



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0040916

(51)⁷ A61K 31/194; A61P 21/00; A61P 9/04; (13) B
A61K 31/198

(21) 1-2020-00023

(22) 20/07/2018

(86) PCT/IB2018/055425 20/07/2018

(87) WO 2019/021135 A1 31/01/2019

(30) 102017000087359 28/07/2017 IT

(45) 26/08/2024 437

(43) 27/07/2020 388

(73) Professional Dietetics S.p.A. (IT)

Via Ciro Menotti 1/A, 20129 Milano, Italy

(72) GIORGETTI, Paolo Luca Maria (IT).

(74) Công ty TNHH Tư vấn đầu tư và chuyển giao công nghệ (INVESTCONSULT)

(54) CHẾ PHẨM DÙNG THỨC ĐẨY TĂNG SINH TY THỂ VÀ CẢI THIỆN CHỨC NĂNG CỦA TY THỂ Ở ĐỐI TƯỢNG VÀ DƯỢC PHẨM BAO GỒM CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm dùng để thúc đẩy tăng sinh ty thể và cải thiện chức năng của ty thể cho một đối tượng, sử dụng cho nội khoa, trong điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến rối loạn chức năng ty thể, nhất là teo cơ hoặc suy giảm thính lực, chế phẩm chứa hoạt chất, hoạt chất này bao gồm các axit amin leuxin, isoleuxin, valin, threonin, lysin và axit xitric, axit succinic, axit malic. Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm bao gồm chế phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập chung đến các chế phẩm có chứa axit amin. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các chế phẩm bao gồm axit amin sử dụng trong nội khoa, đặc biệt là dùng trong điều trị các bệnh liên quan đến rối loạn chức năng ty thể.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ty thể là các bào quan tế bào có chức năng chính là photphoryl hóa - oxy hóa, một quá trình mà qua đó năng lượng tạo ra từ quá trình chuyển hóa glucoza hoặc axit béo được chuyển đổi thành adenosin triphosphat (ATP). ATP sau đó được sử dụng để thúc đẩy các phản ứng tổng hợp sinh học và các hoạt động trao đổi chất cần tiêu hao năng lượng khác.

Rối loạn chức năng ty thể có thể ảnh hưởng đến bất kỳ mô nào với một loạt các triệu chứng, tùy thuộc vào mức độ liên quan giữa các mô khác nhau.

Các bệnh phát sinh từ rối loạn chức năng ty thể có thể bao gồm, ví dụ như sung ty thể do nhiều điện thế màng ty thể, rối loạn chức năng do kích ứng oxy hóa như tác động của các loại oxy phản ứng (ROS) hoặc các gốc tự do, rối loạn chức năng do đột biến gen và các bệnh di truyền do thiếu hụt chức năng của các cơ chế photphoryl oxy hóa liên quan tới sản sinh năng lượng.

Ty thể thoái hóa theo tuổi tác, suy giảm hoạt động hô hấp, bị tổn thương tổn ADN (mtADN) và sinh ra quá nhiều loại oxy phản ứng (ROS).

Bằng chứng gần đây cho thấy rối loạn chức năng ty thể có liên quan tới một số bệnh, bao gồm rối loạn chuyển hóa và tim mạch do tuổi tác (xơ vữa động mạch), ngoài các bệnh thoái hóa thần kinh nghiêm trọng như bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson và bệnh Huntington cùng bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD).

Rối loạn chức năng ty thể cũng đã được tìm thấy trong bệnh béo phì và các chứng rối loạn liên quan, bao gồm đái tháo đường loại 2, huyết áp cao, rối loạn lipid máu, suy tim, bệnh thận và loãng xương.

Đáng chú ý, tình trạng teo cơ, được định nghĩa là một trong những nguyên nhân

quan trọng nhất dẫn đến suy giảm chức năng và mất khả năng độc lập ở người cao tuổi khi cơ xương mất dần khối lượng và sức mạnh ngoài ý muốn, và đặc điểm chính của hội chứng bạc nhược, là do suy giảm khối lượng và chức năng ty thể. Ngoài ra, hội chứng suy nhược hoặc hao mòn được định nghĩa là tình trạng cơ thể sút cân ngoài ý muốn, teo cơ, mệt mỏi và yếu ớt. Suy nhược được tìm thấy ở những người mắc bệnh ung thư, AIDS, bệnh tiêu chảy mãn, COPD, bệnh đa xơ cứng, viêm khớp dạng thấp, suy tim sung huyết, bệnh lao và chứng chán ăn tâm thần. Chưa phát hiện ra loại thuốc hoặc chất dinh dưỡng nào có thể ngăn ngừa và/hoặc điều trị tình trạng này.

Do đó, kèm theo dịch bệnh béo phì và gia tăng dân số trên toàn thế giới, bệnh thường gặp nhất trong tương lai sẽ là các đối tượng cao tuổi mắc chứng teo cơ, béo phì.

Các chiến lược nhằm giảm thiểu tình trạng thâm hụt do độ tuổi liên quan đến tăng sinh và hoạt động của ty thể bao gồm hạn chế calo (CR) và tập thể dục vừa phải, giúp tăng cường khả năng thích nghi ở động vật có vú. Người ta đã phát hiện ra rằng CR giúp kéo dài tuổi thọ trong tình trạng sức khỏe tốt (healthspan), thông qua việc ngăn ngừa viêm nhiễm, bệnh tim mạch, ung thư và rối loạn thoái hóa thần kinh. CR thúc đẩy biểu hiện của các gen liên quan đến tăng sinh ty thể và cải thiện chức năng của ty thể khi già yếu hoặc trong các tế bào và mô bị tổn thương (Nisoli et al., 2005).

Mặc dù CR có tác dụng có lợi ở nhiều người, chế độ ăn kiêng như vậy vẫn khó có thể được áp dụng rộng rãi cho người cao tuổi.

Là giải pháp thay thế với các lợi ích của việc tiết độ ăn uống mà không giảm lượng calo hấp thụ, một chế phẩm cụ thể bao gồm các axit amin đã được sử dụng ở động vật có vú như đã được bộc lộ làm ví dụ trong EP 2 196 203 B1.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Phần mô tả theo đây nhằm mục đích cung cấp các chế phẩm gốc axit amin mới đặc biệt hiệu quả trong việc thúc đẩy tăng sinh ty thể và cải thiện chức năng của ty thể cho một đối tượng.

Theo mô tả hiện tại, mục đích trên đạt được nhờ vào đối tượng bảo hộ được nhắc lại trong các yêu cầu bảo hộ kèm theo, được hiểu là một phần không thể thiếu trong bản bộc lộ này.

Một phương án theo bản mô tả hiện tại cung cấp một chế phẩm dùng để thúc đẩy

tăng sinh ty thể và cải thiện chức năng của ty thể cho một đối tượng, chế phẩm chứa hoạt chất, hoạt chất này bao gồm các axit amin leuxin, isoleuxin, valin, threonin, lysin và axit xitric, axit succinic, axit malic.

Theo một hoặc nhiều phương án, hoạt chất của chế phẩm có chứa một hoặc nhiều axit amin được chọn trong nhóm bao gồm histidin, phenylalanin, methionin, tryptophan, xistein và tyrosin.

Theo một hoặc nhiều phương án, chế phẩm được bộc lộ có thể được sử dụng trong nội khoa.

Theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm này được sử dụng để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến rối loạn chức năng ty thể, nhất là teo cơ hoặc suy giảm thính lực.

Theo một phương án được ưu tiên khác, chế phẩm này có thể được sử dụng trong điều trị và/hoặc phòng ngừa các bệnh thoái hóa thần kinh liên quan đến rối loạn chức năng ty thể, như bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson và bệnh Huntington.

Theo một phương án khác, chế phẩm có thể được sử dụng trong điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến rối loạn chức năng ty thể như là xơ vữa động mạch, tiểu đường loại 2, bệnh thận, COPD và loãng xương.

