



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0043828

(51)^{2020.01} A61K 8/60; A23L 33/105; A23L 33/13; (13) B
A61Q 19/08; A61K 8/9789; A61K 8/98;
A23L 33/10

(21) 1-2020-02486

(22) 17/07/2019

(86) PCT/JP2019/027998 17/07/2019

(87) WO 2020/022131 30/01/2020

(30) 2018-138405 24/07/2018 JP

(45) 25/03/2025 444

(43) 26/04/2021 397A

(73) 1. GENETIC BIO-LAB CO.,LTD. (JP)

12-2, Kita 21-jo Nishi, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 0010021, Japan

2. FINAL FUTURE INTERNATIONAL CO.,LTD. (JP)

4-11-46, Minami-azabu, Minato-ku, Tokyo 1060047, Japan

(72) YAMADA, Yoshihisa (JP); TADA, Yuya (JP).

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

(54) CHẤT ĐỀ HOẠT HÓA CHỨC NĂNG HOẶC ĐIỀU HÒA BIỂU HIỆN GEN CỦA
NGUYÊN BÀO SỢI Ở DA

(21) 1-2020-02486

(57) Sáng chế đề cập đến chất chống lão hóa da, chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa, và sản phẩm mỹ phẩm chứa chất chống lão hóa hoặc chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa mà an toàn và có thể được sử dụng lâu dài. Chất chống lão hóa da, chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa, và sản phẩm mỹ phẩm chứa chất chống lão hóa hoặc chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa theo sáng chế chứa ADN hạ phân tử đặc biệt và dịch chiết đậu tương, tốt hơn là dịch chiết chồi đậu tương, làm thành phần hoạt tính. Các thành phần hoạt tính này có hoạt động hoạt hóa với chức năng của nguyên bào sợi ở da và do đó được dự kiến sẽ ngăn ngừa hoặc cải thiện sự lão hóa của da như giảm độ săn chắc và độ đàn hồi của da, nhăn và chảy xệ.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất chống lão hóa da hoặc chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa, và cụ thể hơn là đề cập đến chất chống lão hóa da và chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa da chứa ADN phân tử lượng thấp đặc trưng và dịch chiết đậu tương làm thành phần hoạt tính, và sản phẩm mỹ phẩm chứa chất chống lão hóa hoặc chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Da đại khái có thể được chia thành biểu bì tiếp xúc với thể giới bên ngoài, trung bì nằm dưới biểu bì và bám chặt vào biểu bì, và mô mỡ dưới da còn nằm dưới trung bì và nằm giữa trung bì và cơ. Trung bì nằm giữa biểu bì và mô mỡ dưới da được cấu tạo bởi lớp nhú và lớp trung bì lưới, và mô liên kết dạng sợi. Collagen chiếm khoảng 70% trung bì, và ngoài ra trung bì được cấu tạo bởi thành phần chất nền ngoại bào như sợi đàn hồi (elastin) và hyaluronan. Collagen, elastin, hyaluronan, và thành phần tương tự cấu thành trung bì được tạo ra bởi nguyên bào sợi ở da có mặt ở lớp trung bì lưới.

Các sợi này bị phá hủy và trở nên già cỗi do tia UV, khô, tăng tuổi tác và tương tự do đó khiến độ đàn hồi của chúng giảm và cũng khiến chức năng sản xuất của thành phần chất nền ngoại bào giảm, thường được coi là nguyên nhân gây lão hóa da như giảm độ săn chắc và độ đàn hồi của da, nhăn và chảy xệ. Vì vậy, việc giảm thành phần chất nền ngoại bào ở trung bì, cụ thể là collagen và hyaluronan, có liên quan đến quá trình lão hóa như giảm độ đàn hồi da và tạo nếp nhăn.

Do đó, sự lão hóa da được cho rằng có thể được ngăn ngừa hoặc cải thiện khi chức năng của nguyên bào sợi ở da được hoạt hóa và việc sản xuất thành phần chất nền ngoại bào mô tả ở trên tăng. Cụ thể là, nếp nhăn được tạo ra trên mặt có tác động đáng kể đến vẻ ngoài của một người như là dấu hiệu lão hóa. Vì lý do này, nhu cầu về sản

phẩm mỹ phẩm có tác dụng ngăn ngừa hoặc cải thiện nếp nhăn (sản phẩm mỹ phẩm chống lão hóa và/hoặc chống nếp nhăn) ngày càng tăng như biện pháp đối phó để giữ lại sự trẻ trung (tài liệu không phải tài liệu sáng chế 1).

Trong bản mô tả này, axit deoxyribonucleic (ADN) đã được báo cáo là được sử dụng dưới dạng thực phẩm chức năng an toàn và hiệu quả có tác dụng cải thiện tình trạng da (độ ẩm, độ nhờn, mật độ rãnh da, nếp nhăn, đốm, tàn nhang, và các tình trạng tương tự) (tài liệu sáng chế 1, 2).

Ngoài ra, dịch chiết của hạt, mầm (phôi) hoặc chồi đậu tương giàu polyamin đã được báo cáo là có hoạt động thúc đẩy sản xuất thành phần chất nền ngoại bào như elastin, collagen, và hyaluronan mà hỗ trợ cấu trúc da (tài liệu sáng chế 3).

Tuy nhiên, theo như tác giả sáng chế biết, không có báo cáo về tương tác giữa axit deoxyribonucleic (ADN) này và dịch chiết đậu tương này.

Tài liệu kỹ thuật đã biết

Tài liệu sáng chế

[Tài liệu sáng chế 1] Công bố đơn xin cấp bằng sáng chế chưa xét nghiệm Nhật Bản số 2007-291062

[Tài liệu sáng chế 2] Công bố đơn xin cấp bằng sáng chế chưa xét nghiệm Nhật Bản số 2008-63315

[Tài liệu sáng chế 3] Công bố đơn xin cấp bằng sáng chế chưa xét nghiệm Nhật Bản số 2012-46544

Tài liệu không phải là tài liệu sáng chế

[Tài liệu không phải là tài liệu sáng chế 1] "Development Technology of Anti-aging, Whitening, Moisturizing Cosmetics" (ấn bản dành cho người tiêu dùng), được giám sát bởi Masato Suzuki, CMC Publishing Co., Ltd., ngày 23 tháng 8 năm 2007, Xuất bản lần thứ nhất.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề cần được giải quyết bởi sáng chế

Việc ngăn ngừa hoặc cải thiện sự lão hóa da có thể được mong đợi như được mô tả ở trên khi chức năng của nguyên bào sợi ở da được hoạt hóa và sản xuất thành phần chất nền ngoại bào, cụ thể là collagen và hyaluronan, tăng. Theo đó, mục đích của sáng chế là đề xuất chất chống lão hóa da, chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa da, và sản phẩm mỹ phẩm chứa chất chống lão hóa hoặc chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa mà có tác dụng hoạt hóa tốt hơn ở nguyên bào sợi ở da và rất an toàn và có thể được sử dụng đáng tin cậy trong thời gian dài.

Phương pháp giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu sâu rộng về vấn đề trên và phát hiện ra rằng ADN phân tử lượng thấp đặc trưng và dịch chiết đậu tương, an toàn ngay cả khi được dùng trong thời gian dài, có hoạt động hoạt hóa hiệp đồng ở nguyên bào sợi ở da, tức là, tác dụng hiệp đồng (hiệu ứng đồng vận) ở hoạt động tăng sinh tế bào, hoạt động thúc đẩy sản xuất collagen, và hoạt động thúc đẩy sản xuất hyaluronan, thúc đẩy hiệp đồng biểu hiện gen liên quan đến tổng hợp hyaluronan, và cũng giảm biểu hiện gen liên quan đến phân hủy hyaluronan. Sáng chế đã được thực hiện dựa trên các phát hiện này. Cụ thể hơn, sáng chế là như sau.

(1) Chất chống lão hóa da chứa: ADN phân tử lượng thấp đặc trưng; và dịch chiết đậu tương, làm thành phần hoạt tính, trong đó ADN phân tử lượng thấp đặc trưng này là sản phẩm thủy phân của ADN được chiết từ động vật hoặc thực vật, và dịch chiết đậu tương là dịch chiết của ít nhất một trong số được chọn từ nhóm bao gồm hạt, mầm, và chồi đậu tương.

