



(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)



1-0031862

(51)<sup>7</sup> A23L 1/305; A61P 19/00; A61K 38/22 (13) B

(21) 1-2015-00458

(22) 31/07/2012

(86) PCT/JP2012/069392 31/07/2012

(87) WO 2014/020676 A1 06/02/2014

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/05/2015 326A

(73) MEGMILK SNOW BRAND CO., LTD. (JP)

1-1, Naebocho 6-chome, Higashi-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 065-0043 Japan

(72) OHMACHI, Aiko (JP); MATSUYAMA, Hiroaki (JP); MORITA, Yoshikazu (JP);  
ISHIDA, Yuko (JP); NARA, Takayuki (JP); KATO, Ken (JP); SERIZAWA, Atsushi  
(JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) NGUYÊN LIỆU PROTEIN, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ NGUYÊN LIỆU NÀY  
VÀ TÁC NHÂN TĂNG CƯỜNG ĐỘ BỀN CHẮC XƯƠNG CHỨA NGUYÊN  
LIỆU NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến nguyên liệu protein hữu dụng trong phòng ngừa và điều trị các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương, bệnh thấp khớp và viêm khớp bằng cách sử dụng hàng ngày. Nguyên liệu protein chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 15mg/100mg và lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza, theo tỷ lệ khối lượng so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong khoảng từ 0,3 đến 20. Sáng chế cũng đề cập đến tác nhân, thức ăn, đồ uống hoặc thực phẩm tăng cường độ bền chắc xương chứa nguyên liệu protein này hữu dụng trong phòng ngừa và điều trị các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương, bệnh thấp khớp và viêm khớp bằng cách dùng qua đường miệng. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến các phương pháp điều chế nguyên liệu protein này.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến nguyên liệu protein mới và thuốc, thức ăn, đồ uống hoặc thực phẩm chứa nguyên liệu protein và hữu dụng trong phòng ngừa và điều trị các bệnh về xương. Nguyên liệu có chức năng thúc đẩy quá trình tăng sinh tạo cốt bào và ngăn chặn quá trình biệt hóa hủy cốt bào và quá trình tiêu xương do hủy cốt bào. Do đó, nguyên liệu protein hữu dụng trong phòng ngừa và điều trị các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương, bệnh thấp khớp và viêm khớp.

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

Trong những năm gần đây, các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương và đau lưng gia tăng trên toàn cầu cùng với sự lão hóa trong xã hội và tương tự và trở thành một vấn đề xã hội nghiêm trọng. Nguyên nhân gây ra những căn bệnh này là do sự hấp thu canxi không đầy đủ, suy giảm khả năng hấp thu canxi, mất cân bằng hoocmon sau khi mãn kinh và tương tự. Xét thấy rằng, gia tăng khối lượng xương cơ thể nhiều nhất có thể bằng cách kích hoạt tạo cốt bào và quá trình hình thành xương từ giai đoạn sớm trong cuộc đời và sự gia tăng về khối lượng xương cực đại và độ bền chắc của xương (mật độ xương và chất lượng xương) là hữu hiệu trong việc phòng ngừa các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương và đau lưng. Lưu ý rằng, thuật ngữ “chất lượng xương” dùng để chỉ vi cấu trúc xương, quá trình quay vòng chuyển hóa, gãy xương vi thể và quá trình vôi hóa. Có thể thấy rằng, các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương và đau lưng có thể được phòng ngừa bằng cách ngăn chặn quá trình tiêu xương do hủy cốt bào. Xương được tiêu hủy và hình thành lặp đi lặp lại theo cách cân bằng (quá trình tái tạo xương). Tuy nhiên, các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương và đau lưng có thể xuất hiện khi quá trình tiêu xương vượt trội hơn quá trình tạo xương do sự thay đổi về cân bằng hoocmon sau khi mãn kinh và tương tự. Do đó, xương có thể được tăng

cường cứng cổ bằng cách ngăn chặn quá trình tiêu xương do hủy cốt bào và duy trì độ bền chắc của xương ở mức độ hằng định.

Theo quan điểm trên, thuốc, thức ăn, đồ uống, thức ăn hoặc tương tự, trong đó muối canxi như canxi cacbonat, canxi phosphat hoặc canxi lactat hoặc sản phẩm canxi tự nhiên như canxi trong nước sữa, bột xương bò hoặc vỏ trứng được bổ sung một cách riêng biệt, đã được dùng để tăng cường độ bền chắc xương. Thuốc, thức ăn, đồ uống, thực phẩm hoặc tương tự chứa sản phẩm canxi như vậy cùng với chất có tác dụng tăng cường hấp thu canxi như casein phosphopeptit hoặc oligosacarit cũng đã được sử dụng để tăng cường độ bền chắc xương. Tuy nhiên, tốc độ hấp thu canxi bằng 50% hoặc thấp hơn khi sử dụng thức ăn hoặc đồ uống chứa muối canxi hoặc sản phẩm canxi tự nhiên và phần lớn lượng canxi được sử dụng có thể được thải ra khỏi cơ thể mà không được hấp thu. Hơn nữa, ngay cả khi canxi được hấp thu vào trong cơ thể, nó không nhất thiết thể hiện tác dụng cải thiện sự chuyển hóa xương hoặc tác dụng tăng cường độ bền chắc xương, vì ái lực đối với xương có thể khác nhau tùy theo dạng xương hoặc loại thành phần dinh dưỡng cùng được sử dụng. Sản phẩm estrogen, sản phẩm vitamin D<sub>3</sub> hoạt tính, sản phẩm vitamin K<sub>2</sub>, sản phẩm bisphosphonat, sản phẩm canxitonin và sản phẩm tương tự đã được biết là được chất để điều trị bệnh loãng xương hoặc tăng cường độ bền chắc xương và các thuốc mới như kháng thể kháng RANKL cũng đã được phát triển. Tuy nhiên, các thuốc này có thể có tác dụng phụ như gây ra ù tai, đau đầu hoặc mất cảm giác ngon miệng. Hơn nữa, hiện tại các chất nêu trên ở trong tình trạng không thể bổ sung được vào thức ăn hoặc đồ uống theo quan điểm về độ an toàn, chi phí và yếu tố tương tự. Do đó, xét theo bản chất của các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương và đau lưng, việc phát triển tác nhân, thức ăn, đồ uống hoặc thực phẩm tăng cường độ bền chắc xương mà có thể được dùng theo đường miệng trong thời gian dài, làm gia tăng độ bền chắc của xương bằng cách thúc đẩy quá trình hình thành xương và ngăn chặn quá trình tiêu xương và có thể được kỳ vọng có tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh về xương là được mong đợi.