Theo một hoặc nhiều phương án, chế phẩm có thể được sử dụng trong điều trị và/hoặc phòng ngừa các tình trạng lâm sàng suy dinh dưỡng, đặc biệt là trong điều trị và/hoặc phòng ngừa suy dinh dưỡng protein và suy nhược.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế sẽ được mô tả hoàn toàn bằng ví dụ có tham chiếu đến các hình vẽ kèm theo, trong đó:

- Fig. 1 thể hiện hàm lượng ADN ty thể (mtADN) được phân tích bằng phương pháp phản ứng tổng hợp chuỗi (PCR) định lượng trong tế bào cơ tim HL-1 được xử lý qua các chế phẩm gốc axit amin khác nhau trong 48 giờ (48 giờ, 2 ngày). PCR định lượng được thực hiện ba lần và được chuẩn hóa thành mã hóa gen-ADN cho GAPDH ($n = 3$, trung bình $\pm$ SEM). Giá trị của các tế bào không qua xử lý (CT) được lấy là 1,0 ($*p < 0,05$ so với các tế bào không qua xử lý, $\#p < 0,05$ so với BCAAem và B2).

- Fig. 2 thể hiện mức độ mRNA của chất đánh dấu tăng sinh ty thể (Tfam, PGC-1 α , Cyt c) được phân tích bằng phương pháp PCR định lượng trong tế bào cơ tim HL-1 được xử lý qua các chế phẩm gốc axit amin trong 24 giờ (1 ngày). PCR định lượng được thực hiện ba lần và được chuẩn hóa thành GAPDH ($n = 3$, trung bình $\pm$ SEM). * $p < 0,05$ so với các tế bào không qua xử lý, được biểu thị bằng 1,0. # $p < 0,05$ so với BCAAem.

- Fig. 3 thể hiện mức độ chất đánh dấu tăng sinh ty thể (Tfam, PGC-1 α , Cyt c) được phân tích bằng PCR định lượng trong tế bào cơ tim HL-1 được xử lý qua các chế phẩm gốc axit amin trong 48 giờ (2 ngày). PCR định lượng được thực hiện ba lần và được chuẩn hóa thành GAPDH ($n = 3$, trung bình $\pm$ SEM). * $p < 0,05$ so với các tế bào không qua xử lý, được biểu thị bằng 1,0. # $p < 0,05$ so với BCAAem.

- Fig. 4 thể hiện mức độ mRNA của nhân tố giống Krüppel 15 (KFL15) và photphataza protein hướng vào chất nền ty thể nhóm 2C (PP2CM) là các protein điều tiết quá trình dị hóa của các axit amin chuỗi nhánh (BCAA). PP2CM và KFL15 đã được phân tích bằng PCR định lượng trong các tế bào cơ tim HL-1 được xử lý qua các chế phẩm gốc axit amin trong 24 giờ (1 ngày) hoặc 48 giờ (2 ngày). PCR định lượng được thực hiện ba lần và được chuẩn hóa thành GAPDH ($n = 3$, trung bình $\pm$ SEM). * $p < 0,05$ so với các tế bào không qua xử lý, được biểu thị bằng 1,0; # $p < 0,05$ so với BCAAem và B2.

- Fig. 5 thể hiện kết quả đánh giá tốc độ tiêu thụ oxy (OCR). Mức tiêu thụ oxy trong các tế bào cơ tim HL-1 được xử lý qua các chế phẩm gốc axit amin hoặc DETA-NO trong 48 giờ. **** $p < 0,001$ so với tế bào không qua xử lý; ##### $p < 0,001$ so với BCAAem và B2.

Mô tả chi tiết các phương án thực hiện sáng chế

Trong phần mô tả sau đây, nhiều chi tiết cụ thể được đưa ra để giúp hiểu rõ về các phương án. Các phương án có thể được thực hiện mà không có một hoặc nhiều chi tiết cụ thể, hoặc với các phương pháp, thành phần, vật liệu khác, v.v. Trong các trường hợp khác, các cấu trúc, vật liệu hoặc hoạt động đã được biết đến rộng rãi không được thể hiện hoặc mô tả chi tiết để tránh gây phân tán khi tìm hiểu các khía cạnh của các phương án.

Xuyên suốt bản mô tả, các dấu hiệu “một phương án”, có nghĩa là một tính năng, cấu trúc hoặc đặc tính cụ thể được mô tả liên quan đến phương án được bao gồm trong ít nhất một phương án. Do đó, sự xuất hiện của các cụm từ “theo một phương án” ở nhiều

chỗ trong bản mô tả này không nhất thiết là đang đề cập đến cùng một phương án. Hơn nữa, các tính năng, cấu trúc hoặc đặc tính cụ thể có thể được kết hợp theo bất kỳ cách thức phù hợp nào trong một hoặc nhiều phương án. Các tiêu đề được cung cấp ở đây chỉ nhằm tiện đối chiếu và không diễn giải phạm vi hay ý nghĩa của các phương án.

Chế phẩm được bộc lộ chứa hoạt chất, hoạt chất này bao gồm các axit amin leuxin, isoleuxin, valin, threonin, lysin và các axit xitric, axit succinic, axit malic.

Chế phẩm bao gồm các axit amin - như được bộc lộ trong EP 2 196 203 B1 - đã được sử dụng cho động vật có vú như một giải pháp thay thế với các lợi ích của việc hạn chế calo (CR); đã thấy được rằng chế phẩm gốc axit amin đó (được gọi là “BCAAem” như bộc lộ sau đây) kéo theo tăng sinh ty thể tăng cường trong cả cơ tim và cơ xương (D’Antona et al., 2010). Những ảnh hưởng này gián tiếp qua việc biểu hiện nitric oxit syntaza nội mô (eNOS) và tiếp theo là việc sản sinh oxit nitric (NO) (D’Antona et al., 2010).

Tác giả sáng chế đã tìm ra kết quả bất ngờ rằng khi thêm các axit cụ thể vào chế phẩm bao gồm tổ hợp tương tự từ leuxin, isoleuxin, valin, threonin và lysin sẽ làm tăng đáng kể chức năng ty thể của tế bào.

Tác giả sáng chế đã thử nghiệm một số chế phẩm khác nhau về các axit chứa trong đó và thấy rằng các chế phẩm bao gồm thành phần giống như hoạt chất có chứa axit xitric, axit succinic và axit malic kết hợp với leuxin, isoleuxin, valin, threonin và lysin có hiệu quả cao đối với các mục đích được chỉ định. Thật vậy, các chế phẩm bao gồm hoạt chất đã nêu ở trên cũng như các chế phẩm bao gồm hoạt chất đã nêu ở trên bao gồm thêm các axit amin cụ thể khác (được liệt kê trong Bảng 1 dưới đây) có hiệu quả hơn đáng kể so với các chế phẩm gốc axit amin đã được thử nghiệm trước đây (BCAAM) trong việc thúc đẩy tăng sinh và chức năng ty thể.

Các chế phẩm đã được thử nghiệm trên Dòng tế bào cơ tim (HL-1), tức là các tế bào đại diện cho một mô hình chức năng tim *trong ống nghiệm*. Kết quả thu được từ việc phân tích các tế bào cơ tim này có thể được sử dụng để xác minh tính hiệu quả của các chế phẩm mới trong phòng ngừa suy tim.

Theo một hoặc nhiều phương án, chế phẩm được bộc lộ trong tài liệu này chứa hoạt chất, hoạt chất này bao gồm axit xitric, axit succinic và axit malic kết hợp với leuxin, isoleuxin, valin, threonin và lysin, trong đó tỷ lệ trọng lượng giữa tổng lượng axit xitric,

axit succinic và axit malic và tổng lượng axit amin leuxin, isoleuxin, valin, threonin, lysin nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,3, tốt nhất là từ 0,1 đến 0,25.

Theo một hoặc nhiều phương án, hoạt chất có thể chứa thêm một hoặc nhiều axit amin được chọn trong nhóm bao gồm histidin, phenylalanin, methionin, tryptophan, xistein, tyrosin.