(2) Chất chống lão hóa da theo mục (1), trong đó sự chống lão hóa là hoạt hóa chức năng của nguyên bào sợi ở da, và hoạt hóa chức năng là ít nhất một hoạt động được chọn từ nhóm bao gồm hoạt động thúc đẩy tăng sinh, hoạt động thúc đẩy sản xuất collagen loại I, và hoạt động thúc đẩy sản xuất hyaluronan ở nguyên bào sợi ở da.

(3) Chất chống lão hóa da theo mục (1) hoặc (2), trong đó hàm lượng của ADN phân tử lượng thấp đặc trưng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1% khối lượng và hàm lượng của dịch chiết đậu tương nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1% khối lượng.

(4) Chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa da chứa: ADN phân tử lượng thấp đặc trưng; và dịch chiết đậu tương, làm thành phần hoạt tính, trong đó ADN phân tử lượng thấp đặc trưng này là sản phẩm thủy phân của ADN được chiết từ động vật hoặc thực vật, và dịch chiết đậu tương là dịch chiết của ít nhất một trong số được chọn từ nhóm bao gồm hạt, mầm, và chồi đậu tương.

(5) Chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa da theo mục (4), trong đó sự điều hòa biểu hiện gen liên quan đến chống lão hóa là thúc đẩy biểu hiện của ít nhất một gen được chọn từ nhóm bao gồm gen Collagen loại I Alpha 1 của người, gen hyaluronan synthaza 1 của người, và gen hyaluronan synthaza 2 của người, hoặc giảm biểu hiện gen của gen metalloproteinaza nền 1 của người và/hoặc gen hyaluronidaza 1 của người.

(6) Chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa da theo mục (4) hoặc (5), trong đó hàm lượng của ADN phân tử lượng thấp đặc trưng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1% khối lượng và hàm lượng của dịch chiết đậu tương nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1% khối lượng.

(7) Sản phẩm mỹ phẩm chứa chất chống lão hóa da theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3), hoặc chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa da theo mục bất kỳ trong số các mục từ (4) đến (6).

Hiệu quả của sáng chế

Theo sáng chế, ADN phân tử lượng thấp đặc trưng và dịch chiết đậu tương, là thành phần hoạt tính, có hoạt động hoạt hóa hiệp đồng ở nguyên bào sợi ở da và do đó được kỳ vọng là ngăn chặn hoặc cải thiện lão hóa da như giảm độ săn chắc của da và độ đàn hồi, nhăn và chảy xệ.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig. 1 thể hiện kết quả phân tích bằng sắc ký thẩm thấu gel (GPC) trên ADN-Na thủy phân được sử dụng ở phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Fig. 1 được vẽ đồ thị với thời gian lưu (phút) là trục hoành và độ hấp thụ ở vùng UV (bước sóng 260nm) là trục tung.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương án thực hiện sáng chế sẽ được mô tả dưới đây, nhưng phần mô tả sau đây chỉ là ví dụ về phương án thực hiện sáng chế, và sáng chế không bị giới hạn ở nội dung được mô tả sau đây. Lưu ý rằng khithuật ngữ "đến" được sử dụng trong phần mô tả, thì thuật ngữ này cần được sử dụng để bao gồm giá trị số hoặc giá trị thuộc tính vật lý trước và sau thuật ngữ này. Ngoài ra, hàm lượng (%) của thành phần hoạt tính là phần trăm khối lượng (wt%) trừ khi có quy định khác.

Chất chống lão hóa da theo sáng chế chứa: ADN phân tử lượng thấp đặc trưng; và dịch chiết đậu tương, làm thành phần hoạt tính, trong đó ADN phân tử lượng thấp đặc trưng này là thành phần mà có thể được chuẩn bị bằng cách thủy phân ADN được chiết từ động vật hoặc thực vật và dịch chiết đậu tương là ít nhất một dịch chiết được chọn từ nhóm bao gồm hạt, mầm, và chồi đậu tương.

Trong bản mô tả này, sự chống lão hóa da có nghĩa là hoạt hóa chức năng của nguyên bào sợi ở da, và hoạt hóa chức năng có nghĩa là ít nhất một hoạt động được chọn từ nhóm bao gồm hoạt động thúc đẩy tăng sinh, hoạt động thúc đẩy sản xuất collagen loại I, và hoạt động thúc đẩy sản xuất hyaluronan ở nguyên bào sợi ở da.

Ngoài ra, chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa da theo sáng chế chứa: ADN phân tử lượng thấp đặc trưng; và dịch chiết đậu tương, làm thành phần hoạt tính, trong đó ADN phân tử lượng thấp đặc trưng này là thành phần mà có thể được chuẩn bị bằng cách thủy phân ADN được chiết từ động vật hoặc thực vật và dịch chiết đậu tương là ít nhất một dịch chiết được chọn từ nhóm bao gồm hạt, mầm, và chồi đậu tương.

Trong bản mô tả này, theo sáng chế, gen liên quan đến chống lão hóa da có nghĩa là gen mã hóa bất kỳ enzym nào liên quan đến tổng hợp hoặc phân hủy collagen hoặc hyaluronan ở nguyên bào sợi ở da được mô tả dưới đây.

- Gen collagen loại 1 alpha 1 (COL1A1) của người
- Gen metalloproteinase 1 (MMP1) của người
- Gen hyaluronan synthase 1 (HAS1) của người
- Gen hyaluronan synthase 2 (HAS2) của người
- Gen hyaluronidase 1 (HYAL1) của người

Thêm vào đó, sự điều hòa biểu hiện gen có nghĩa là thúc đẩy biểu hiện (tăng mức biểu hiện) của gen synthase và/hoặc giảm biểu hiện (giảm mức biểu hiện) của gen enzym phân hủy được mô tả ở trên. Việc điều hòa biểu hiện gen liên quan đến chống lão hóa da này tốt hơn là có nghĩa là thúc đẩy biểu hiện của ít nhất một gen được chọn từ nhóm bao gồm gen collagen loại 1 alpha 1 của (COL1A1) của người, gen hyaluronan synthase 1 (HAS1) của người, và gen hyaluronan synthase 2 (HAS2) của người, hoặc giảm biểu hiện gen của gen metalloproteinase 1 (MMP1) của người và/hoặc gen hyaluronidase 1 (HYAL1) của người.

Ngoài ra, sự hoạt hóa chức năng của nguyên bào sợi ở da được mô tả ở trên có thể là thúc đẩy biểu hiện gen được mô tả ở trên hoặc giảm biểu hiện gen được mô tả ở trên ở nguyên bào sợi ở da.

Chất chống lão hóa da hoặc chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa da theo sáng chế chứa ADN phân tử lượng thấp đặc trưng và dịch chiết đậu tương làm thành phần hoạt tính, và có thể còn chứa các thành phần tùy ý khác khi cần.

ADN phân tử lượng thấp đặc trưng theo sáng chế là thành phần mà có thể được chuẩn bị bằng cách thủy phân ADN được chiết từ động vật hoặc thực vật. Nguồn cấp ADN có thể là các sinh vật khác nhau như động vật, thực vật, và vi sinh vật, và ADN

tổng hợp cũng có thể được sử dụng như ADN. Trong số này, cụ thể là tốt hơn nếu sử dụng ADN có nguồn gốc từ tinh hoàn (tinh dịch cá) của cá như cá hồi, cá hồi nước ngọt và cá tuyết từ quan điểm chứa giàu ADN và sử dụng hiệu quả chất thải từ hải sản đã xử lý.