Có một số nguyên liệu thức ăn dùng để cải thiện độ bền chắc của xương,

ví dụ, đã được thông báo rằng, protein cơ bản thu được từ sữa hoặc phần peptit của sản phẩm thủy phân bằng enzym của nó thể hiện hoạt tính tăng sinh tạo cốt bào, hoạt tính ức chế tiêu xương do hủy cốt bào và do đó có tác dụng tăng cường độ bền chắc xương (xem tài liệu sáng chế 1). Cũng đã được thông báo rằng, angiogenin và lactoperoxidaza, chứa trong phần protein cơ bản thu được từ sữa, độc lập có chức năng cải thiện sự chuyển hóa xương (xem tài liệu sáng chế 2 đến 4).

Tài liệu nêu trong phần tình trạng kỹ thuật

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: JP-A-H08-151331

Tài liệu sáng chế 2: JP-A-H10-7585

Tài liệu sáng chế 3: JP-A-2004-238320

Tài liệu sáng chế 4: JP-A-2005-60321

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

Vấn đề được giải quyết bởi sáng chế

Mục đích của sáng chế là nhằm đề xuất nguyên liệu protein mới, nguyên liệu này an toàn, thúc đẩy mạnh quá trình tăng sinh tạo cốt bào trong khi ngăn chặn quá trình biệt hóa hủy cốt bào và quá trình tiêu xương do hủy cốt bào bằng cách sử dụng hàng ngày và do đó có thể tăng cường độ bền chắc xương.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất thuốc, thức ăn, đồ uống hoặc thức ăn tăng cường độ bền chắc xương, hữu dụng trong phòng ngừa và điều trị các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương, bệnh thấp khớp và viêm khớp bằng cách dùng theo đường miệng.

Cách thức giải quyết vấn đề

Tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, các tác dụng thúc đẩy hiệu quả quá trình tăng sinh tạo cốt bào và ngăn chặn quá trình biệt hóa hủy cốt bào và quá trình tiêu xương do hủy cốt bào có thể đạt được bằng cách sử dụng nguyên liệu protein chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng

cụ thể và còn chứa thêm lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza theo tỷ lệ khối lượng cụ thể so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin. Phát hiện này đã dẫn đến việc hoàn thành sáng chế.

Cụ thể, sáng chế đề xuất các khía cạnh sau:

(1) Nguyên liệu protein chứa: angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 15mg/100mg và lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza theo tỷ lệ khối lượng so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong khoảng từ 0,3 đến 20.

(2) Thức ăn, đồ uống hoặc thực phẩm chứa nguyên liệu protein theo mục (1).

(3) Tác nhân tăng cường độ bền chắc xương chứa nguyên liệu protein theo mục (1) làm hoạt chất.

(4) Phương pháp tăng cường độ bền chắc xương bao gồm bước sử dụng nguyên liệu protein theo mục (1) với lượng 5mg/ngày hoặc cao hơn.

(5) Phương pháp điều chế nguyên liệu protein theo mục (1), bao gồm các bước từ 1) đến 3) sau đây:

1) điều chế angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin;  
2) điều chế lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza; và

3) trộn lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza theo bước 2) ở trên và angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin theo bước 1) ở trên theo tỷ lệ khối lượng của lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza trên angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong khoảng từ 0,3 đến 20.

(6) Phương pháp sản xuất nguyên liệu protein theo mục (1), bao gồm bước chiết phần chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza từ sữa và/hoặc nguyên liệu thu được từ sữa theo tỷ lệ khối lượng của lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza trên angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy

phân của angiogenin nằm trong khoảng từ 0,3 đến 20.

(7) Phương pháp theo mục (6), còn bao gồm thêm bước làm thủy phân đối với angiogenin và/hoặc lactoperoxidaza chứa trong phần này bằng enzym.

Hiệu quả của sáng chế

Nguyên liệu protein theo sáng chế thể hiện tác dụng làm tăng cường độ bền chắc xương hiệu quả thông qua chức năng thúc đẩy quá trình tăng sinh tạo cốt bào và ngăn chặn quá trình biệt hóa hủy cốt bào và quá trình tiêu xương do hủy cốt bào. Thuốc, thức ăn, đồ uống hoặc thực phẩm theo sáng chế làm tăng cường độ bền chắc xương và hữu dụng trong phòng ngừa và điều trị các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương, bệnh thấp khớp và viêm khớp.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Nguyên liệu protein theo sáng chế khác biệt ở chỗ, nguyên liệu protein này chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng cụ thể và còn chứa thêm lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza theo tỷ lệ khối lượng cụ thể so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin.

Nguyên liệu protein theo sáng chế có thể là hỗn hợp thu được bằng cách trộn phần chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và phần chứa lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza theo tỷ lệ khối lượng cụ thể, nguyên liệu điều chế bằng cách chiết trực tiếp phần chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza theo tỷ lệ khối lượng cụ thể từ sữa hoặc nguyên liệu thu được từ sữa, như sữa gầy hoặc nước sữa hoặc sản phẩm tương tự. Nguyên liệu protein theo sáng chế có thể còn chứa nguyên liệu được điều chế bằng cách làm thủy phân angiogenin và/hoặc lactoperoxidaza bằng enzym.

Khi điều chế nguyên liệu protein theo sáng chế bằng cách trộn phần chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và phần chứa lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza, phần được

điều chế từ sữa của động vật có vú, như người, bò, trâu, dê hoặc cừu, phần được tạo ra bằng công nghệ gen, phần được tinh chế từ máu hoặc cơ quan nội tạng hoặc tương tự có thể được sử dụng làm phần chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và phần chứa lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza. Tác nhân phản ứng angiogenin hoặc lactoperoxidaza tinh khiết có sẵn trên thị trường cũng có thể được sử dụng. Trong trường hợp này, nguyên liệu protein theo sáng chế có thể được điều chế bằng cách điều chỉnh tỷ lệ khối lượng của lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza trên angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin.

Sản phẩm thu được bằng cách làm thủy phân bằng enzym phần chứa angiogenin nêu trên, tác nhân phản ứng angiogenin, phần chứa lactoperoxidaza, tác nhân phản ứng lactoperoxidaza hoặc tương tự sử dụng một hoặc nhiều proteaza có thể được sử dụng làm sản phẩm thủy phân của angiogenin hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza.

Khi điều chế nguyên liệu protein theo sáng chế bằng cách chiết trực tiếp phần chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza theo tỷ lệ khối lượng cụ thể từ sữa hoặc nguyên liệu thu được từ sữa, như sữa gầy hoặc nước sữa, ví dụ, sữa hoặc nguyên liệu thu được từ sữa có thể được cho tiếp xúc với nhựa trao đổi cation và sau đó các protein thu được từ sữa hấp phụ trên nhựa có thể được rửa giải ở nồng độ muối nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2,0M, được khử muối và được cô bằng cách sử dụng màng thẩm thấu ngược, màng thẩm tách bằng điện, màng siêu lọc, màng vi lọc hoặc màng tương tự, sau đó tùy ý được làm thủy phân giới hạn tới phân tử lượng bằng 8000 hoặc thấp hơn bằng cách sử dụng proteaza, như trypsin, pancreatin, chymotrypsin, pepsin, papain, kalikrein, cathepsin, thermolysin hoặc V8 proteaza. Trường hợp được làm thủy phân giới hạn bằng cách sử dụng proteaza, tốt hơn là giới hạn dưới của phân tử lượng bằng 500 hoặc cao hơn. Nguyên liệu protein thu được như vậy có thể được làm khô bằng phương pháp khô lạnh, sấy phun hoặc tương tự.