Theo một phương án khác, hoạt chất của chế phẩm được bộc lộ trong tài liệu này cũng có thể bao gồm axit aspactic và/hoặc ocnithin L-alpha ketoglutarat (OKG).

Theo một phương án, chế phẩm chứa hoạt chất, hoạt chất bao gồm leuxin, isoleuxin, valin, threonin, lysin, histidin, phenylalanin, methionin, tryptophan, xistein và có thể thêm tyrosin, cũng như axit xitric, axit succinic và axit malic, axit amin nêu trên là axit amin duy nhất có trong chế phẩm.

Theo một phương án khác, chế phẩm có thể bao gồm các axit amin isoleuxin, leuxin và valin với lượng từ 35% đến 65% trọng lượng, tốt nhất là từ 42% đến 56% trọng lượng so với trọng lượng của hoạt chất.

Theo một hoặc nhiều phương án, tỷ lệ trọng lượng giữa leuxin và axit xitric nằm trong khoảng giữa 5 và 1, tốt nhất là trong khoảng từ 2,50 đến 3,50.

Theo một phương án khác, trọng lượng hoặc số mol axit xitric cao hơn trọng lượng hoặc số mol riêng của axit malic và axit succinic. Tốt hơn là, trọng lượng hoặc số mol của axit xitric cao hơn trọng lượng hoặc tổng số mol của axit malic cộng với axit succinic. Theo một phương án khác, tỷ lệ trọng lượng giữa axit xitric và tổng axit malic và axit succinic nằm trong khoảng từ 1,0 đến 4,0, tốt nhất là từ 1,5 đến 2,5. Theo phương án được ưu tiên, tỷ lệ trọng lượng axit xitric:axit malic:axit succinic nằm trong khoảng giữa 10:1:1 và 2:1,5:1,5, tốt hơn là trong khoảng giữa 7:1:1 và 1,5:1:1, tốt hơn nữa là trong khoảng giữa 5:1:1 và 3:1:1. Theo một phương án được ưu tiên, tỷ lệ trọng lượng axit xitric:axit malic:axit succinic là 4:1:1.

Theo một số phương án được bộc lộ, tỷ lệ mol isoleuxin:leuxin được ưu tiên nằm trong khoảng 0,2-0,7, tốt nhất là trong khoảng 0,30-0,60 và/hoặc tỷ lệ trọng lượng valin:leuxin được ưu tiên nằm trong khoảng 0,2-0,70, tốt nhất là trong khoảng 0,30-0,65.

Theo một phương án khác, tỷ lệ mol threonin:leuxin nằm trong khoảng 0,10-0,90, tốt nhất là trong khoảng 0,20-0,70 và/hoặc tỷ lệ trọng lượng lysin:leuxin nằm trong khoảng

0,20-1,00, tốt nhất là trong khoảng 0,40-0,90.

Theo một phương án được ưu tiên, tỷ lệ giữa tổng số mol axit xitric, axit malic, axit succinic và tổng số mol của methionin, phenylalanin, histidin và tryptophan cao hơn 1,35.

Theo một hoặc nhiều phương án, tỷ lệ trọng lượng giữa tổng axit xitric, axit malic, axit succinic và tổng axit amin chuỗi nhánh leuxin, isoleuxin, valin nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,4, tốt nhất là từ 0,15 đến 0,35.

Theo một phương án khác, tổng khối lượng của các axit amin chuỗi nhánh leuxin, isoleuxin, valin cộng với threonin và lysin cao hơn tổng khối lượng của ba axit xitric, axit malic, axit succinic. Tốt hơn là, trọng lượng của các axit đơn (axit xitric, axit succinic hoặc axit malic) nhỏ hơn khối lượng của từng loại axit amin leuxin, isoleuxin, valin, threonin và lysin.

Theo một phương án khác, tổng số mol của lysin và threonin cao hơn tổng số mol của ba axit xitric, axit succinic, axit malic. Tốt hơn là, tỷ lệ giữa tổng số mol của ba axit xitric, axit succinic, axit malic và tổng số mol của lysin và threonin nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,7, tốt nhất là từ 0,15 đến 0,55.

Theo một hoặc nhiều phương án, chế phẩm được bộc lộ trong tài liệu này còn bao gồm các vitamin, tốt nhất là được chọn trong nhóm vitamin B, chẳng hạn như vitamin B1 và/hoặc vitamin B6.

Theo một phương án tiếp theo trong bản bộc lộ này, chế phẩm có thể bao gồm cacbohyđrat, chất phụ gia và/hoặc các chất tạo hương vị.

Hơn nữa, đặc biệt là khi điều chế các chế phẩm bộc lộ theo đây, cụ thể là với hoạt chất, tốt nhất nên tránh dùng axit amin arginin.

Ngoài ra, trong thành phần được nêu trong tài liệu này tốt nhất nên loại trừ các loại axit amin là serin, prolin, alanin.

Các axit amin trên có thể phản tác dụng hoặc thậm chí có hại khi ở một số nồng độ hoặc tỷ lệ cân bằng hóa học trong chế phẩm.

Các axit amin được bộc lộ trong phần mô tả tại đây có thể được thay thế bằng các dẫn xuất được phẩm tương ứng, cụ thể là muối.

Theo một hoặc nhiều phương án, các chế phẩm trong tài liệu này được tiết lộ là để

sử dụng trong nội khoa.

Như sẽ nêu rõ sau đây, việc sử dụng các chế phẩm được bộc lộ là đặc biệt hiệu quả trong việc thúc đẩy tăng sinh và chức năng ty thể.

Theo phương án được ưu tiên, các chế phẩm được bộc lộ có thể được sử dụng trong điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến rối loạn chức năng ty thể, nhất là teo cơ hoặc suy giảm thính lực.

Theo một phương án được ưu tiên khác, các chế phẩm được bộc lộ tại đây có thể được sử dụng trong điều trị và/hoặc phòng ngừa các bệnh thoái hóa thần kinh liên quan đến rối loạn chức năng ty thể, nhất là bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson và bệnh Huntington.

Theo một phương án khác, các chế phẩm có thể được sử dụng trong điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến rối loạn chức năng ty thể, nhất là xơ vữa động mạch, tiểu đường loại 2, bệnh thận, COPD và loãng xương.

Theo một hoặc nhiều phương án, chế phẩm có thể được sử dụng trong điều trị và/hoặc phòng ngừa các tình huống lâm sàng suy dinh dưỡng, đặc biệt là trong điều trị và/hoặc phòng ngừa suy dinh dưỡng protein và suy nhược.

Theo một phương án khác, các chế phẩm axit amin có thể bao gồm các tá dược được dùng, như protein, vitamin, cacbohydrat, chất làm ngọt tự nhiên và nhân tạo và/hoặc các chất tạo hương vị. Theo một phương án được ưu tiên, các tá dược được dùng từ đạm váng sữa, maltodextrin, fructoza, canxi caseinat, dầu cá, axit xitric hoặc muối của chúng, este sucraloza và sucroza, vitamin D3, vitamin nhóm B.

Để dùng cho đường uống, các chế phẩm theo mô tả có thể ở dạng viên nén, viên nang, hạt, gel, bột gel, bột.

Các thông số kỹ thuật khác về số lượng và tỷ lệ giữa các axit amin khác nhau cung cấp cho các chế phẩm sẽ được bao hàm trong yêu cầu bảo hộ kèm theo, là một phần không thể thiếu của hướng dẫn kỹ thuật cung cấp theo đây liên quan đến sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Bảng 1 thể hiện các chế phẩm gốc axit amin khác nhau được thử nghiệm trên các tế bào HL-1 như được bộc lộ dưới đây.

Cụ thể, chế phẩm BCAAem là chế phẩm được bộc lộ trong EP 2 196 203 B1.