Quá trình chiết và tinh chế ADN từ tinh hoàn cá có thể tiến hành bằng phương pháp thông thường (ví dụ, theo phần mô tả ở công bố đơn xin cấp bằng sáng chế chưa xét nghiệm Nhật Bản số 2005-245394). Ví dụ, tinh hoàn cá đại khái được đâm, tinh hoàn cá đã đâm được xử lý bằng enzym phân hủy protein (protease) trong điều kiện mà ADN không bị phân hủy và rượu (rượu metanol, etanol, isopropyl hoặc các rượu tương tự) được thêm vào dung dịch được xử lý bằng enzym để kết tủa ADN ở dạng muối ADN (ADN muối natri) và thu gom kết tủa. Ngoài ra, axit (axit clohydric, axit phosphoric, axit xitric hoặc các axit tương tự) được thêm vào dung dịch được xử lý bằng enzym để kết tủa ADN, và kết tủa được thu gom, trung hòa bằng natri hydroxit và sấy khô để thu được muối ADN (muối natri ADN).

Muối ADN thu được được thủy phân bằng cách sử dụng enzym nucleolytic như nucleaza để thu được ADN phân tử lượng thấp đặc trưng. Đối với nucleaza được sử dụng để xử lý thủy phân, ví dụ, nucleaza có nguồn gốc từ *Penicillium* có thể được sử dụng.

Quá trình thủy phân có thể được tiến hành bằng cách, ví dụ, nạp muối ADN trên (muối natri ADN) làm nguyên liệu thô vào nước ấm được điều chỉnh đến nhiệt độ khoảng 65°C, sau khi khuấy, gia nhiệt thêm đến nhiệt độ 70°C, và thêm nucleaza để tạo ra phản ứng. Nhiệt độ tại thời điểm xử lý thủy phân tốt hơn là nằm trong khoảng từ 60 đến 75°C, tốt hơn nữa là 70°C.

ADN phân tử lượng thấp đặc trưng ở dạng bột có thể thu được bằng cách, ví dụ, đông khô sản phẩm thủy phân thu được. ADN phân tử lượng thấp đặc trưng thường có thể thu được ở trạng thái muối natri theo kỹ thuật ở trên. Lưu ý rằng muối không bị giới hạn ở muối natri, và có thể là, ví dụ, muối kali hoặc muối canxi. Ngoài ra, ADN phân tử lượng thấp đặc trưng có thể ở dạng tự do thay vì dạng muối.

ADN phân tử lượng thấp đặc trưng tốt hơn là chứa từ 10 đến 80% phân đoạn có khối lượng phân tử bằng 12000 hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là chứa từ 10 đến 80% phân đoạn có khối lượng phân tử bằng 5000 hoặc nhỏ hơn. Lưu ý rằng phân bố khối lượng phân tử có thể được đo bằng cách phân loại mẫu dựa trên khối lượng phân tử sử dụng GPC tiếp theo là xác định số lượng sử dụng máy dò UV.

Dịch chiết đậu tương theo sáng chế ít nhất là một dịch chiết được chọn từ nhóm bao gồm hạt, mầm, và chồi đậu tương. Điều kiện chiết không bị giới hạn cụ thể, nhưng phương pháp để thu được dịch chiết thực vật chứa polyamin, ví dụ, như được mô tả ở tài liệu sáng chế 3, phương pháp trong đó hạt, mầm (phôi), hoặc chồi đậu tương được nghiền trong môi trường phù hợp và được chiết trong điều kiện axit được ưu tiên. Lưu ý rằng mầm được sử dụng làm nguyên liệu thô có thể là mầm được tách từ hạt và được thu, và chồi đậu tương có thể là phần chồi thu từ hạt đậu tương nảy mầm trong điều kiện thích hợp.

Trong bản mô tả này, polyamin có nhiều ở dịch chiết đậu tương. Polyamin là thuật ngữ chung cho hydrocacbon béo mạch thẳng có hai hoặc nhiều nhóm amin bậc 1, có mặt ở nhiều vật thể sống và được biết đến là yếu tố tăng trưởng liên quan đến sự phân chia tế bào và tổng hợp protein.

Hàm lượng polyamin của dịch chiết đậu tương không bị giới hạn cụ thể nhưng tốt hơn là 0,05% hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 0,1% hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn là 0,15% hoặc nhiều hơn, và cụ thể tốt hơn là 0,2% hoặc nhiều hơn. Lưu ý rằng hàm lượng polyamin có thể đo được bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Polyamin (putresxin, cadaverin, spermidin, spermin, và các polyamin tương tự) có nhiều ở dịch chiết đậu tương, đặc biệt là dịch chiết của phần chồi đậu tương (sau đây, đôi khi được gọi là "dịch chiết chồi đậu tương") (tài liệu sáng chế 3). Khi dịch chiết chồi đậu tương giàu polyamin được sử dụng, tác dụng mà polyamin mang lại có thể đáng kỳ vọng.

Sản phẩm công nghiệp có thể được sử dụng làm dịch chiết đậu tương. Cụ thể là, ví dụ bao gồm dịch chiết chồi đậu tương (PHYTOPOLYAMINE (nhãn hiệu đã đăng ký)-S (số sản phẩm: SPA-301) và PHYTOPOLYAMINE-SP (số sản phẩm: SPA-308)) được sản xuất bởi TOYOBO CO., LTD. và nguyên liệu dịch chiết đậu tương (SOYPOLYA (nhãn hiệu đã đăng ký)) được sản xuất bởi Combi Corp. Ltd.

Hàm lượng của thành phần hoạt tính trong chất chống lão hóa thay đổi tùy thuộc vào loại và dạng chế phẩm, mục đích sử dụng, tần suất sử dụng, và vì vậy khó thiết lập hàm lượng cố định nhưng hàm lượng và tỷ lệ hàm lượng của mỗi thành phần tốt hơn là hàm lượng và tỷ lệ hàm lượng mà tạo ra tác dụng hiệp đồng lên các hoạt động hoạt hóa ở nguyên bào sợi ở da.

Ví dụ, khi dùng chất chống lão hóa cho da (chất chống lão hóa là sản phẩm mỹ phẩm), thì hàm lượng là như sau. Hàm lượng của ADN phân tử lượng thấp đặc trưng tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 10 mg/mL (nằm trong khoảng từ khoảng 0,001 đến 1%), tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 5 mg/mL (nằm trong khoảng từ khoảng 0,001 đến 0,5%), và còn tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 2 mg/mL (nằm trong khoảng từ khoảng 0,001 đến 0,2%). Ngoài ra, hàm lượng của dịch chiết đậu tương tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 10 mg/mL (nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1%), tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 5 mg/mL (nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,5%), và còn tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2 mg/mL (nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,2%).

Ngoài ra, tỷ lệ hàm lượng của ADN phân tử lượng thấp đặc trưng và dịch chiết đậu tương không bị giới hạn cụ thể nhưng, về mặt tỷ lệ khối lượng, tốt hơn là ADN phân tử lượng thấp đặc trưng:dịch chiết đậu tương = từ 1:50 đến 50:1, tốt hơn nữa là từ 1:20 đến 10:1, và còn tốt hơn là từ 1:10 đến 5:1.

Ngoài ra, nồng độ polyamin của chất chống lão hóa được xác định bằng loại chế phẩm và dạng sản phẩm, mục đích sử dụng, tần suất sử dụng, và tương tự và không bị giới hạn cụ thể nhưng thường thích hợp nằm trong khoảng từ 0,00001 đến 100 mM, tốt

hơn là nằm trong khoảng từ 0,00005 đến 75 mM, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 50 mM.

Khi hàm lượng và tỷ lệ hàm lượng của ADN phân tử lượng thấp đặc trưng và dịch chiết đậu tương nằm trong khoảng ưu tiên, có lợi thế về khía cạnh tạo ra tác dụng hiệp đồng hoặc tác dụng đáng kể lên các hoạt động hoạt hóa (tăng sinh tế bào, thúc đẩy sản xuất collagen, thúc đẩy sản xuất hyaluronan, thúc đẩy biểu hiện gen hyaluronan synthaza, giảm biểu hiện gen enzym phân hủy hyaluronan) ở nguyên bào sợi ở da như được mô tả cụ thể ở phần Ví dụ thực hiện sáng chế sẽ được mô tả sau đây.