Trường hợp cho nguyên liệu protein theo sáng chế tiến hành phân tích

LC/MS/MS, sau khi làm cải biến và thủy phân giới hạn trong điều kiện khử bằng cách sử dụng enzym tiêu hóa theo cách thông thường để thực hiện phân tích hệ protein của nguyên liệu protein này, đã xác nhận rằng, nguyên liệu protein chứa ít nhất một protein như  $\alpha$ s1-casein,  $\alpha$ s2-casein,  $\beta$ -casein hoặc  $\kappa$ -casein và sản phẩm thủy phân protein của nó khác với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza.

Nguyên liệu protein theo sáng chế chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 15mg/100mg và bao gồm lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza theo tỷ lệ khối lượng nằm trong khoảng từ 0,3 đến 20 đối với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin.

Như được chứng minh trong các ví dụ thử nghiệm mô tả dưới đây, khi tỷ lệ khối lượng của lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza trên angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong khoảng từ 0,3 đến 20, tác dụng tăng cường độ bền chắc xương có thể đạt được một cách hiệu quả hơn so với trường hợp sử dụng angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin hoặc lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza một cách riêng biệt.

Chỉ để tham khảo, cần lưu ý rằng, hàm lượng của angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong sữa bò là vào khoảng 0,001% và tỷ lệ khối lượng của lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza trên angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong sữa bò là vào khoảng 20. Hàm lượng của angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong protein nước sữa cô đặc (WPC) là vào khoảng 0,1% và tỷ lệ khối lượng của lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza trên angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin trong protein nước sữa cô đặc là vào khoảng 30.

Nguyên liệu protein theo sáng chế có thể được điều chế làm tác nhân tăng cường độ bền chắc xương bằng cách bổ sung một cách thích hợp nguyên liệu



protein làm hoạt chất. Nguyên liệu protein theo sáng chế có thể được sử dụng trực tiếp làm tác nhân tăng cường độ bền chắc xương. Khi phối chế làm tác nhân tăng cường độ bền chắc xương, có thể trộn nguyên liệu thô hoặc nguyên liệu tương tự mà thông thường được sử dụng đối với thuốc, thức ăn, đồ uống và thực phẩm, như sacarit, lipid, protein, vitamin, khoáng chất hoặc hương liệu và cũng có thể được phối chế thành thuốc bột, dạng hạt, viên nén, viên nang, chế phẩm uống hoặc tương tự theo cách thông thường. Nguyên liệu protein theo sáng chế có thể được sử dụng cùng với thành phần khác mà cũng thể hiện tác dụng tăng cường độ bền chắc xương, như canxi, vitamin D, vitamin K hoặc isoflavan.

Nguyên liệu protein theo sáng chế có thể tăng cường độ bền chắc xương khi được dùng theo đường miệng với lượng bằng 5mg hoặc cao hơn trên mỗi kg thể trọng, như được thể hiện trong các thử nghiệm trên động vật mô tả dưới đây. Vì lượng sử dụng cho ở động vật thử nghiệm này tương ứng với lượng sử dụng cho người ở người trưởng thành về nồng độ thuốc trong máu (xem ấn phẩm Mitsuyoshi Nakajima (1993), “*Yakkou Hyoka* Vol. 8”, Hirokawa-Shoten Ltd., pp. 2-18), hy vọng rằng, có thể đạt được tác dụng tăng cường độ bền chắc xương và đặc biệt là các bệnh về xương như bệnh loãng xương, gãy xương, bệnh thấp khớp và viêm khớp có thể được phòng ngừa hoặc điều trị bằng cách sử dụng nguyên liệu protein theo sáng chế với lượng 5mg/ngày hoặc cao hơn trên mỗi người trưởng thành. Do đó, khi trộn với tác nhân tăng cường độ bền chắc xương hoặc tác nhân tương tự, nguyên liệu protein có thể được bổ sung vào đó để tiêu thụ lượng cần thiết nêu trên.

Nguyên liệu protein theo sáng chế có thể được bổ sung vào thức ăn hoặc đồ uống thông thường, như sữa chua, đồ uống, bánh xốp hoặc món ăn tráng miệng). Trong trường hợp này, nguyên liệu protein theo sáng chế tốt hơn được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 0,25 đến 1000mg trên 100g thức ăn hoặc đồ uống tùy thuộc vào dạng thức ăn hoặc đồ uống. Hy vọng rằng, tác dụng tăng cường độ bền chắc xương có thể đạt được bằng cách duy trì lượng trộn nêu trên. Nguyên liệu protein theo sáng chế cũng có thể được bổ sung vào thức ăn, như thức ăn cho gia súc hoặc thức ăn cho vật cảnh để điều chế thức ăn tăng cường độ bền chắc xương. Trong trường hợp này, tốt hơn là bổ sung nguyên liệu

protein theo sáng chế với lượng nằm trong khoảng từ 0,25 đến 1000mg trên 100g thức ăn.

Khi nguyên liệu protein theo sáng chế được điều chế và sử dụng là dược chất, thực phẩm, đồ uống hoặc thức ăn, nguyên liệu protein theo sáng chế có thể được sử dụng bằng cách tạo huyền phù hoặc hòa tan trong nước khử ion và trộn bằng cách khuấy. Các điều kiện khuấy/trộn là không bị giới hạn đặc biệt miễn là nguyên liệu protein được trộn một cách đồng đều. Cũng có thể trộn bằng cách khuấy bằng cách sử dụng thiết bị siêu phân tán, thiết bị trộn đồng hóa TK hoặc thiết bị tương tự.

Dung dịch chứa nguyên liệu protein tùy ý có thể được khử muối hoặc được cô bằng cách sử dụng màng thẩm thấu ngược hoặc màng tương tự hoặc được làm khô lạnh sao cho dung dịch này có thể được sử dụng một cách dễ dàng cho thuốc, đồ ăn, đồ uống hoặc thức ăn.

Đặc biệt, đã xác nhận rằng, nguyên liệu protein theo sáng chế duy trì hoạt tính tăng cường độ bền chắc xương ngay cả khi nguyên liệu protein được cho tiến hành xử lý vô khuẩn thông thường được sử dụng trong sản xuất thuốc, đồ ăn, đồ uống hoặc thức ăn. Nguyên liệu protein có thể được vô khuẩn bằng cách làm khô bằng nhiệt khi nguyên liệu protein này được sử dụng ở dạng bột. Nguyên liệu protein theo sáng chế có thể được sử dụng trong thuốc, đồ ăn, đồ uống hoặc thức ăn dưới các dạng khác nhau, như dạng lỏng, dạng gel, dạng bột hoặc dạng hạt.