Chế phẩm có tên "B2" có hoạt chất được kết hợp từ các axit amin tương tự như chế phẩm BCAAem nhưng bao gồm thêm axit xitric. Chế phẩm này còn bao gồm vitamin B1 và B6.

Các chế phẩm có tên alpha 5 ($\alpha 5$), alpha 6 ($\alpha 6$), alpha 7 ($\alpha 7$) chứa hoạt chất có chứa axit amin và axit xitric, axit succinic và axit malic. Ngoài ra, hoạt chất của chế phẩm alpha 7 cũng bao gồm OKG (ocnithin L- α ketoglutarat) và axit amin atpatac (Axit L-aspartic).

Bảng 1

Chế phẩm (%)	BCAAem	B2	$\alpha 5$	$\alpha 6$	$\alpha 7$
L-Leuxin	30,01	25,9555	31,0885	22,4500	21,7188
L-Lysin HCl clohidrat	19,58	16,9346	16,903	21,1300	20,4380
L-Isoleuxin	15	12,9778	10,3628	11,2300	10,8594
L-Valin	15	12,9778	10,3628	11,2300	10,8594
L-Threonin	8,4	7,2675	7,254	13,1000	12,6693
L-Xistein	3,6	3,1147	3,1089	2,8100	2,7149
L-Histidin	3,6	3,1147	3,1089	2,8100	2,7149
L-Phenylalanin	2,4	2,0764	2,0726	1,8700	1,8099
L-Methionin	1,2	1,0382	1,0363	0,9400	0,9050
L-Tyrosin	0,72	0,6229	0,6218	-	-
L-Tryptophan	0,48	0,4153	2,0726	0,9400	0,9050
OKG (ocnithin L- α ketoglutarat)	-	-	-	-	0,9050
Vitamin B1 (thiamin clohidrat)	-	0,004	0,004	0,0200	0,0163
Vitamin B6 (piridoxin clohidrat)	-	0,0038	0,0038	0,0200	0,0186
Axit xitric khan	-	13,4969	8,0001	7,6500	7,4025
Axit malic	-	-	2,0000	1,9200	1,8551
Axit L-aspartic	-	-	-	-	2,3529
Axit Succinic	-	-	2,0000	1,9200	1,8551
Tỷ lệ Leuxin:Isoleuxin:Valin	2:1:1	2:1:1	3:1:1	2:1:1	2:1:1

Các chế phẩm trong Bảng 1 như trên có thể chuẩn bị trước bằng cách sàng tất cả các thành phần bằng lưới 0,8. Hỗn hợp thô được tạo ra bằng cách lấy mỗi thành phần (với

lượng <10% tính theo tổng khối lượng) cho vào túi polyetylen với một phần L-lysin HCl sao cho đạt được 10% khối lượng của cả chế phẩm. Sau đó lắc túi này trong 5 phút. Sau đó đổ hỗn hợp thô này vào một máy trộn (chân không) với các thành phần còn lại và trộn trong khoảng thời gian 15 phút với tốc độ 120 vòng/phút để thu được chế phẩm thành phẩm đồng nhất.

Các chế phẩm liệt kê trong Bảng 1 đã được sử dụng cho các tế bào cơ tim HL-1 và chức năng của ty thể đã được đánh giá như phân bố lộ sau đây.

Phương pháp

Tế bào và phương pháp xử lý

Các tế bào cơ tim HL-1 (do WC Claycomb, Đại học Y New Orleans đóng góp) được đặt trong các bình tráng fibronectin/gelatin, phát triển lên tới 70%-80% hội lưu trong môi trường Claycomb (JRH Biosciences) được bổ sung 100 μ M norepinephrin (từ 10 mM dung dịch gốc norepinephrin [Sigma-Aldrich] hòa tan trong 30 mM axit L-ascobic [Sigma-Aldrich]), 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penixilin, 100 μ g/ml streptomixin và 10% FBS (JRH Biosciences) như được bộc lộ trong Claycomb et al., 1998.

Các tế bào được xử lý với 1% (w/v) các chế phẩm (hòa tan trong môi trường Claycomb) như trong Bảng 1 trong vòng 24 giờ hoặc 48 giờ.

Vào cuối giai đoạn này, mARN và ADN được tách chiết từ các tế bào hoặc các tế bào được sử dụng để đánh giá mức tiêu thụ oxy. Các tế bào đối chứng chỉ được xử lý trong môi trường Claycomb.

Phương pháp biểu hiện gen và tăng sinh ty thể

Bộ ARN được phân lập từ các tế bào cơ tim HL-1 bằng cách sử dụng bộ kit RNeasy Mini (Qiagen); một microgam bộ ARN được sao chép ngược trong cADN bằng cách sử dụng bộ kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad Laboratories) như được mô tả trong D'Antona et al. (2010).

Mức độ tương đối của gen được tính là 2^{-DDCT} , trong đó DDCT tương ứng với sự khác biệt giữa độ biến thiên chu kỳ ngưỡng của nhóm qua xử lý bất kỳ và độ biến thiên chu kỳ ngưỡng của nhóm không được xử lý bằng cách sử dụng GAPDH làm đối chứng nội bộ. Thuật toán Delta-Delta-CT (DDCT) là một phương pháp xấp xỉ để xác định biểu hiện

gen tương đối với các thí nghiệm phản ứng tổng hợp chuỗi thời gian thực định lượng (qRT-PCR) (xem Livak và Schmittgen, 2001).

Các đoạn mồi (trình tự được báo cáo trong Bảng 2 bên dưới) được thiết kế bằng phần mềm Beacon Designer 2.6 (Premier Biosoft International). Các giá trị nhập vào được chuẩn hóa theo Glixerandehit 3-phosphat dehydrogenat (GAPDH).

Bảng 2

Gen	Đoạn mồi	Trình tự	Ký hiệu	T _a
<i>GAPDH</i>	Sense 5'-3'	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	Số 1	60
	Antisense 5'-3'	ACACATTGGGGGTAGGAACA	Số 2	
<i>Cyt c</i>	Sense 5'-3'	ATAGGGGCATGTCACCTCAAAC	Số 3	61
	Antisense 5'-3'	GTGGTTAGCCATGACCTGAAAG	Số 4	
<i>PGC-1α</i>	Sense 5'-3'	ACTATGAATCAAGCCACTACAGAC	Số 5	61
	Antisense 5'-3'	TTCATCCCTCTTGAGCCTTTTCG	Số 6	
<i>Tfam</i>	Sense 5'-3'	AAGACCTCGTTCAGCATATAACATT	Số 7	60
	Antisense 5'-3'	TTTTCCAAGCCTCATTTACAAGC	Số 08	
<i>KFL15</i>	Sense 5'-3'	ACACCAAGAGCAGCCACCTCA	Số 9	60
	Antisense 5'-3'	TGAGATCGCCGGTGCCTTGA	Số 10	
<i>PP2CM</i>	Sense 5'-3'	ACCACAGGCAGGCGACTC	Số 11	60
	Antisense 5'-3'	TGGCTCATCAATGCGGTTATCC	Số 12	
<i>mtADN</i> (12SrARN)	Sense 5'-3'	ACATGCAAACCTCCATAGACCGG	Số 13	63
	Antisense 5'-3'	TCACTGCTGAGTCCCGTGGG	Số 14	
<i>gADN</i> (GAPDH)	Sense 5'-3'	GGTCGCGGTGTGGGCATTTG	Số 15	60
	Antisense 5'-3'	CGTGATCGTAGCGTCTGGTT	Số 16	

T_a nhiệt độ ủ (°C); Mã số truy cập GAPDH: NM_008084.3; Mã số truy cập Cyt c: NM_007808; Mã số truy cập PGC-1α: AF049330; Mã số truy cập Tfam: NM_009360.4; Mã số truy cập KFL15: NM_023184.4; Mã số truy cập PP2CM: NM_175523.4; Ty thể Chuột nhắt, bộ gen hoàn chỉnh: NC_005089.1; gADN (GAPDH): NC_000072.6; Mã đoạn mồi cho rARN ty thể 12S (NC_005098.1). GAPDH được sử dụng để chuẩn hóa ADN ty thể.