Trong bản mô tả này, tác dụng hiệp đồng lên các hoạt động hoạt hóa ở nguyên bào sợi ở da có nghĩa là khi ADN phân tử lượng thấp đặc trưng và dịch chiết đậu tương được sử dụng đồng thời cho nguyên bào sợi ở da, thì tỷ lệ tăng sinh tế bào, tỷ lệ sản xuất collagen, hoặc tỷ lệ sản xuất hyaluronan lớn hơn (lớn hơn đáng kể) so với tổng các mức độ khi mỗi thành phần được sử dụng độc lập, hoặc khi ADN phân tử lượng thấp đặc trưng và dịch chiết đậu tương được sử dụng đồng thời cho nguyên bào sợi ở da, thì mức biểu hiện của collagen hoặc gen hyaluronan synthaza, tốt hơn là mức biểu hiện của gen hyaluronan synthaza, hoặc mức giảm biểu hiện của collagen hoặc gen enzym phân hủy hyaluronan, tốt hơn là mức giảm biểu hiện của enzym phân hủy hyaluronan, lớn hơn (lớn hơn đáng kể) so với tổng các mức độ khi mỗi thành phần được sử dụng độc lập. Ngoài ra, tác dụng đáng kể có nghĩa là tác dụng có sự khác biệt đáng kể khi so sánh với đối chứng âm.

Chất chống lão hóa hoặc chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa theo sáng chế có thể được sản xuất thành dạng liều lượng dự định bằng cách trộn ADN phân tử lượng thấp đặc trưng và dịch chiết đậu tương, và các thành phần khác nếu cần bằng phương pháp thông thường. Trong bản mô tả này, ví dụ về các thành phần khác bao gồm thành phần giống như thành phần tùy ý mà sản phẩm mỹ phẩm theo sáng chế được mô tả sau đây có thể chứa.

Sản phẩm mỹ phẩm theo sáng chế chứa chất chống lão hóa da hoặc chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa. Trong bản mô tả này, "chứa" có

nghĩa là sản phẩm mỹ phẩm có thể chứa chất mang chấp nhận được về mặt sinh lý và thành phần tùy ý như các thành phần phụ trợ khác có thể sử dụng đồng thời theo dạng sản phẩm dự định.

Sản phẩm mỹ phẩm theo sáng chế có thể được đề xuất dưới dạng, ví dụ, sản phẩm mỹ phẩm chăm sóc da hoặc sản phẩm mỹ phẩm cho tóc được sử dụng bằng cách dùng cho da đầu và tóc. Lưu ý rằng sản phẩm mỹ phẩm theo sáng chế bao gồm các loại được mỹ phẩm (quasi-drugs) ngoài sản phẩm mỹ phẩm của Pharmaceutical Affairs Law.

Khi chất chống lão hóa hoặc chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa theo sáng chế được đề xuất dưới dạng sản phẩm mỹ phẩm, dạng liều lượng có thể bào chế không bị giới hạn cụ thể miễn là có thể dùng cho da. Cụ thể là, chất chống lão hóa hoặc chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa có thể được đề xuất dưới dạng nước dưỡng, sữa dưỡng, kem, gel, thạch, tinh chất, son dưỡng môi, khăn đắp, mặt nạ, hoặc tương tự ở dạng liều lượng ở dạng lỏng, dạng nhũ tương, dạng gel, dạng kem, dạng thuốc mỡ, dạng bột, dạng sương, dạng khí dung hoặc tương tự.

Các thành phần tùy ý khác mà sản phẩm mỹ phẩm này có thể chứa không bị giới hạn cụ thể và chất phụ gia có thể được trộn trong sản phẩm mỹ phẩm thông thường có thể được sử dụng. Ví dụ về chất phụ gia bao gồm nước, chất béo và dầu, sáp, hydrocacbon, axit béo, rượu, este, chất hoạt động bề mặt, mùi hương, chất làm se, chất diệt khuẩn và/hoặc kháng khuẩn, chất làm trắng, chất hấp thụ UV, chất giữ ẩm, chất kích hoạt tế bào, chất chống viêm và/hoặc chất chống dị ứng, chất chống oxy hóa, vitamin và dịch chiết tự nhiên. Các hàm lượng của các thành phần tùy ý khác này không bị giới hạn cụ thể và có thể được chọn một cách thích hợp theo dạng liều lượng dự định, và tương tự.

Ngoài ra, chất chống lão hóa hoặc chất để điều hòa biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa theo sáng chế có thể được đề xuất dưới dạng thức ăn hoặc đồ uống được sử dụng qua đường miệng. Thức ăn và đồ uống bao gồm sản phẩm thực phẩm tốt

cho sức khỏe (ví dụ, sản phẩm thực phẩm chức năng, sản phẩm bổ sung dinh dưỡng, sản phẩm bổ sung sức khỏe, sản phẩm giàu dinh dưỡng, sản phẩm thực phẩm cân bằng dinh dưỡng, và chế phẩm bổ sung), thực phẩm có công bố về sức khỏe (ví dụ, thực phẩm để sử dụng cho sức khỏe được chỉ định, thực phẩm có công bố về chức năng dinh dưỡng, và thực phẩm có công bố về chức năng), thực phẩm dùng cho chế độ ăn uống đặc biệt (ví dụ, thực phẩm cho người bệnh, bột sữa công thức cho trẻ sơ sinh và bột sữa cho phụ nữ có thai hoặc cho con bú), và sản phẩm bổ sung được phân loại là thực phẩm và đồ uống có nhãn để giảm rủi ro, ngăn ngừa hoặc cải thiện bệnh hoặc tình trạng (triệu chứng) gây ra bởi chức năng của nguyên bào sợi ở da giảm.

Các thành phần tùy ý khác mà thực phẩm và đồ uống có thể chứa không bị giới hạn cụ thể và các chất phụ gia có thể được trộn trong thực phẩm và đồ uống thông thường có thể được sử dụng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả cụ thể hơn qua các ví dụ, nhưng phạm vi kỹ thuật của sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

[Ví dụ 1] Hoạt động tăng sinh tế bào, hoạt động thúc đẩy sản xuất collagen và hyaluronan

1. Mục đích và tổng quan về thử nghiệm

Collagen và hyaluronan trong da được coi là đóng vai trò quan trọng với sự săn chắc, mềm mại và độ ẩm của da. Do đó, tác dụng hiệp đồng của chất thử nghiệm (ADN phân tử lượng thấp đặc trưng và dịch chiết đậu tương) được đánh giá bởi hoạt động tăng sinh trên nguyên bào sợi ở da, và hoạt động thúc đẩy sản xuất collagen và hyaluronan.

2. Nguyên liệu và phương pháp thử nghiệm

2-1. Tế bào

Dòng tế bào nguyên bào sợi ở da có nguồn gốc từ trẻ sơ sinh, tế bào NB1RGB (RIKEN BRC, Japan) được sử dụng và nuôi cấy trong thiết bị ủ CO₂ (nồng độ CO₂ bằng 5%, 37°C).

2-2. Môi trường

Môi trường thiết yếu tối thiểu để cấy tế bào của Eagle (EMEM, Wako, Japan) chứa 0,1% (thể tích/thể tích) huyết thanh thai bò (FBS, Hyclone, UK) và 1,0% (thể tích/thể tích) chất chống nấm (Invitrogen, USA) được sử dụng.

2-3. Chất thử nghiệm

(1) ADN phân tử lượng thấp đặc trưng

ADN-Na thủy phân (bột) được sản xuất bởi NISSEI BIO CO., LTD. được sử dụng. Sản phẩm này được chuẩn bị, bằng phương pháp được mô tả gần đây, bằng cách chiết muối Na của ADN từ tinh hoàn (tinh dịch cá) của cá hồi.

Lưu ý rằng kết quả phân tích bằng phương pháp sắc ký thẩm thấu gel (GPC) trên ADN-Na thủy phân (được sản xuất bởi NISSEI BIO CO., LTD.) được sử dụng được thể hiện trên Fig. 1, và mối liên quan giữa thời gian lưu trữ và khối lượng phân tử được thể hiện ở bảng 1. Mốc quy chiếu khối lượng phân tử bằng 12000 dựa trên thời gian lưu trữ của sắc tố tế bào c (MW 12400).