Sáng chế được mô tả thêm dưới đây một cách chi tiết hơn thông qua các ví dụ tham khảo, ví dụ và ví dụ thử nghiệm. Lưu ý rằng, các ví dụ sau đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không được xem là làm giới hạn sáng chế.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

#### **Ví dụ tham khảo 1**

##### **Điều chế (1) phần angiogenin**

Cột đã nạp 30kg nhựa trao đổi cation (Chitopearl sulfonat hóa; do Fuji Spinning Co., Ltd. sản xuất) được rửa kỹ bằng nước khử ion và sau đó, 1000 lít

sữa gầy chưa tiệt trùng ( $\text{pH} = 6,7$ ) được đưa lên cột. Sau khi rửa sạch cột hoàn toàn bằng nước khử ion, protein hấp thụ được rửa giải bằng gradien tuyến tính của natri clorua từ 0,1 đến 2,0M. Phần rửa giải chứa angiogenin được cất phân đoạn bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký trao đổi cation S-Sepharosa (do công ty Amersham Bioscientific sản xuất) và phần chứa angiogenin thu được được xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ  $90^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 10 phút và được ly tâm để loại bỏ chất kết tủa. Phần chứa angiogenin được cho tiến hành thêm sắc ký lọc gel (cột: Superosa 12). Dịch rửa giải thu được được khử muối bằng cách sử dụng màng thẩm thấu ngược và dịch rửa giải đã khử muối được làm khô lạnh để thu được 16,5g phần angiogenin có độ tinh khiết angiogenin bằng 90%. Các thao tác liên tục này được lặp lại 30 lần.

Ví dụ tham khảo 2

Điều chế (2) phần angiogenin

Cột đã nạp 10kg Heparin Sepharosa (do GE Healthcare sản xuất) được rửa kỹ bằng nước khử ion và sau đó, 1000 lít sữa gầy chưa tiệt trùng ( $\text{pH} = 6,7$ ) được đưa lên cột. Sau khi rửa kỹ cột bằng dung dịch natri clorua 0,6M, protein hấp thụ được rửa giải bằng dung dịch natri clorua 1,5M. Dịch rửa giải được khử muối bằng cách sử dụng màng thẩm thấu ngược và dịch rửa giải đã khử muối được làm khô lạnh để thu được 32g phần angiogenin có độ tinh khiết angiogenin bằng 2%. Các thao tác liên tục nêu trên được lặp lại 50 lần.

Ví dụ tham khảo 3

Điều chế phần lactoperoxidaza

Cột (đường kính: 5cm, chiều cao: 30cm) đã nạp 600g nhựa trao đổi cation (Chitopearl sulfonat hóa; do Fuji Spinning Co., Ltd. sản xuất) được rửa kỹ bằng nước khử ion và 360 lít sữa gầy chưa tiệt trùng ( $\text{pH} = 6,7$ ) được đưa lên cột với tốc độ dòng bằng 25ml/phút. Sau khi rửa sạch cột hoàn toàn bằng nước khử ion, protein hấp thụ được rửa giải bằng dung dịch đệm cacbonat 0,02M ( $\text{pH} = 7,0$ ) chứa 2,0M natri clorua. Phần rửa giải chứa lactoperoxidaza được hấp phụ lên cột S-Sepharosa FF (do công ty Amersham Bioscientific sản xuất) và cột được rửa kỹ bằng nước khử ion. Sau khi làm cân bằng bằng dung dịch đệm phosphat

10mM (pH = 7,0), phần hấp phụ được rửa giải bằng gradien tuyến tính của natri clorua từ 0 đến 2,0M để thu gom phần chứa lactoperoxidaza. Phần này được tiến hành phương pháp sắc ký lọc gel bằng cách sử dụng HiLoad 16/60 Superdex 75pg (do công ty Amersham Bioscientific sản xuất). Dịch rửa giải thu được được khử muối bằng cách sử dụng màng thẩm thấu ngược và được làm khô lạnh để thu được 27g phần lactoperoxidaza có độ tinh khiết lactoperoxidaza bằng 90%. Các thao tác liên tục này được lặp lại 25 lần.

#### Ví dụ 1

Trộn 0,59mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 1, 98,58mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 2 và 0,83mg phần lactoperoxidaza thu được trong ví dụ tham khảo 3 để điều chế nguyên liệu protein (sản phẩm của ví dụ 1), trong đó hàm lượng của angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin là 2,5mg/100mg và tỷ lệ khối lượng của lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza trên angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin là 0,3.

#### Ví dụ 2

Trộn 0,73mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 1, 92,33mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 2 và 6,94mg phần lactoperoxidaza thu được trong ví dụ tham khảo 3 để điều chế nguyên liệu protein (sản phẩm của ví dụ 2), trong đó hàm lượng của angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin là 2,5mg/100mg và tỷ lệ khối lượng của lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza trên angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin là 2,5.

#### Ví dụ 3

Trộn 1,83mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 1, 42,61mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 2 và 55,56mg phần lactoperoxidaza thu được trong ví dụ tham khảo 3 để điều chế nguyên liệu protein (sản phẩm của ví dụ 3), trong đó hàm lượng của angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin là 2,5mg/100mg và tỷ lệ khối lượng của lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza trên

angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin là 20.

#### Ví dụ so sánh 1

Trộn 0,57mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 1, 99,15mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 2 và 0,28mg phần lactoperoxidaza thu được trong ví dụ tham khảo 3 để điều chế nguyên liệu protein (sản phẩm của ví dụ so sánh 1), trong đó hàm lượng của angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin là 2,5mg/100mg và tỷ lệ khối lượng của lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza trên angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin là 0,1.

#### Ví dụ so sánh 2

Trộn 2,08mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 1, 31,25mg phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 2 và 66,67mg phần lactoperoxidaza thu được trong ví dụ tham khảo 3 để điều chế nguyên liệu protein (sản phẩm của ví dụ so sánh 2), trong đó hàm lượng của angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin là 2,5mg/100mg và tỷ lệ khối lượng của lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza trên angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin là 24.

#### Ví dụ thử nghiệm 1

Hiệu quả tăng sinh tạo cốt bào, hiệu quả ức chế đối với quá trình tiêu xương do hủy cốt bào và hiệu quả ức chế đối với quá trình biệt hóa hủy cốt bào của các sản phẩm của ví dụ từ 1 đến 3 và sản phẩm của ví dụ so sánh 1 và 2 được xác định.