Để phân tích ADN ty thể (mtADN), bộ ADN được tách chiết bằng bộ chiết ADN QIAamp (QIAGEN).

mtADN được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi dành riêng cho gen ADN ty thể (mtADN) và được chuẩn hóa thành ADN bộ gen bằng cách khuếch đại ADN gen GAPDH. Đối với gADN, các đoạn mồi thiết kế bằng phần mềm Beacon Designer 2.6 (Premier Biosoft International; Palo Alto, CA) được thể hiện trong Bảng 2.

Phân tích thống kê

Đối với tất cả dữ liệu biểu hiện gen, các thử nghiệm t với các biến số theo cặp về hai phía được sử dụng để so sánh giá trị giữa tế bào đối chứng và tế bào xử lý. Giá trị $p < 0,05$ thì được coi là có ý nghĩa thống kê.

Mức tiêu thụ oxy

Một lượng 1 ml tế bào cơ tim HL-1 xử lý bằng các chế phẩm trong Bảng 1 được khuấy lại trong dung dịch muối cân bằng của Hank (Sigma) và lắng xuống các tế bào dạng hạt nhỏ. Một số tế bào HL-1 cũng được bổ sung oxit nitric (NO) làm chất cho, đặc biệt là diethylentriamin-NO hay còn gọi là (DETA-NO; Sigma-Aldrich, Milan, Ý), dưới dạng kiểm soát dương tính.

Sau đó, các tế bào được khuấy lần nữa trong một hệ đệm hô hấp (0,3 M manitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM K₂PO₄, pH 7,4) với mật độ $3,0 \times 10^6$ /ml.

Các mẫu được phân tích ở 37°C trong một bình kín khí được trang bị điện cực oxy loại Clark (Rank Brothers Ltd.) kết nối với máy ghi biểu đồ.

Điện cực oxy được hiệu chỉnh theo tiêu chuẩn nồng độ oxy trong môi trường ủ là 200 $\mu\text{mol/l}$ ở 37°C.

Mức tiêu thụ oxy được đánh giá khi trộn liên tục trong khoảng mười phút. Độ dốc đường biểu đồ theo máy ghi sau đó được sử dụng để tính mức tiêu thụ oxy. Hàm lượng oxy có thể thay đổi tùy theo số lượng tế bào. Do đó, hàm lượng protein, tương quan trực tiếp với hàm lượng tế bào, đã được sử dụng để chuẩn hóa mức tiêu thụ oxy trong các mẫu tế bào. Hàm lượng protein được xác định bằng cách sử dụng xét nghiệm protein axit bixinchonic (BCA).

Kết quả

ADN ty thể (mtADN)

ADN ty thể (mtADN) đầu tiên được đánh giá trong các tế bào đã xử lý qua các thành phần axit amin khác nhau để xác minh tác động của chúng đến khối ty thể.

Như thể hiện trong Fig. 1, các tế bào cơ tim HL-1 được xử lý bằng thành phần $\alpha 5$ cho thấy sự gia tăng mtADN đáng kể nhất, so với mtADN được đánh giá trong các tế bào đối chứng (CT), các tế bào được xử lý bằng B2 và đặc biệt là các tế bào được xử lý bằng chế phẩm BCAAem.

PGC-1 α , Tfam và Cyt c

Tác động của các thành phần axit amin khác nhau cũng đã được thử nghiệm trên sinh học ty thể. Cụ thể, biểu hiện tế bào cơ tim HL-1 trong các chất đánh dấu sau đây đã được đánh giá:

- chất đồng hoạt hóa gamma thụ thể kích hoạt tăng sinh vi thể peroxy 1-alpha (PGC-1 α), chất điều tiết chính của sinh học ty thể,
- nhân tố phiên mã ADN ty thể A (Tfam), nhân tố phiên mã mtADN điều tiết quá trình sao chép mtADN,
- phức hợp xitocrom (Cyt c), protein phức hợp hô hấp.

So sánh giữa các kết quả thu được sau khi sử dụng chế phẩm BCAAem, chế phẩm B2 (là chế phẩm tương tự với chế phẩm BCAAem nhưng cũng bao gồm axit xitric), $\alpha 5$ (là chế phẩm bao gồm hoạt chất không phải axit amin cũng như axit xitric, axit succinic, axit malic), có thể thấy thành phần $\alpha 5$ có hiệu quả cao nhất trong việc kích thích biểu hiện của các chất đánh dấu nêu trên trong các tế bào cơ tim HL-1.

Hơn nữa, tác động theo thời gian quan sát được như sau: sau khi thêm 48 giờ sử dụng chế phẩm $\alpha 5$ bao gồm các axit amin được liệt kê trong Bảng 1 cùng với ba axit biểu thị cacboxilic thì mức gia tăng vẫn rõ rệt hơn so với các giá trị cơ sở.

Sự gia tăng này cũng có ý nghĩa thống kê đối với giá trị của chế phẩm BCAAem khi dùng cho Tfam so với việc xử lý trong 24 giờ (Fig. 2) cũng như khi dùng cho PGC-1 α và cho Cyt c sau quá trình xử lý trong 48 giờ (Fig. 3).

KFL15 và PP2CM

Nhân tố kiểu Krüppel 15 (KFL15) và photphataza protein hướng vào chất nền ty thể nhóm 2C (PP2CM) là các protein điều tiết quá trình dị hóa của các axit amin chuỗi nhánh (BCAA).

Quá trình dị hóa BCAA đối với ba BCAA có chung các bước đầu tiên và trong đó cần các enzym ty thể BCAA aminotransferaza (BCAT) và phức hợp dehidrogenaza axit α -keto chuỗi nhánh (BCKDC).

Trong bước thoái biến có thể đảo chiều toàn phần đầu tiên, BCAT ty thể chuyển nhóm amin từ BCAAs sang α -ketoglutarat để tạo thành axit α -keto chuỗi nhánh tương ứng (BCKA) và glutamat.

Sau đó, BCKDC xúc tác quá trình khử cacboxyl từ các nhóm cacboxyl của BCKA, để tạo thành các este axyl-CoA chuỗi nhánh tương ứng.

Phản ứng này không thể đảo chiều và do đó dẫn đến việc thoái biến các BCAA.

Hoạt tính BCKDC được điều tiết nhờ ức chế biến cấu thành phẩm bằng NADH, α -ketoisocaproat và este axyl-CoA chuỗi nhánh.

Hoạt tính BCKDC được xác định qua trạng thái photphoryl hóa của cấu trúc siêu phân tử điều tiết E1a.

Khi mức BCAA xuống thấp, E1a bị photphoryl hóa cao bằng một kinazo BCKD, dẫn đến ức chế hoạt tính BCKDC và bảo toàn BCAA tự do.

Khi mức BCAA lên cao, E1a bị khử photphoryl bằng một loại photphataza protein Ser/Thr kiểu 2C hướng vào ty thể có tên là PP2C trong ty thể (PP2CM) hoặc photphataza protein 1K phụ thuộc Mg^{2+}/Mn^{2+} (PPM1K), dẫn đến hoạt hóa BCKDC và giảm bớt tổng BCAA (Bifari và Nisoli, 2016).

Ngoài ra, có thể thấy KLF15 đã làm tăng biểu hiện gen BCAT, BCKDC và PP2CM trong quả tim (Sun et al., 2016).

Qua đánh giá mức mARN của PP2CM và KFL15, có thể thấy chế phẩm $\alpha 5$ đã làm tăng mức mARN PP2CM và KLF15 so với giá trị cơ sở trong tế bào cơ tim HL-1. Sự gia tăng này có ý nghĩa với cả chế phẩm BCAAem (Fig. 4)

Các kết quả này cho thấy các chế phẩm chứa hoạt chất mà có chứa leuxin, isoleuxin, valin, threonin, lixin và axit xitric, axit succinic và axit malic có hiệu quả cao trong việc

thúc đẩy chức năng của ty thể và kích hoạt quá trình tăng sinh ty thể hiệu quả hơn ngay cả đối với chế phẩm BCAAem trong các tế bào có hoạt động trao đổi chất.