[Bảng 1]

Thời gian lưu trữ (phút)	<17,0	17,0	20,0	22,0	25,0	30,0	34,0	41,0	>41,0
Mốc quy chiếu khối lượng phân tử (M.W)	20000 hoặc hơn	20000	12000	8000	5000	2000	1000	330	<330
Mốc quy chiếu số bazơ (mer)	>60	60	36	24	15	6	3	1	-

Theo kết quả phân tích ở trên, các phần theo khối lượng phân tử của ADN-Na thủy phân (được sản xuất bởi NISSEI BIO CO., LTD.) như sau.

Phần có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 12000 đến 5000 (thời gian rửa giải nằm trong khoảng từ 20 phút đến ít hơn 25 phút): 32,0%

Phần có khối lượng phân tử bằng 5000 hoặc nhỏ hơn (thời gian rửa giải bằng 25 phút và sau đó): 32,4%

Từ trên đây, phần có khối lượng phân tử bằng 12000 hoặc nhỏ hơn của ADN-Na thủy phân (được sản xuất bởi NISSEI BIO CO., LTD.) là 64,4%.

Chất thử nghiệm (ADN-Na thủy phân) được điều chỉnh đến nồng độ 3,0 mg/mL sử dụng axit L-ascorbic 30 μ M (CAS No. 50-81-7, Wako, Japan) và EMEM chứa FBS 0,1% được pha loãng từng bậc theo tỷ lệ thông thường là 10 và được chuẩn bị thành tổng 2 nồng độ (0,03 mg/mL, 0,3 mg/mL) khi được sử dụng (nồng độ cuối bằng 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL).

(2) Dịch chiết đậu tương

PHYTOPOLYAMINE (nhãn hiệu đã đăng ký)-SP (số sản phẩm: SPA-308, tỷ lệ trộn: khoảng 70% dịch chiết chồi đậu tương, khoảng 30% axit xitric Na) được sản xuất bởi TOYOBO CO., LTD. được sử dụng.

Chất thử nghiệm (SPA-308) với nồng độ 0,39 mg/mL, 0,81 mg/mL, và 1,53 mg/mL được chuẩn bị khi được sử dụng bằng cách sử dụng axit L-ascorbic 30 μ M (CAS No. 50-81-7, Wako, Japan) và EMEM chứa FBS 0,1% (nồng độ cuối bằng 0,13 mg/mL, 0,27 mg/mL, và 0,51 mg/mL).

(3) Dung dịch trộn (sử dụng đồng thời)

Hai loại chất thử nghiệm được mô tả ở trên được sử dụng.

ADN-Na thủy phân được điều chỉnh đến nồng độ 3,0 mg/mL sử dụng EMEM chứa SPA-308, được điều chỉnh đến nồng độ 0,81 mg/mL sử dụng axit ascorbic 30 μ M (CAS No. 50-81-7, Wako, Japan) và EMEM chứa FBS 0,1%, được pha loãng từng bậc theo tỷ lệ thông thường là 10 và được chuẩn bị thành tổng 2 nồng độ (0,03 mg/mL,

0,3 mg/mL) khi được sử dụng (nồng độ cuối của SPA-308 bằng 0,27 mg/mL và nồng độ cuối của ADN-Na thủy phân bằng 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL].

2-4. Cấu tạo thử nghiệm

Để tính toán sự tăng sinh tế bào, sản xuất collagen, và sản xuất hyaluronan, giá trị trung bình của 3 lỗ cho mỗi nhóm xử lý được sử dụng. Ngoài ra, thử nghiệm được tiến hành với mỗi nhóm bao gồm nhóm dùng chất thử nghiệm và nhóm đối chứng sử dụng cho mỗi khay. Hoạt động liên quan đến thử nghiệm bao gồm điều chế chất thử nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ phòng trừ khi có chỉ dẫn khác.

2-5. Hoạt động thử nghiệm

(1) Nuôi cấy tế bào

$2,0 \times 10^4$ tế bào/200 μ L tế bào NB1RGB trên mỗi lỗ được gieo vào khay 96 lỗ (Lot. 3595, Corning, USA) và được nuôi cấy trong thiết bị ủ CO_2 trong 24 giờ. Ngoài ra, 200 μ L dung dịch muối đệm photphat (PBS(-), Lot. 198601, Nissui, Japan) được bổ sung vào lỗ không được sử dụng để thử nghiệm để tránh làm khô trong quá trình nuôi cấy.

24 giờ sau, 100 μ L chất thử nghiệm và đối chứng âm được bổ sung vào khay 96 lỗ và được nuôi cấy trong 48 giờ trong thiết bị ủ CO_2 . Với đối chứng âm, axit L-ascorbic 30 μ M và EMEM chứa FBS 0,1% được sử dụng.

48 giờ sau, dịch nuôi cấy được phân phối vào khay 96 lỗ mới và đông khô (-20°C). Mức collagen và mức hyaluronan trong dịch nuôi cấy được đo sử dụng ELISA (xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym) được mô tả ở mục 2-5 (3) và (4) để đánh giá hoạt động thúc đẩy sản xuất collagen và hyaluronan của chất thử nghiệm. Ngoài ra, số tế bào ở khay 96 lỗ mà từ đó dịch nuôi cấy được loại bỏ được đếm bởi phương pháp được mô tả ở mục 2-5 (2) để đánh giá hoạt động tăng sinh tế bào của chất thử nghiệm.

(2) Hoạt động tăng sinh tế bào

Các tác dụng của chất thử nghiệm lên sự tăng sinh nguyên bào sợi ở da được đánh giá như sau.

Mỗi lỗ của khay 96 lỗ mà từ đó môi trường được loại bỏ được rửa nhẹ hai lần với 300 μ L PBS(-) gia nhiệt đến nhiệt độ 37°C. Tiếp theo, 100 μ L dung dịch 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromua (MTT, CAS No. 298-93-1, Sigma-Aldrich, USA) ở nồng độ 0,5 mg/mL mỗi lỗ được bổ sung vào và được nuôi cấy trong 2 giờ ở thiết bị ủ CO₂.

Sau khi hoàn thành nuôi cấy, dung dịch MTT được loại bỏ và khay được rửa bằng 200 μ L PBS(-). 200 μ L 2-propanol (CAS No. 67-63-0, Kanto Chemical, Japan) chứa axit clohydric 0,04 N (CAS No. 7647-01-0, Kanto Chemical, Japan) được bổ sung vào và được cho để yên trong 1 giờ trong điều kiện có bóng tối để hòa tan formazan không tan được tạo ra.

Khay 96 lỗ được lắc trong 10 giây ở tốc độ 270 vòng/phút để phân tán đồng nhất các sắc tố trong lỗ, và sau đó đo độ hấp thụ tại bước sóng 570 nm (OD₅₇₀) sử dụng thiết bị đọc khay vi thể (SPARK(TM) 10M, TECAN, Switzerland).

OD₅₇₀ của nhóm dùng chất thử nghiệm, với OD₅₇₀ của đối chứng âm là 100%, được tính dưới dạng tỷ lệ tăng sinh tế bào (%). Tỷ lệ tăng sinh tế bào (%) của đối chứng âm và nhóm dùng chất thử nghiệm được cho qua thử nghiệm có ý nghĩa bởi thử nghiệm hai nhóm không ghép đôi (thử nghiệm Student's t). Tất cả các thử nghiệm đều có mức có ý nghĩa nhỏ hơn 5% ở hai bên ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$).

(3) Hoạt động thúc đẩy sản xuất collagen

Các tác dụng của chất thử nghiệm lên sản xuất collagen loại I, được cho là đem lại cho làn da sự săn chắc và độ đàn hồi, được đánh giá bởi ELISA cạnh tranh như sau.

Để đo mức collagen trong dịch nuôi cấy, kit ELISA collagen loại I của người (Lot. EC1-E105, ACEL, Japan) được sử dụng.

Dung dịch chuẩn collagen được pha loãng từng bậc sử dụng dung dịch đệm pha loãng theo tỷ lệ chung là 2 để chuẩn bị tổng 7 nồng độ. Ngoài ra, dịch nuôi cấy được pha loãng hai lần bằng dung dịch đệm pha loãng.