Hiệu quả tăng sinh tạo cốt bào được xác định như mô tả dưới đây. Dòng tế bào tạo cốt bào (MC3T3-E1) được cấy lên đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ với mật độ  $2 \times 10^3$  tế bào/lỗ và được nuôi cấy trong thời gian 24 giờ bằng cách sử dụng môi trường  $\alpha$ -MEM (do GIBCO sản xuất) được bổ sung 10% huyết thanh thai bò (FBS). Sau khi môi trường được loại bỏ hoàn toàn, 90 $\mu$ l môi trường  $\alpha$ -MEM không chứa FBS và 10 $\mu$ l dung dịch chứa sản phẩm bất kỳ trong số các sản phẩm của ví dụ từ 1 đến 3 và sản phẩm của ví dụ so sánh 1 và 2 được bổ sung vào mỗi

lỗ. Tế bào được nuôi cấy thêm trong thời gian 24 giờ nữa. Sau khi bổ sung bromodeoxyuridin (BrdU) mà hợp chất này được chứa trong kit tăng sinh tế bào (do GE Healthcare sản xuất), tế bào được nuôi cấy trong thời gian 2 giờ và được phản ứng với kháng thể kháng BrdU đánh dấu bằng peroxidaza. Sau khi bổ sung 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (chất nền), hoạt tính tăng sinh tạo cốt bào được xác định bằng cách xác định lượng BrdU đã đưa vào tế bào thông qua việc xác định hệ số hấp thụ tại bước sóng 450nm. Hoạt tính tăng sinh tạo cốt bào được xác định là dương tính khi hệ số hấp thụ tại bước sóng 450nm cao hơn đáng kể so với hệ số hấp thụ của nhóm (đối chứng), trong đó không có sản phẩm nào trong ví dụ từ 1 đến 3 và sản phẩm nào trong ví dụ so sánh 1 và 2 được bổ sung vào môi trường.

Hiệu quả ức chế đối với quá trình tiêu xương do hủy cốt bào được xác định như mô tả dưới đây. Xương ống và xương đùi được lấy ra khỏi cơ thể thỏ (5 ngày tuổi). Sau khi loại bỏ mô mềm, các xương này được chặt theo cách cơ học và toàn bộ tế bào tủy xương chứa hủy cốt bào được phân tán vào môi trường  $\alpha$ -MEM có bổ sung 5% FBS và sau đó được cấy lên các lỗ của đĩa canxi phosphat tinh thể (do Corning sản xuất) với mật độ  $1 \times 10^6$  tế bào/lỗ. Môi trường được loại bỏ hoàn toàn tại thời điểm 2 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy và 180 $\mu$ l môi trường  $\alpha$ -MEM có bổ sung 5% FBS và 20 $\mu$ l dung dịch chứa sản phẩm bất kỳ trong số các sản phẩm của ví dụ từ 1 đến 3 và sản phẩm của ví dụ so sánh 1 và 2 được bổ sung vào mỗi một lỗ. Tế bào được nuôi cấy trong thời gian 72 giờ. Sau khi lấy hết các tế bào bằng cách bổ sung dung dịch natri hypoclorit 5%, các hốc tiêu xương thu được trên các lỗ của đĩa canxi phosphat được chụp ảnh bằng cách sử dụng kính hiển vi lập thể và diện tích của hốc được xác định bằng việc phân tích hình ảnh để xác định hiệu quả ức chế đối với quá trình tiêu xương do hủy cốt bào (Takeshi Seno et al., "Manual of selected cultured cell lines for bioscience biotechnology", pp. 199-200, 1993). Hoạt tính ức chế chống lại quá trình tiêu xương do hủy cốt bào được xác định là dương tính khi diện tích hốc nhỏ hơn đáng kể so với diện tích hốc của nhóm (đối chứng), trong đó sản phẩm bất kỳ trong số các sản phẩm của ví dụ từ 1 đến 3 và sản phẩm của ví dụ so sánh 1 và 2 không được bổ sung vào môi trường.

Hiệu quả ức chế đối với quá trình biệt hóa hủy cốt bào được xác định như mô tả dưới đây. Tế bào tủy xương thu gom từ xương đùi của chuột ddv (7 hoặc 8 tuần tuổi, giới tính đực) được cấy lên đĩa 90 lỗ với mật độ  $4 \times 10^4$  tế bào/lỗ và được nuôi cấy trong 200 $\mu$ l môi trường  $\alpha$ -MEM có bổ sung 10% FBS và M-CSF (25ng/ml) ở nhiệt độ 37°C và 5% CO<sub>2</sub>. Sau khi môi trường được loại bỏ hoàn toàn vào thời điểm 2 ngày sau khi khởi đầu nuôi cấy, 180 $\mu$ l môi trường  $\alpha$ -MEM được bổ sung 10% FBS, RANKL (5ng/ml) và M-CSF (25ng/ml) và 20 $\mu$ l dung dịch chứa sản phẩm bất kỳ trong số các sản phẩm của ví dụ từ 1 đến 3 và sản phẩm của ví dụ so sánh 1 và 2 được bổ sung vào mỗi một lỗ và tế bào được nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ 37°C và 5% CO<sub>2</sub> trong thời gian 2 ngày. Sau khi thay đổi môi trường, tế bào được nuôi cấy thêm 1 ngày nữa. Khi hoàn thành việc nuôi cấy, dung dịch nuôi cấy được lấy ra, được rửa bằng PBS và được xử lý bằng dung dịch axeton-etanol (1:1) trong thời gian 1 phút để cố định tế bào. Sau đó, 1,5mg/ml đinatri p-nitrophenylphosphat - 20mM natri tartrat - 50mM dung dịch đệm xitrat (pH = 4,5) được bổ sung (100 $\mu$ l/lỗ) và được phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút và sau đó, dung dịch natri hydroxit 1M (50 $\mu$ l/lỗ) được bổ sung để kết thúc phản ứng. Hệ số hấp thụ tại bước sóng 405nm được xác định và được dùng làm chỉ số biệt hóa/biến đổi hủy cốt bào. Hoạt tính ức chế chống lại quá trình biệt hóa hủy cốt bào được xác định là dương tính khi hệ số hấp thụ tại bước sóng 405nm của nhóm bổ sung sản phẩm của ví dụ từ 1 đến 3 hoặc sản phẩm của ví dụ so sánh 1 hoặc 2 thấp hơn đáng kể so với của nhóm (đối chứng), trong đó sản phẩm bất kỳ trong số các sản phẩm của ví dụ từ 1 đến 3 và sản phẩm của ví dụ so sánh 1 và 2 không được bổ sung vào môi trường.