Tiêu thụ oxy (OCR)

Mức tiêu thụ oxy của các tế bào HL-1 bổ sung bằng các chế phẩm khác nhau đã được thử nghiệm. Các tế bào bổ sung diethyltri-amin-NO (DETA-NO) kiểm soát dương tính cũng đã được thử nghiệm. Tác động của DETA-NO làm gia tăng mức tiêu thụ oxy của tế bào đã được thể hiện (Nisoli et al., 2003). Có thể thấy NO đã kích hoạt quá trình tăng sinh ty thể trong nhiều loại tế bào như tế bào mỡ nâu, tế bào 3T3-L1, U937 và tế bào HeLa. Tác động này của oxit nitric phụ thuộc vào guanosine 3',5'-monophosphat (cGMP) và được trung hòa nhờ cảm ứng PGC-1 α , chất điều tiết tăng sinh ty thể chủ yếu (Nisoli et al., 2003).

Sau 48 giờ xử lý bằng DETA-NO, có thể quan sát thấy mức tăng tiêu thụ oxy như mong đợi.

Đáng chú ý nhất là sự gia tăng đáng kể mức tiêu thụ oxy như quan sát được khi các tế bào HL-1 được bổ sung chế phẩm $\alpha 5$ trong 48 giờ, qua đó cho thấy sự gia tăng hoạt động của ty thể (Fig. 5).

Sự gia tăng cao hơn đáng kể so với kết quả quan sát được sau khi cung cấp các chế phẩm B2 và BCAAem.

Tổng hợp lại, các kết quả này chỉ ra rằng các chế phẩm chứa thành phần giống như hoạt chất có kết hợp leuxin, isoleuxin, valin, threonin, lysin, axit xitric, axit succinic và axit malic có hoạt tính thúc đẩy quá trình tăng sinh ty thể, chức năng ty thể và dị hóa BCAA trong tế bào cơ tim HL-1 cao hơn đáng kể.

Chế phẩm alpha 6 ($\alpha 6$) và alpha 7 ($\alpha 7$), cung cấp cho một thành phần hoạt tính bao gồm các BCAA, threonin và lysin, cũng như axit xitric, axit succinic và axit malic được cho là có được những ưu điểm tương tự.

Đáng chú ý, quá trình dị hóa BCAA được làm phong phú trong hỗn hợp còn cung cấp không chỉ Acetyl-CoA mà còn có succinyl-CoA. Nhờ đó, có thể kích hoạt phản ứng tổng hợp succinyl-CoA, lần lượt tạo ra succinat làm chất nền cho phản ứng tiếp theo của succinat dehydrogenaza.

Do đó, succinat cùng với BCAA cho vào hỗn hợp cũng có thể kích thích phản ứng succinat dehydrogenaza và nhờ vậy thúc đẩy thêm cho chu kỳ. Đáng chú ý, succinat

dehydrogenazơ khi cung cấp trực tiếp FADH_2 cũng là một phần của chuỗi chuyển điện tử trong ty thể (phức hợp II). Do đó, kích thích bằng succinat có thể kéo theo kích hoạt trực tiếp các chất mang oxi hóa khử ty thể và tăng hiệu thế màng, từ đó tăng cường độ chênh proton, mức tiêu thụ oxy và tổng hợp ATP.

Đồng thời, bổ sung malat có thể kích hoạt phản ứng dehydrogenazơ của malat và tăng mức độ NADH; đồng thời cung cấp chất nền cho phức hợp I và từ đó làm tăng mức ATP, theo cách tương tự như FADH_2 gốc succinat. Mặt khác, malat có thể kích thích chuyển động qua lại giữa malat và aspartat. Phản ứng kích thích này làm cho cả NADH trong chất dịch bào tương dễ dàng vào trong ty thể, nếu không thì sẽ không thấm qua màng ty thể được, nhờ vậy mà sẵn sàng cho quá trình oxy hóa ty thể. Từ đó, hoạt động của ty thể và mức tiêu thụ oxy cũng tăng thêm.

Từ những điều đã nêu trên, có thể thấy rõ ràng rằng các chế phẩm như được bộc lộ có tác dụng điều trị các tình trạng bệnh lý cá biệt liên quan đến thiếu hụt chức năng ty thể ở người và động vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bifari F, Nisoli E. Branched-chain amino acids differently modulate catabolic or anabolic states in mammals: a pharmacological point of view. *Br J Pharmacol*. 2016 Sep 17. doi: 10.1111/bph.13624. [Epub ahead of print].

Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ Jr. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2979-2984, 1998.

D'Antona G, Ragni M, Cardile A, Tedesco L, Dossena M, Bruttini F, Caliaro F, Corsetti G, Bottinelli R, Carruba MO, Valerio A, Nisoli E. Branched-chain amino acid supplementation promotes survival and supports cardiac and skeletal muscle mitochondrial biogenesis in middle-aged mice. *Cell Metab*. 12: 362-372, 2010.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25: 402-408, 2001.

Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*: 299(5608):896-9, 2003.

Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310: 314-317, 2005.

Sun H, Olson KC, Gao C, Prosdocimo DA, Zhou M, Wang Z, Jeyaraj D, Youn JY, Ren S, Liu Y, Rau CD, Shah S, Ilkayeva O, Gui WJ, William NS, Wynn RM, Newgard CB, Cai H, Xiao X, Chuang DT, Schulze PC, Lynch C, Jain MK, Wang Y. Catabolic Defect of Branched-Chain Amino Acids Promotes Heart Failure. *Circulation* 133: 2038-2049, 2016.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm thúc đẩy tăng sinh ty thể và cải thiện chức năng của ty thể ở đối tượng, chế phẩm này chứa hoạt chất, hoạt chất này bao gồm leuxin, isoleuxin, valin, threonin, lysin, axit xitric, axit succinic và axit malic, trong đó tỷ lệ trọng lượng axit xitric: axit malic: axit succinic nằm trong khoảng giữa 10:1:1 và 1,3:1:1,

trong đó chế phẩm này bao gồm axit amin isoleuxin, leuxin và valin với trọng lượng nằm trong khoảng từ 35% đến 65%,

trong đó tỷ lệ trọng lượng giữa (i) tổng lượng axit xitric, axit malic và axit succinic và (ii) tổng lượng leuxin, isoleuxin và valin nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,4,

trong đó tỷ lệ trọng lượng giữa (i) tổng lượng axit xitric, axit malic và axit succinic và (ii) tổng lượng leuxin, isoleuxin, valin, lysin và threonin nằm trong khoảng giữa 0,05 và 0,3, và

trong đó tỷ lệ trọng lượng giữa leuxin và axit xitric nằm trong khoảng giữa 5 và 1.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó tỷ lệ trọng lượng giữa (i) axit xitric và (ii) tổng lượng axit malic và axit succinic nằm trong khoảng từ 1,0 đến 4,0.

3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó tỷ lệ trọng lượng axit xitric:axit malic:axit succinic nằm trong khoảng giữa 7:1:1 và 1,5:1:1.

4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó hoạt chất đã nêu còn bao gồm ít nhất một axit amin được chọn trong nhóm bao gồm histidin, phenylalanin, methionin, tryptophan, tyrosin và xistein.

5. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó hoạt chất đã nêu còn bao gồm histidin, phenylalanin, methionin, tryptophan và xistein.

6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó hoạt chất đã nêu không bao gồm arginin.

7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm còn bao gồm một hoặc nhiều vitamin.