14 μL dung dịch kháng thể collagen nhãn biotin được bổ sung vào 126 μL dung dịch chuẩn collagen và dịch nuôi cấy được pha loãng hai lần và được trộn bằng cách gõ.

Khay vi thể cố định collagen được rửa ba lần bằng 200 μL dung dịch đệm rửa, 50 μL dung dịch chuẩn chứa kháng thể collagen nhãn biotin và dịch nuôi cấy được bổ sung vào và được lắc trong 1 giờ ở tốc độ khoảng 270 vòng/phút.

1 giờ sau, khay được rửa ba lần bằng 200 μL dung dịch đệm rửa, 50 μL dung dịch avidin nhãn peroxidaza được bổ sung vào và được lắc trong 1 giờ ở tốc độ khoảng 270 vòng/phút. 1 giờ sau, khay được rửa ba lần bằng 200 μL dung dịch đệm rửa, 50 μL dung dịch chất nền 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin cho mỗi lỗ được bổ sung vào và được cho để yên trong 15 phút.

Sau đó, 50 μL dung dịch dừng cho mỗi lỗ được bổ sung vào, khay vi thể được lắc trong 1 phút ở 270 vòng/phút để đồng nhất hóa sắc tố trong lỗ, và tiếp theo đo độ hấp thụ tại bước sóng 450 nm (OD_{450}) sử dụng thiết bị đọc khay vi thể.

Đường cong hiệu chỉnh được hồi quy từ OD_{450} của dung dịch chuẩn collagen sử dụng mô hình logistic 4 tham số. Giá trị thu được từ phương trình hồi quy được nhân với tỷ lệ pha loãng để tính toán mức sản xuất collagen ($\mu\text{g/mL}$) của đối chứng âm và chất thử nghiệm.

Tỷ lệ sản xuất collagen (%) của chất thử nghiệm, với mức sản xuất collagen của đối chứng âm là 100%, được tính toán. Tỷ lệ sản xuất collagen (%) của đối chứng âm và nhóm bổ sung chất thử nghiệm được cho qua thử nghiệm có ý nghĩa bởi thử nghiệm hai nhóm không ghép đôi (thử nghiệm Student's t). Tất cả các thử nghiệm có mức có ý nghĩa nhỏ hơn 5% ở hai bên ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$).

(4) Hoạt động thúc đẩy sản xuất hyaluronan

Các tác dụng của chất thử nghiệm ở mức sản xuất hyaluronan, được cho là giữ ẩm ở collagen và elastin, được đánh giá bởi ELISA nhiều lớp như sau.

Để đo mức hyaluronan ở dịch nổi nuôi cấy, kit Hyaluronan Quantikine ELISA (Lot. DHYAL0, R&D Hệ thống, USA) được sử dụng.

Dung dịch chuẩn hyaluronan được pha loãng từng bậc sử dụng dung dịch đệm pha loãng theo tỷ lệ thông thường là 2 để chuẩn bị tổng 7 nồng độ. Ngoài ra, dịch nổi nuôi cấy được pha loãng tám lần bằng dung dịch đệm pha loãng.

50 μ L dung dịch kháng thể hyaluronan nhãn biotin cho mỗi lỗ được bổ sung vào khay vi thể cố định aggrecan. Ngoài ra, 50 μ L dịch nổi nuôi cấy đã pha loãng được bổ sung vào và lắc trong 1 giờ ở tốc độ khoảng 270 vòng/phút.

1 giờ sau, khay được rửa năm lần bằng 400 μ L dung dịch đệm rửa, 100 μ L dung dịch avidin nhãn peroxidaza được bổ sung vào và lắc trong 1 giờ ở tốc độ khoảng 270 vòng/phút. 1 giờ sau, khay được rửa năm lần bằng 400 μ L dung dịch đệm rửa, 100 μ L dung dịch chất nền 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin cho mỗi lỗ được bổ sung vào và cho để yên trong 30 phút trong điều kiện có bóng tối.

Sau đó, 100 μ L dung dịch dừng cho mỗi lỗ được bổ sung vào, khay vi thể được lắc trong 1 phút tại 270 vòng/phút để đồng nhất hóa sắc tố trong lỗ, và tiếp theo là độ hấp thụ tại 450 nm (OD_{450}) đo được sử dụng thiết bị đọc khay vi thể.

Đường cong hiệu chỉnh được hồi quy từ OD_{450} của dung dịch chuẩn hyaluronan sử dụng mô hình logistic 4-tham số. Giá trị thu được từ phương trình hồi quy được nhân với tỷ lệ pha loãng để tính toán mức sản xuất hyaluronan (ng/mL) của đối chứng âm và chất thử nghiệm.

Tỷ lệ sản xuất hyaluronan (%) của chất thử nghiệm, với mức sản xuất hyaluronan của đối chứng âm là 100%, được tính toán. Tỷ lệ sản xuất hyaluronan (%) của đối chứng âm và nhóm bổ sung chất thử nghiệm được cho qua thử nghiệm có ý nghĩa bằng thử nghiệm hai nhóm không ghép đôi (thử nghiệm Student's t). Tất cả các thử nghiệm có mức có ý nghĩa ít hơn 5% ở hai bên ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$).

3. Kết quả thử nghiệm

3-1. ADN phân tử lượng thấp đặc trưng

(1) Hoạt động tăng sinh tế bào

Tỷ lệ tăng sinh tế bào $\pm$ độ lệch chuẩn của chất thử nghiệm (ADN-Na thủy phân) ở nồng độ 0,01 mg/mL và 0,1 mg/mL lần lượt là, với mức tăng sinh tế bào (OD_{570}) của đối chứng âm bằng 100%, $101,3 \pm 6,8\%$ và $102,6 \pm 3,3\%$.

(2) Hoạt động thúc đẩy sản xuất collagen loại I

Tỷ lệ sản xuất collagen $\pm$ độ lệch chuẩn của chất thử nghiệm (ADN-Na thủy phân) ở nồng độ 0,01 mg/mL và 0,1 mg/mL lần lượt là, với mức sản xuất collagen của đối chứng âm bằng 100%, $126,4 \pm 7,9\%$ ($p < 0,01$) và $134,0 \pm 3,6\%$ ($p < 0,01$).

(3) Hoạt động thúc đẩy sản xuất hyaluronan

Tỷ lệ sản xuất hyaluronan $\pm$ độ lệch chuẩn của chất thử nghiệm (ADN-Na thủy phân) ở nồng độ 0,01 mg/mL và 0,1 mg/mL lần lượt là, với mức sản xuất hyaluronan của đối chứng âm bằng 100%, $102,2 \pm 5,0\%$ và $102,9 \pm 7,5\%$.

3-2. Dịch chiết đậu tương

(1) Hoạt động tăng sinh tế bào

Tỷ lệ tăng sinh tế bào $\pm$ độ lệch chuẩn của chất thử nghiệm (SPA-308) ở nồng độ 0,13 mg/mL, 0,27 mg/mL, và 0,51 mg/mL lần lượt là, với mức tăng sinh tế bào (OD_{570}) của đối chứng âm bằng 100%, $111,6 \pm 1,0\%$ ($p < 0,01$), $123,7 \pm 2,4\%$ ($p < 0,01$), và $137,0 \pm 6,9\%$ ($p < 0,01$).

(2) Hoạt động thúc đẩy sản xuất collagen loại I

Tỷ lệ thúc đẩy sản xuất collagen $\pm$ độ lệch chuẩn của chất thử nghiệm (SPA-308) ở nồng độ 0,13 mg/mL, 0,27 mg/mL, và 0,51 mg/mL lần lượt là, với hoạt động thúc đẩy sản xuất collagen của đối chứng âm bằng 100%, $135,1 \pm 1,3\%$ ($p < 0,01$), $174,1 \pm 6,3\%$ ($p < 0,01$), và $199,9 \pm 11,8\%$ ($p < 0,01$).