Kết quả được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1

|                    | Hoạt tính tăng sinh<br>tạo cốt bào | Hoạt tính ức chế<br>quá trình tiêu xương do<br>hủy cốt bào | Hoạt tính ức chế<br>quá trình biệt hóa<br>hủy cốt bào |
|--------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Ví dụ 1            | dương tính                         | dương tính                                                 | dương tính                                            |
| Ví dụ 2            | dương tính                         | dương tính                                                 | dương tính                                            |
| Ví dụ 3            | dương tính                         | dương tính                                                 | dương tính                                            |
| Ví dụ so<br>sánh 1 | dương tính                         | dương tính                                                 | âm tính                                               |
| Ví dụ so<br>sánh 2 | dương tính                         | âm tính                                                    | dương tính                                            |

Như được thể hiện trong bảng 1, sản phẩm của ví dụ từ 1 đến 3 tương ứng với nguyên liệu protein theo sáng chế thể hiện hoạt tính dương tính trong mọi thử nghiệm tế bào. Sản phẩm của ví dụ so sánh 1 và 2 cũng thể hiện hoạt tính dương tính trong một số thử nghiệm tế bào, nhưng có một thử nghiệm tế bào thể hiện hoạt tính âm tính.

#### Ví dụ 4

Cột (đường kính: 5cm, chiều cao: 30cm) đã nạp 600g nhựa trao đổi cation (Chitopearl sulfonat hóa; do Fuji Spinning Co., Ltd. sản xuất) được rửa kỹ bằng nước khử ion và 40 lít sữa gầy chưa tiệt trùng (pH = 6,7) được đưa lên cột với tốc độ dòng bằng 25ml/phút. Sau khi rửa sạch cột hoàn toàn bằng nước khử ion, protein hấp phụ trên nhựa được rửa giải bằng cách sử dụng dung dịch đệm cacbonat 0,02M (pH = 7,0) chứa natri clorua 0,78M. Dịch rửa giải được khử muối bằng cách sử dụng màng thẩm thấu ngược và dịch rửa giải đã khử muối được làm khô lạnh để thu được 18g nguyên liệu protein dạng bột (sản phẩm của ví dụ 4). Nguyên liệu protein chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 2mg/100mg và tỷ lệ khối lượng của lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza trên angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin là 18. Nguyên liệu protein có thể được sử dụng trực tiếp làm tác nhân tăng cường độ bền chắc xương hoặc làm thành phần hoạt tính của tác nhân tăng cường độ bền chắc xương. Đối với kết quả của phân tích hệ protein, có thể thấy rằng, nguyên liệu protein chứa sản phẩm thủy phân của  $\beta$ -casein và sản phẩm thủy phân của  $\kappa$ -casein.



## Ví dụ 5

Cột (đường kính: 20cm, chiều cao: 100cm) đã nạp 30kg nhựa trao đổi cation (SP Toyopearl; được sản xuất bởi Tosoh Corporation) được rửa kỹ bằng nước khử ion và 3 t nước sữa (pH = 6,2) được vô trùng bằng nhiệt ở nhiệt độ 75°C trong thời gian 15 phút được đưa lên cột với tốc độ dòng bằng 10l/phút. Sau khi rửa sạch cột hoàn toàn bằng nước khử ion, protein hấp phụ trên nhựa được rửa giải bằng cách sử dụng dung dịch đệm xitrat 0,1M (pH = 5,7) chứa natri clorua 0,68M. Dịch rửa giải được khử muối bằng cách sử dụng màng thẩm tách bằng điện và dịch rửa giải đã khử muối được làm khô lạnh. Các thao tác liên tục nêu trên được lặp lại 20 lần để thu được 3,3kg nguyên liệu protein dạng bột (sản phẩm của ví dụ 5). Nguyên liệu protein chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 15mg/100mg và tỷ lệ khối lượng của lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza trên angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin là 0,8. Nguyên liệu protein có thể được sử dụng trực tiếp làm tác nhân tăng cường độ bền chắc xương hoặc làm thành phần hoạt tính của tác nhân tăng cường độ bền chắc xương. Đối với kết quả của phân tích hệ protein, có thể thấy rằng, nguyên liệu protein chứa các sản phẩm thủy phân của  $\alpha$ s1-casein và  $\kappa$ -casein.

## Ví dụ 6

Hòa tan 4g nguyên liệu protein của sản phẩm của ví dụ 4 trong 800ml nước. Sau khi bổ sung pancreatin (do Sigma sản xuất), đây là proteaza, ở nồng độ cuối cùng bằng 0,02% khối lượng và sau đó hỗn hợp được cho tiến hành xử lý enzym ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 8 giờ. Sau khi bất hoạt proteaza bằng phương thức xử lý nhiệt ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 5 phút, hỗn hợp được làm khô lạnh để thu được 3,2g nguyên liệu protein (sản phẩm của ví dụ 6). Nguyên liệu protein thu được theo cách như vậy chứa sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 2,0mg/100mg và tỷ lệ khối lượng của sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza trên sản phẩm thủy phân của angiogenin là 16 và phân tử lượng của nguyên liệu protein bằng hoặc thấp hơn 8000. Do đó, nguyên liệu protein có thể được sử dụng trực tiếp làm tác nhân tăng cường độ bền chắc

xương hoặc làm thành phần hoạt tính của tác nhân tăng cường độ bền chắc xương. Đối với kết quả của phân tích hệ protein, có thể thấy rằng, nguyên liệu protein chứa các sản phẩm thủy phân của  $\beta$ -casein và  $\kappa$ -casein.

#### Ví dụ 7

Hòa tan 4g nguyên liệu protein của sản phẩm của ví dụ 5 trong 800ml nước. Sau khi bổ sung trypsin (được sản xuất bởi Sigma) là proteaza để thu được nồng độ cuối cùng bằng 0,03% khối lượng, hỗn hợp được cho tiến hành xử lý enzym ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 8 giờ. Sau khi bất hoạt proteaza bằng phương thức xử lý nhiệt ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 5 phút, hỗn hợp được làm khô lạnh để thu được 3,0g nguyên liệu protein (sản phẩm của ví dụ 7). Nguyên liệu protein thu được theo cách như vậy chứa sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 14mg/100mg và tỷ lệ khối lượng của sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza trên sản phẩm thủy phân của angiogenin trong nguyên liệu protein là 0,7 và phân tử lượng của nguyên liệu protein bằng hoặc thấp hơn 8000. Do đó, nguyên liệu protein có thể được sử dụng trực tiếp làm tác nhân tăng cường độ bền chắc xương hoặc làm thành phần hoạt tính của tác nhân tăng cường độ bền chắc xương. Đối với kết quả của phân tích hệ protein, có thể thấy rằng, nguyên liệu protein chứa các sản phẩm thủy phân của  $\alpha$ s1-casein và  $\kappa$ -casein.

#### Ví dụ so sánh 3

Trộn 10mg phần lactoperoxidaza thu được trong ví dụ tham khảo 3 và 100mg nguyên liệu protein của sản phẩm của ví dụ 4 để điều chế nguyên liệu protein (sản phẩm của ví dụ so sánh 3), trong đó hàm lượng của angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin là 1,8mg/100mg và tỷ lệ khối lượng của lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza trên angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin là 22,5.