8. Dược phẩm bao gồm chế phẩm theo điểm 1 và tá dược dược dụng.

9. Chế phẩm theo điểm 7, trong đó một hoặc nhiều vitamin bao gồm một hoặc nhiều vitamin B.
10. Chế phẩm theo điểm 9, trong đó một hoặc nhiều vitamin bao gồm vitamin B1 và/hoặc vitamin B6.
11. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó tỷ lệ trọng lượng axit xitric: axit malic: axit succinic nằm trong khoảng giữa 5:1:1 và 3:1:1.

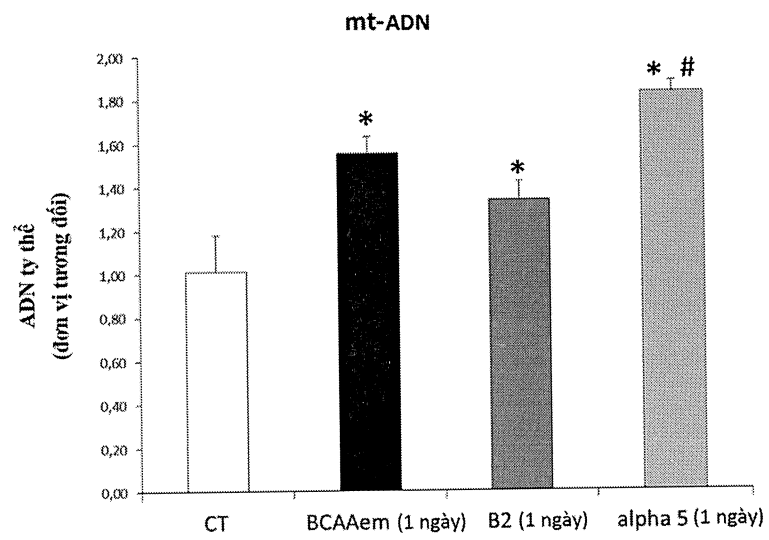


Fig. 1

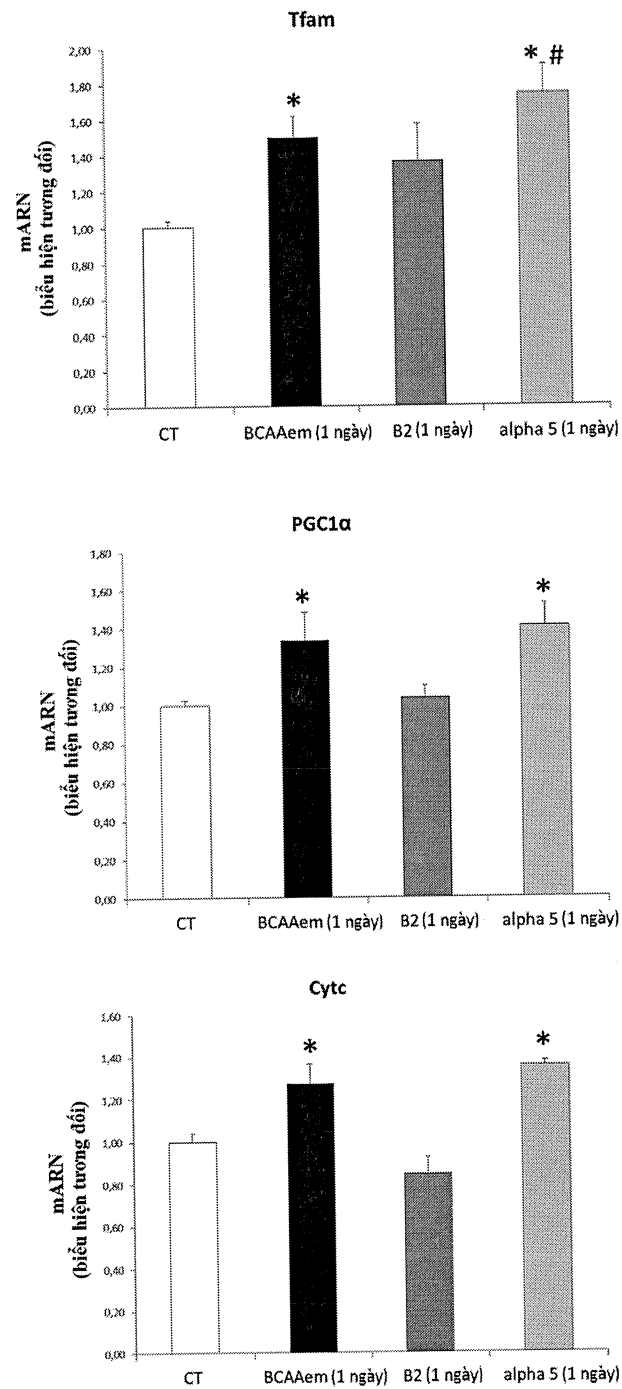


Fig. 2

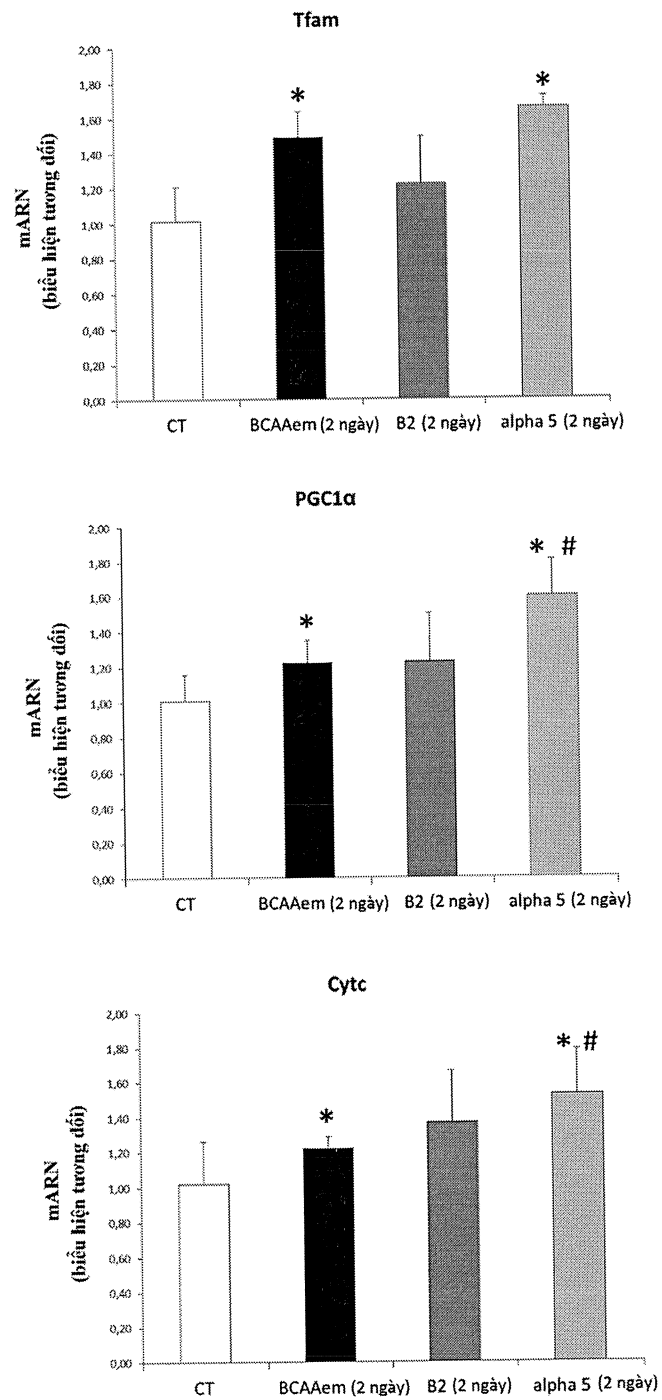


Fig. 3

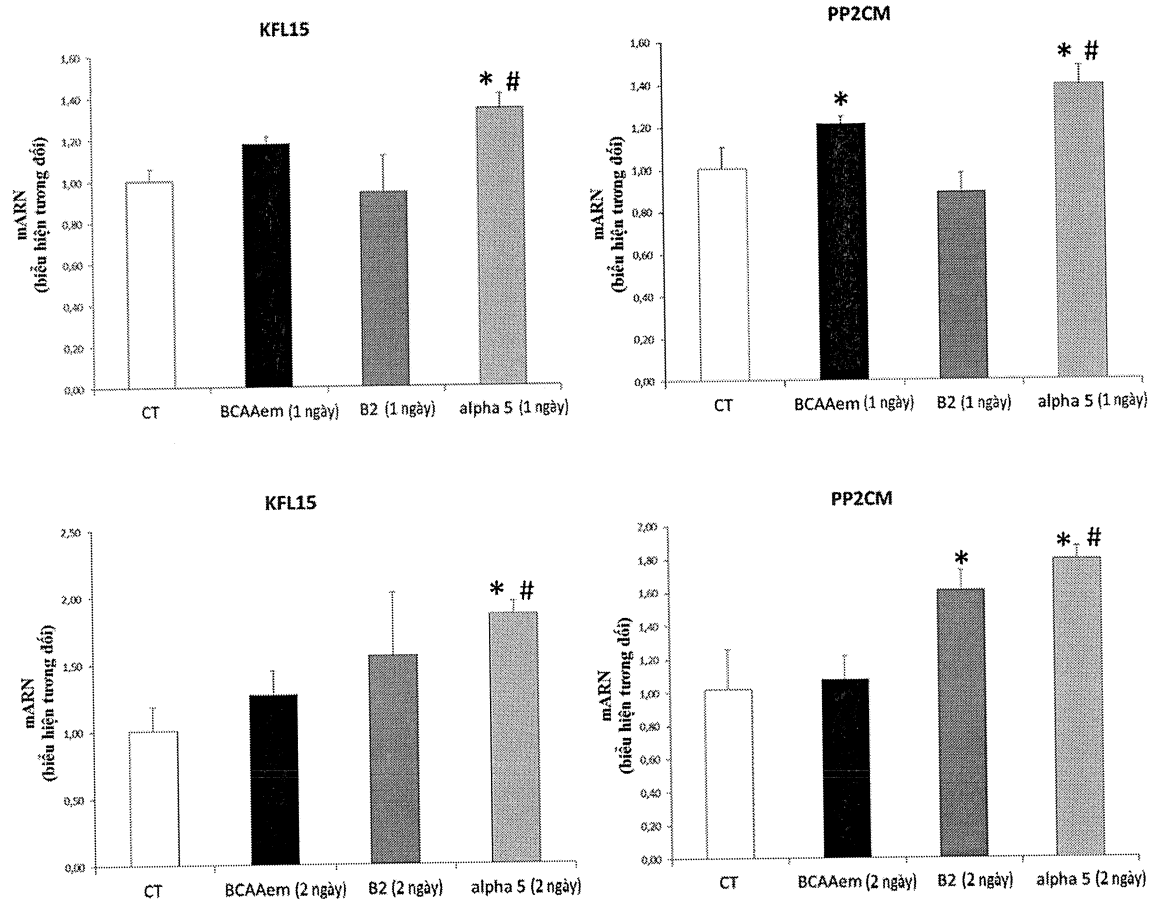


Fig. 4

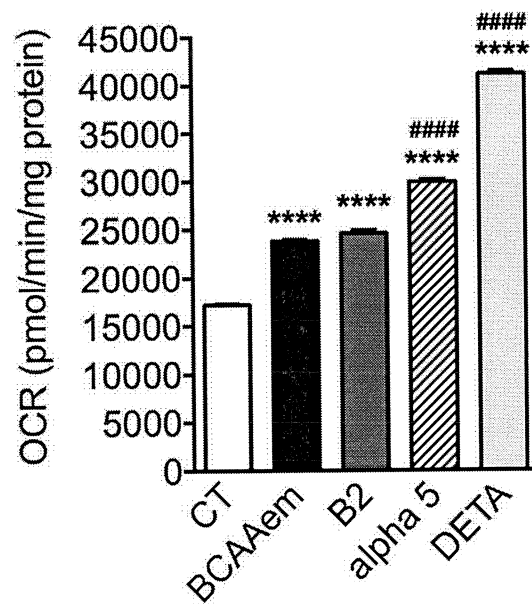
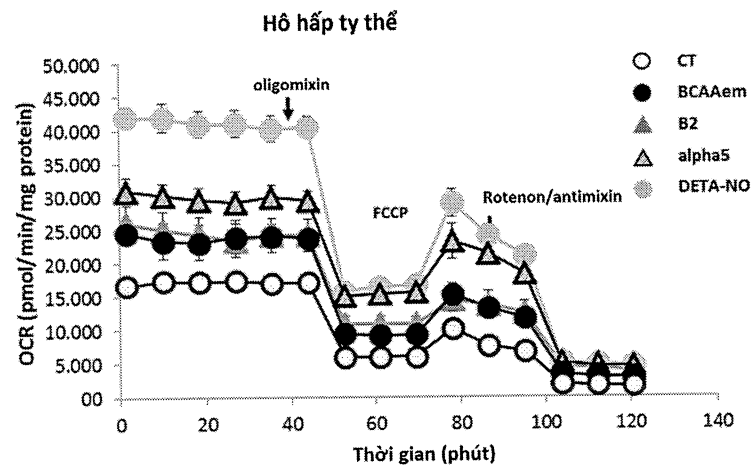


Fig. 5

DANH SÁCH TRÌNH TỰ

<110> Professional Dietetics International S.r.l.

<120> Hợp chất dùng để thúc đẩy tăng sinh ty thể và cải thiện chức năng của ty thể cho một đối tượng

<130> BWO20497-RC

<160> 16

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Chuỗi nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi GAPDH sense 5'-3'

<400> 1

aactttggca ttgtggaagg

20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Chuỗi nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi GAPDH Antisense 5'-3'

<400> 2

acacattggg ggtaggaaca

20

<210> 3

<211> 22

<212> ADN

<213> Chuỗi nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi Cyt c Sense 5'-3'

<400> 3

ataggggcat gtcacctcaa ac

22

<210> 4

<211> 22

<212> ADN

<213> Chuỗi nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi Cyt c Antisense 5'-3'

<400> 4

gtggtttagcc atgacctgaa ag

22

<210> 5

<211> 24

<212> ADN

<213> Chuỗi nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi PGC-1a Sense 5'-3'

<400> 5

actatgaatc aagccactac agac

24

<210> 6

<211> 22

<212> ADN

<213> Chuỗi nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi PGC-1a Antisense 5'-3'