(3) Hoạt động thúc đẩy sản xuất hyaluronan

Tỷ lệ sản xuất hyaluronan $\pm$ độ lệch chuẩn của chất thử nghiệm (SPA-308) 0,13 mg/mL, 0,27 mg/mL, và 0,51 mg/mL lần lượt là, với mức sản xuất hyaluronan của đối chứng âm bằng 100%, $113,1 \pm 4,7\%$ ($p < 0,01$), $123,3 \pm 3,8\%$ ($p < 0,01$), và $137,8 \pm 10,3\%$ ($p < 0,01$).

3-3. Sử dụng đồng thời ADN phân tử lượng thấp đặc trưng và dịch chiết đậu tương

(1) Hoạt động tăng sinh tế bào

Tỷ lệ tăng sinh tế bào $\pm$ độ lệch chuẩn của chất thử nghiệm (ADN-Na thủy phân + SPA-308) ở nồng độ 0,01 mg/mL + 0,27 mg/mL và 0,1 mg/mL + 0,27 mg/mL lần lượt là, với mức tăng sinh tế bào (OD_{570}) của đối chứng âm bằng 100%, $133,0 \pm 4,8\%$ ($p < 0,01$) và $140,8 \pm 5,7\%$ ($p < 0,01$).

(2) Hoạt động thúc đẩy sản xuất collagen loại I

Tỷ lệ sản xuất collagen $\pm$ độ lệch chuẩn của chất thử nghiệm (ADN-Na thủy phân + SPA-308) ở nồng độ 0,01 mg/mL + 0,27 mg/mL và 0,1 mg/mL + 0,27 mg/mL lần lượt là, với mức sản xuất collagen của đối chứng âm bằng 100%, $178,1 \pm 5,5\%$ ($p < 0,01$) và $230,6 \pm 9,9\%$ ($p < 0,01$).

(3) Hoạt động thúc đẩy sản xuất hyaluronan

Tỷ lệ sản xuất hyaluronan $\pm$ độ lệch chuẩn của chất thử nghiệm (ADN-Na thủy phân + SPA-308) ở nồng độ 0,01 mg/mL + 0,27 mg/mL và 0,1 mg/mL + 0,27 mg/mL lần lượt là, với mức sản xuất hyaluronan của đối chứng âm bằng 100%, $132,7 \pm 7,6\%$ ($p < 0,01$) và $139,8 \pm 2,9\%$ ($p < 0,01$).

Kết quả trên được thể hiện ở bảng 2. Trong bảng 2, "ADN-Na" là "ADN-Na thủy phân". Bảng 2 tiết lộ rằng tỷ lệ tăng sinh tế bào, tỷ lệ sản xuất collagen, và tỷ lệ sản xuất hyaluronan khi ADN phân tử lượng thấp đặc trưng (ADN-Na thủy phân) và dịch chiết đậu tương (SPA-308) được sử dụng đồng thời lớn hơn đáng kể so với tổng mức độ (tỷ lệ) khi mỗi thành phần được sử dụng độc lập. Kết quả này có thể xác nhận tác dụng hiệp đồng của ADN phân tử lượng thấp đặc trưng và dịch chiết đậu tương lên

hoạt động hoạt hóa về chức năng của nguyên bào sợi ở da (hoạt động tăng sinh tế bào, hoạt động thúc đẩy sản xuất collagen, và hoạt động thúc đẩy sản xuất hyaluronan).

[Bảng 2]

Chất thử nghiệm	Nồng độ	Tỷ lệ tăng sinh tế bào (%)	Tỷ lệ sản xuất collagen (%)	Tỷ lệ sản xuất hyaluronan (%)
ADN-Na	0,01 mg/mL	101,3±6,8	126,4±7,9**	102,2±5,0
	0,1 mg/mL	102,6±3,3	134,0±3,6**	102,9±7,5
SPA-308	0,13 mg/mL	111,6±1,0**	135,1±1,3**	113,1±4,7**
	0,27 mg/mL	123,7±2,4**	174,1±6,3**	123,3±3,8**
	0,51 mg/mL	137,0±6,9**	199,9±11,8**	137,8±10,3**
ADN-Na SPA-308 (Sử dụng đồng thời)	0,01 mg/mL	133,0±4,8**	178,1±5,5**	132,7±7,6**
	0,27 mg/mL			
	0,1 mg/mL 0,27 mg/mL	140,8±5,7**	230,6±9,9**	139,8±2,9**

n=3, **P<0,01

(Sử dụng đồng thời) Nồng độ; Dòng trên: ADN-Na, Dòng dưới: SPA-308

[Ví dụ 2] Điều hòa biểu hiện gen enzym phân hủy hoặc hyaluronan synthaza

1. Mục đích và tổng quan về thử nghiệm

Collagen và hyaluronan trong da đóng vai trò quan trọng đối với sự săn chắc, mềm mại và độ ẩm của da, và được biết rằng việc giảm mức hyaluronan ở trung bì có liên quan đặc biệt đến việc giảm độ đàn hồi da và tạo nếp nhăn. Do đó, ở ví dụ này, tác dụng của chất thử nghiệm (ADN phân tử lượng thấp đặc trưng và dịch chiết đậu tương) lên biểu hiện của gen liên quan đến chống lão hóa như tổng hợp và phân hủy hyaluronan ở nguyên bào sợi ở da được đánh giá bằng phương pháp PCR thời gian thực.

2. Nguyên liệu và phương pháp thử nghiệm

2-1. Tế bào

Các tế bào giống như ở mục 2-1 của ví dụ 1 được nuôi cấy trong cùng điều kiện và được sử dụng.

2-2. Môi trường

Môi trường (EMEM) có thành phần giống như ở mục 2-2 của ví dụ 1 được sử dụng, ngoại trừ hàm lượng FBS (huyết thanh thai bò) được đổi thành 10,0% (thể tích/thể tích).

2-3. Chất thử nghiệm

(1) Dung dịch ADN phân tử lượng thấp đặc trưng

ADN phân tử lượng thấp đặc trưng (ADN-Na thủy phân) giống như ở mục 2-3 (1) của ví dụ 1 được sử dụng.

Chất thử nghiệm (ADN-Na thủy phân) được điều chỉnh đến nồng độ 1 mg/mL sử dụng EMEM chứa FBS 10% được pha loãng từng bậc theo tỷ lệ thông thường là 10 để chuẩn bị tổng 2 nồng độ khi được sử dụng (nồng độ cuối bằng 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL).

(2) Dung dịch chiết đậu tương

Dịch chiết đậu tương (SPA-308) giống như ở mục 2-3 (2) của ví dụ 1 được sử dụng.

Chất thử nghiệm (SPA-308) được điều chỉnh đến nồng độ 2,7 mg/mL sử dụng EMEM chứa FBS 10% được pha loãng từng bậc theo tỷ lệ thông thường là 10 để chuẩn bị tổng 2 nồng độ khi được sử dụng (nồng độ cuối bằng 0,027 mg/mL, 0,27 mg/mL).

(3) Dung dịch trộn (sử dụng đồng thời)

Hai chất thử nghiệm được mô tả ở trên được sử dụng.

ADN-Na thủy phân được điều chỉnh đến nồng độ 1 mg/mL sử dụng EMEM chứa SPA-308 được điều chỉnh đến nồng độ 0,27 mg/mL sử dụng EMEM chứa FBS 10% được pha loãng từng bậc theo tỷ lệ thông thường là 10 để chuẩn bị tổng 2 nồng

độ khi được sử dụng (nồng độ cuối của SPA-308 bằng 0,27 mg/mL, nồng độ cuối của ADN-Na thủy phân bằng 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL).

2-4. Phân tích biểu hiện gen

Việc phân tích biểu hiện của gen mã hóa các enzym sau đây được tiến hành sử dụng thử nghiệm TaqMan (Applied Biosystems, USA).

- Hyaluronan synthaza 1 (HAS1) của người, ID thử nghiệm Hs00758053_m1
- Hyaluronan synthaza 2 (HAS2) của người, ID thử nghiệm Hs00193435_m1
- Hyaluronidaza 1 (HYAL1) của người, ID thử nghiệm Hs00201046_m1

Gen Glyxeraldehyt-3-PhosphatDehydrogenaza (GAPDH, ID thử nghiệm Hs02786624_g1) của người được sử dụng làm gen nội chuẩn.