#### Ví dụ so sánh 4

Trộn 1g phần angiogenin thu được trong ví dụ tham khảo 1 và 2g nguyên liệu protein của sản phẩm của ví dụ 5 và hòa tan hỗn hợp trong 800ml nước. Sau khi bổ sung trypsin (do Sigma sản xuất) là proteaza ở nồng độ cuối cùng bằng

0,02% khối lượng, hỗn hợp được cho tiến hành xử lý enzym ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 12 giờ. Sau khi bất hoạt proteaza bằng phương thức xử lý nhiệt ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 5 phút, hỗn hợp được làm khô lạnh để thu được 2,8g nguyên liệu protein (sản phẩm của ví dụ so sánh 4). Nguyên liệu protein thu được theo cách như vậy chứa sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 39mg/100mg và tỷ lệ khối lượng của sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza trên sản phẩm thủy phân của angiogenin là 0,2.

#### Ví dụ so sánh 5

Cột (đường kính: 5cm, chiều cao: 5cm) đã nạp 100g nhựa trao đổi cation (CM Sepharosa FF; được sản xuất bởi GE Healthcare) được rửa kỹ bằng nước khử ion và 40 lít sữa gầy chưa tiệt trùng (pH = 6,7) được đưa lên cột với tốc độ dòng bằng 40ml/phút. Sau khi rửa sạch cột hoàn toàn bằng nước khử ion, protein hấp phụ trên nhựa được rửa giải bằng cách sử dụng dung dịch đệm cacbonat 0,02M (pH = 6,8) chứa natri clorua 0,98M. Dịch rửa giải được khử muối bằng cách sử dụng màng thẩm thấu ngược và dịch rửa giải đã khử muối được làm khô để thu được 20g nguyên liệu protein dạng bột (sản phẩm của ví dụ so sánh 5). Nguyên liệu protein chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng 1,5mg/100mg và tỷ lệ khối lượng của lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza trên angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin là 30.

#### Ví dụ thử nghiệm 2

Tác dụng tăng cường độ bền chắc xương của mỗi trong số các sản phẩm của ví dụ 4 và 5 và sản phẩm của ví dụ so sánh 3 và 5 được xác định bằng các thử nghiệm trên động vật. Chuột C3H/HeJ (5 tuần tuổi, giới tính đực) được sử dụng cho các thử nghiệm trên động vật. Sau khi làm cho thích nghi trong 1 tuần, chuột được phân thành 5 nhóm (6 chuột/nhóm). Chuột được cho dùng sản phẩm của ví dụ 4 hoặc 5 hoặc sản phẩm của ví dụ so sánh 3 hoặc 5 theo đường miệng với lượng 5mg trên 1kg thể trọng mỗi ngày một lần trong thời gian 4 tuần bằng cách sử dụng ống thông. Nhóm đối chứng không được sử dụng bất kỳ sản phẩm nào trong ví dụ 4 và 5 và sản phẩm của ví dụ so sánh 3 và 5 không được sử

dụng. Sau khi hoàn tất việc sử dụng (tuần thứ tư), mật độ xương của xương ống bên phải của mỗi một chuột được đo bằng cách sử dụng thiết bị chụp vi cắt lớp (do Rigaku Corporation sản xuất). Kết quả được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2

|                              | Mật độ xương (mg/cm <sup>3</sup> ) |
|------------------------------|------------------------------------|
| Nhóm đối chứng               | 1300 ± 10                          |
| Sản phẩm của ví dụ 4         | 1327 ± 11                          |
| Sản phẩm của ví dụ 5         | 1332 ± 12                          |
| Sản phẩm của ví dụ so sánh 3 | 1301 ± 10                          |
| Sản phẩm của ví dụ so sánh 5 | 1304 ± 9                           |

Như được thể hiện trong bảng 2, các nhóm được dùng sản phẩm của ví dụ 4 hoặc 5 theo đường miệng mà sản phẩm này là nguyên liệu protein theo sáng chế thể hiện sự gia tăng đáng kể về mật độ xương khi so sánh với nhóm đối chứng và các nhóm được dùng sản phẩm của ví dụ so sánh 3 hoặc 5 theo đường miệng.

### Ví dụ thử nghiệm 3

Tác dụng tăng cường độ bền chắc xương của mỗi trong số các sản phẩm của ví dụ 6 và 7 và sản phẩm của ví dụ so sánh 4 và 5 được xác định bằng các thử nghiệm trên động vật. Sử dụng 48 con chuột SD (51 tuần tuổi, giới tính cái) cho các thử nghiệm trên động vật.

Chuột được phân thành 6 nhóm (8 chuột/nhóm). Tiến hành thủ thuật cắt bỏ buồng trứng ở 5 nhóm và một nhóm còn lại được cho tiến hành phẫu thuật giả. Sau giai đoạn 4 tuần phục hồi, chuột trải qua thủ thuật cắt bỏ buồng trứng được dùng sản phẩm của ví dụ 6 hoặc 7 hoặc sản phẩm của ví dụ so sánh 4 hoặc 5) theo đường miệng với lượng 5mg trên 1kg thể trọng chuột mỗi ngày một lần trong thời gian 16 tuần bằng cách sử dụng ống thông. Nhóm đối chứng không được sử dụng bất kỳ sản phẩm nào trong ví dụ 6 và 7 và sản phẩm của ví dụ so sánh 4 và 5. Sau giai đoạn 4 tuần phục hồi, chuột trải qua phẫu thuật giả được nuôi trong thời gian 16 tuần theo cách tương tự như nhóm đối chứng. Sau khi hoàn thành việc sử dụng (tuần thứ 16), mật độ xương của xương ống bên phải của mỗi một chuột được đo bằng cách sử dụng thiết bị chụp vi cắt lớp (do

Rigaku Corporation sản xuất). Kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3

|                              | Mật độ xương (mg/cm <sup>3</sup> ) |
|------------------------------|------------------------------------|
| Nhóm đối chứng               | 551 ± 10                           |
| Nhóm phẫu thuật giả          | 602 ± 9                            |
| Sản phẩm của ví dụ 6         | 598 ± 11                           |
| Sản phẩm của ví dụ 7         | 594 ± 12                           |
| Sản phẩm của ví dụ so sánh 4 | 557 ± 13                           |
| Sản phẩm của ví dụ so sánh 5 | 555 ± 11                           |

Như được thể hiện trong bảng 3, các nhóm được dùng sản phẩm của ví dụ 6 hoặc 7 theo đường miệng mà sản phẩm này là nguyên liệu protein theo sáng chế thể hiện sự gia tăng đáng kể về mật độ xương khi so sánh với nhóm đối chứng và các nhóm được dùng sản phẩm của ví dụ so sánh 4 hoặc 5 theo đường miệng. Ngoài ra, mật độ xương tiệm cận sát mật độ xương của nhóm phẫu thuật giả.

