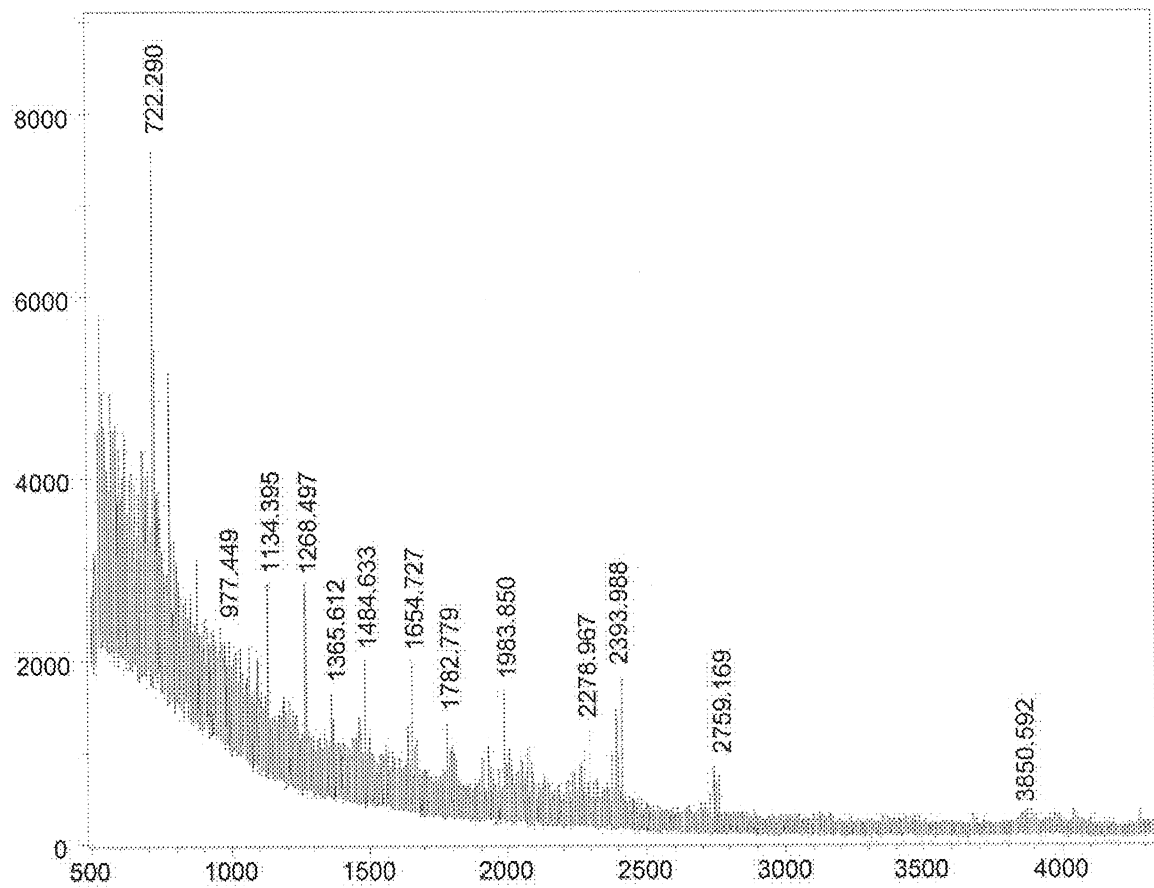
Hình 4A

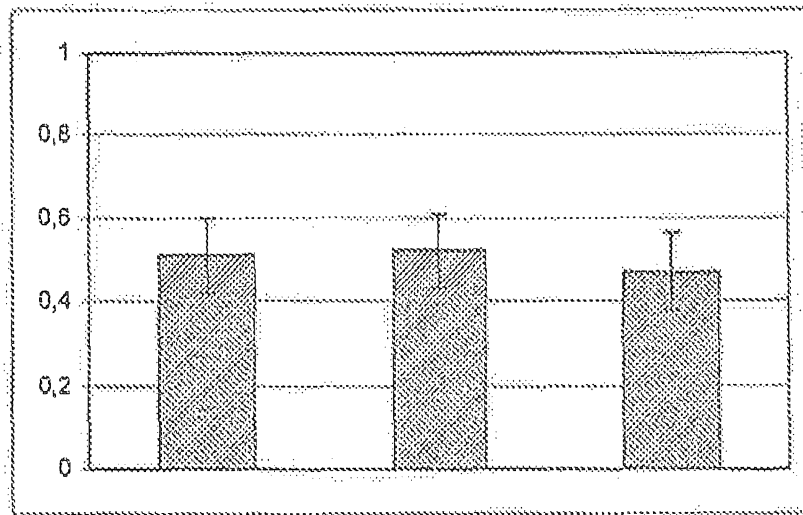


Hình 4B



Hình 4C



Hình 5A**Hình 5B**