<400> 6

ttcatccctc ttgagccttt cg

22

<210> 7

<211> 25

<212> ADN

<213> Chuỗi nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi Tfam Sense 5'-3'

<400> 7

aagacctcgt tcagcatata acatt

25

<210> 8

<211> 23

<212> ADN

<213> Chuỗi nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi Tfam Antisense 5'-3'

<400> 8
 ttttccaagc ctcattttaca agc 23

<210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Chuỗi nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi KFL15 Sense 5'-3'

<400> 9
 acaccaagag cagccacctc a 21

<210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Chuỗi nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi KFL15 Antisense 5'-3'

<400> 10
 tgagatcgcc ggtgccttga 20

<210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Chuỗi nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PP2CM Sense 5'-3'

<400> 11
 accacaggca ggcgactc 18

<210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Chuỗi nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi PP2CM Antisense 5'-3'

<400> 12
 tggctcatca atgcggttat cc 22

<210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Chuỗi nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi mtADN Sense 5'-3'

<400> 13
 acatgcaaac ctccatagac cgg

23

<210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Chuỗi nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi mtADN Antisense 5'-3'

<400> 14
 tcactgctga gtcccgtggg

20

<210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Chuỗi nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi gADN Sense 5'-3'

<400> 15
 ggtcgcggtg tgggcatttg

20

<210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Chuỗi nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi gADN Antisense 5'-3'

<400> 16
 cgtgatcgta gcgtctggtt

20