#### Ví dụ 8

Điều chế chế phẩm lỏng bổ sung dinh dưỡng tăng cường độ bền chắc xương

Hòa tan 5g nguyên liệu protein của sản phẩm của ví dụ 4 trong 4995g nước khử ion. Dung dịch này được khuấy với tốc độ 6000 vòng/phút trong thời gian 30 phút sử dụng thiết bị trộn đồng hóa TK (TK ROBO MICS; do Tokushu Kika Kogyo co., Ltd. sản xuất) để thu được dung dịch chứa sản phẩm của ví dụ 4 với lượng 100mg/100g. Sau đó, 4,0kg casein, 5,0kg protein đậu nành, 1,0kg dầu cá, 3,0kg dầu tía tô, 18,0kg dextrin, 6,0kg hỗn hợp khoáng chất, 1,95kg hỗn hợp vitamin, 2,0kg chất nhũ tương, 4,0kg chất ổn định và 0,05kg tinh chất được bổ sung vào 5,0kg dung dịch. Hỗn hợp được nạp vào túi cổ cong (200ml) và được vô trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút bằng cách sử dụng nồi hấp vô trùng (bình áp lực loại 1, RCS-4CRTGN; do Hisaka Works, Ltd. sản xuất) để thu được ra 50kg chế phẩm dinh dưỡng dạng lỏng tăng cường độ bền chắc xương. Quan sát sự kết tủa bất kỳ và không còn cảm thấy hương vị bất thường nào trong chế phẩm dinh dưỡng dạng lỏng tăng cường độ bền chắc xương thu được theo cách như vậy.

## Ví dụ 9

Điều chế thức ăn dạng gel tăng cường độ bền chắc xương

Hòa tan 2g nguyên liệu protein của sản phẩm của ví dụ 5 trong 708g nước khử ion. Dung dịch này được khuấy và được trộn bằng cách sử dụng thiết bị siêu phân tán (ULTRA-TURRAX T-25; được sản xuất bởi IKA Japan) với tốc độ 9500 vòng/phút trong thời gian 30 phút. Bổ sung 40g sorbitol, 2g chất tạo chua, 2g tinh chất, 5g pectin, 5g protein nước sữa cô đặc, 1g canxi lactat và 235g nước khử ion vào dung dịch. Sau khi khuấy và trộn, hỗn hợp được nạp vào túi đựng đặc biệt dung tích 200ml và được vô trùng ở nhiệt độ 85°C trong thời gian 20 phút và túi được gắn kín để có được 5 túi (200g) thức ăn dạng gel tăng cường độ bền chắc xương. Quan sát sự kết tủa bất kỳ và không còn cảm thấy hương vị bất thường nào trong thức ăn dạng gel tăng cường độ bền chắc xương thu được theo cách như vậy.

## Ví dụ 10

Điều chế đồ uống tăng cường độ bền chắc xương

Hòa tan 2g chất axit hóa trong 706g nước khử ion và hòa tan 4g nguyên liệu protein của sản phẩm của ví dụ 6 trong dung dịch. Dung dịch này được khuấy và được trộn bằng cách sử dụng thiết bị siêu phân tán (ULTRA-TURRAX T-25; do IKA Japan sản xuất) với tốc độ 9500 vòng/phút trong thời gian 30 phút. Sau khi bổ sung 100g maltitol, 20g xi-rô tinh bột đã khử, 2g tinh chất và 166g nước khử ion, hỗn hợp được nạp vào lọ thủy tinh dung tích 100ml. Sau khi được vô trùng ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 15 giây, lọ này được gắn kín để có được 10 chai (100ml) Đồ uống tăng cường độ bền chắc xương. Quan sát sự kết tủa bất kỳ và không còn cảm thấy hương vị bất thường nào trong đồ uống tăng cường độ bền chắc xương thu được theo cách như vậy.

## Ví dụ 11

Điều chế thức ăn tăng cường độ bền chắc xương

Hòa tan 2kg nguyên liệu protein của sản phẩm của ví dụ 7 trong 95kg nước khử ion. Dung dịch được khuấy và được trộn bằng cách sử dụng thiết bị

trộn đồng hóa TK (MARK II 160; được sản xuất bởi PRIMIX Corporation) với tốc độ 3600 vòng/phút trong thời gian 40 phút để thu được dung dịch chứa sản phẩm của ví dụ 7 với lượng 2g/100g. Sau đó, 12kg bã đậu nành, 14kg bột sữa gầy, 4kg dầu đậu nành, 2kg dầu ngô, 23,2kg dầu cọ, 14kg tinh bột ngô, 9kg bột mì, 2kg cám, 5kg hỗn hợp vitamin, 2,8kg xenluloza và 2kg hỗn hợp khoáng chất được bổ sung vào 10kg dung dịch. Hỗn hợp được vô trùng ở nhiệt độ 120°C trong thời gian 4 phút để thu được 100kg thức ăn cho chó tăng cường độ bền chắc xương.

Ví dụ 12

Điều chế tác nhân tăng cường độ bền chắc xương (viên nén)

Các nguyên liệu thô được trộn theo tỷ lệ được thể hiện trong bảng 4. Sau đó, 1g hỗn hợp được tạo ra và tạo viên nén theo cách thông thường để điều chế tác nhân tăng cường độ bền chắc xương.

Bảng 4

|                                            |                       |
|--------------------------------------------|-----------------------|
| Glucosa kết tinh ngâm nước                 | 92,5% (% trọng lượng) |
| Nguyên liệu protein (sản phẩm của ví dụ 1) | 1,0%                  |
| Hỗn hợp khoáng chất                        | 5,0%                  |
| Este đường                                 | 1,0%                  |
| Tinh chất                                  | 0,5%                  |

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Nguyên liệu protein chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 15mg/100mg và lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza theo tỷ lệ khối lượng so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong khoảng từ 0,3 đến 20, trong đó ít nhất một trong số angiogenin và lactoperoxidaza là ở dạng sản phẩm thủy phân.
2. Thức ăn chứa nguyên liệu protein theo điểm 1.
3. Đồ uống chứa nguyên liệu protein theo điểm 1.
4. Thực phẩm chứa nguyên liệu protein theo điểm 1.
5. Tác nhân tăng cường độ bền chắc xương chứa nguyên liệu protein theo điểm 1 làm hoạt chất.
6. Phương pháp điều chế nguyên liệu protein theo điểm 1, phương pháp này bao gồm các bước từ 1) đến 3) sau:
  - 1) điều chế angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin;
  - 2) điều chế lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza; và
  - 3) trộn lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza theo bước 2) nêu trên và angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin theo bước 1) nêu trên theo tỷ lệ khối lượng so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong khoảng từ 0,3 đến 20.
7. Phương pháp sản xuất nguyên liệu protein theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm bước chiết phần chứa angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin và lactoperoxidaza và/hoặc sản phẩm thủy phân của lactoperoxidaza từ sữa và/hoặc nguyên liệu thu được từ sữa theo tỷ lệ khối lượng so với angiogenin và/hoặc sản phẩm thủy phân của angiogenin nằm trong khoảng từ 0,3 đến 20.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước làm thủy phân angiogenin và/hoặc lactoperoxidaza chứa trong phần đã nêu bằng enzym.