2-5. Cấu tạo thử nghiệm

Để phân tích mức biểu hiện gen, giá trị trung bình của 3 tập hợp đĩa 35-mm (Cat No. 150318, Thermo Scientific, USA) với mỗi nhóm xử lý được sử dụng. Các hoạt động liên quan đến thử nghiệm bao gồm điều chế chất thử nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ phòng trừ khi có chỉ dẫn khác.

2-6. Phương pháp thử nghiệm

(1) Nuôi cấy tế bào và bổ sung chất thử nghiệm

$5,0 \times 10^5$ tế bào/2 mL tế bào NB1RGB được gieo vào đĩa 35-mm và được nuôi cấy trong 24 giờ ở thiết bị ủ CO₂. 24 giờ sau, môi trường ở đĩa 35-mm được loại bỏ, chất thử nghiệm và môi trường chứa đối chứng âm được bổ sung vào và nuôi cấy trong 24 giờ ở thiết bị ủ CO₂.

(2) Quá trình chiết, và tinh chế và xác định hàm lượng ARN

Quá trình chiết và tinh chế ARN được tiến hành như sau, sử dụng kit Mini ARN PureLink(TM) (Cat No. 12183018A, Invitrogen, USA).

Sau 24 giờ nuôi cấy, đĩa 35-mm mà từ đó môi trường được loại bỏ được rửa hai lần với 2 mL PBS(-) được gia nhiệt đến nhiệt độ 37°C. 600 μ L dung dịch đệm phân giải chứa dithiothreitol (CAS No. 27565-41-9, Invitrogen, USA) được bổ sung vào đĩa này để hòa tan tế bào và dịch tiêu được thu. Ngoài ra, tế bào ở dịch tiêu đã thu được nghiền sử dụng máy đồng hóa (Cat No. 12183-026, Invitrogen, USA).

600 μ L dung dịch etanol 70% (CAS No. 64-17-5, Japan Alcohol, Japan) được bổ sung vào dịch lỏng nghiền tế bào, sau đó dịch lỏng này được chuyển đến cột gốc màng silic oxit, tiếp theo là được ly tâm trong 15 giây ở tốc độ $12000 \times g$ tại nhiệt độ phòng, và dịch lọc được loại bỏ.

700 μ L dung dịch đệm rửa chứa guanidin isothiocyanat và 500 μ L dung dịch đệm rửa II chứa etanol được bổ sung vào màng silic oxit để rửa, tiếp theo là được ly tâm trong 15 giây ở tốc độ $12000 \times g$ tại nhiệt độ phòng, và được sấy khô. 30 μ L nước không chứa RNase được bổ sung vào màng và cho để yên trong 1 phút tại nhiệt độ phòng, và sau đó màng được ly tâm trong 15 giây ở tốc độ $12000 \times g$ tại nhiệt độ phòng. Quy trình này được lặp lại hai lần để rửa giải ARN khỏi màng.

Một phần của ARN rửa giải được thu riêng vào khay 96 lỗ có thể lọt UV (Cat No. 8404, Thermo Scientific, USA) và được pha loãng 25 lần sử dụng dung dịch đệm Tris-EDTA (TE (pH 8,0), Cat No. 310-90023, NIPPON GENE, Japan) để đo độ hấp thụ ở bước sóng 260nm (OD_{260}) sử dụng thiết bị đọc khay vi thể (SPARK(TM) 10M TECAN, Switzerland).

Nồng độ ARN của đối chứng âm và chất thử nghiệm được tính toán sử dụng OD_{260} theo công thức sau và được pha loãng sử dụng dung dịch đệm TE để điều chỉnh nồng độ ARN đến 10 μ g/mL.

Nồng độ ARN (μ g/mL) = $A \times K \times 0,3$ (độ dài đường ánh sáng: cm) $\times 25$ (tỷ lệ pha loãng)

A: OD_{260} của đối chứng âm hoặc chất thử nghiệm

K: K = 40, hệ số hấp thụ của ARN

(3) Phân tích biểu hiện gen bằng phương pháp PCR thời gian thực

Quá trình phiên mã ngược ARN được tiến hành như sau sử dụng SuperScript(TM) IV VILO(TM) Master Mix với ezDNaza (Cat No. 11766050, Invitrogen, USA).

1 μ L dung dịch đệm $10 \times$ ezDNaza, 1 μ L enzym ezDNaza, 6 μ L nước không có nucleaza, và 2 μ L ARN 10 μ g/mL với mỗi lỗ được bổ sung vào dải 8 ống (AB1182, Thermo Scientific, USA) và ủ trong 2 phút tại nhiệt độ 37°C. 2 phút sau, 4 μ L SuperScript(TM) IV VILO(TM) Master Mix và 6 μ L nước không có nucleaza với mỗi lỗ được bổ sung vào dải 8 ống và được gia nhiệt trong 10 phút tại nhiệt độ 25°C, 10 phút tại nhiệt độ 50°C, và 5 phút tại nhiệt độ 85°C để tổng hợp cADN sử dụng PCR thời gian thực (QuantStudio(TM)3, Applied Biosystems, USA).

10 μ L TaqMan(TM) Fast Advanced Master Mix (Cat No. 4444557, Applied Biosystems, USA), 1 μ L TaqMan Gene Expressor, 7 μ L nước cất UltraPure(TM) (Invitrogen, Cat No. 10977-015, USA), và 2 μ L cADN với mỗi lỗ được bổ sung vào khay PCR (Cat No. N8010560, Thermo Scientific, USA) và khay được bịt kín sử dụng miếng dán khay (Cat No. 4360954, Thermo Scientific, USA).

Dung dịch được quay giảm tốc sử dụng máy ly tâm khay, bọt được loại bỏ, và sau đó qPCR thời gian thực được tiến hành sử dụng hệ thống PCR thời gian thực để tính giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct), là số chu kỳ tại đó tín hiệu huỳnh quang của từng gen của đối chứng âm và chất thử nghiệm vượt qua mọi ngưỡng. Giá trị Ct được sửa thành giá trị Δ Ct sử dụng gen nội chuẩn. Giá trị Δ Ct được sửa thành giá trị $\Delta\Delta$ Ct sử dụng trung bình các giá trị Δ Ct của đối chứng âm. Giả sử rằng sự khác biệt của phát hiện trên mỗi chu kỳ bằng phương pháp $\Delta\Delta$ Ct là khác biệt hai lần về thể tích, mức biểu hiện gen của chất thử nghiệm được phân tích bằng cách gán cho $2^{-\Delta\Delta Ct}$ khi mức biểu hiện gen của đối chứng âm là 1. Mức biểu hiện gen của đối chứng âm và nhóm bổ sung chất thử nghiệm được cho qua thử nghiệm có ý nghĩa bằng thử nghiệm hai nhóm ghép đôi (thử nghiệm t ghép đôi). Tất cả các thử nghiệm có mức có ý nghĩa ít hơn 5% ở hai bên ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$).

3. Kết quả thử nghiệm

3-1. ADN phân tử lượng thấp đặc trưng

(1) Biểu hiện gen hyaluronan synthaza 1 (HAS1) của người

Mức biểu hiện HAS1 $\pm$ độ lệch chuẩn của chất thử nghiệm (ADN-Na thủy phân) ở nồng độ 0,01 mg/mL và 0,1 mg/mL lần lượt là, với mức biểu hiện HAS1 của đối chứng âm bằng 1, $1,11 \pm 0,04$ và $1,02 \pm 0,07$.

(2) Biểu hiện gen hyaluronan synthaza 2 (HAS2) của người

Mức biểu hiện HAS2 $\pm$ độ lệch chuẩn của chất thử nghiệm (ADN-Na thủy phân) ở nồng độ 0,01 mg/mL và 0,1 mg/mL lần lượt là, với mức biểu hiện HAS2 của đối chứng âm bằng 1, $1,25 \pm 0,09$ ($p < 0,05$) và $1,49 \pm 0,05$ ($p < 0,001$).

(3) Biểu hiện gen hyaluronidaza 1 (HYAL1) của người

Mức biểu hiện HYAL1 $\pm$ độ lệch chuẩn của chất thử nghiệm (ADN-Na thủy phân) ở nồng độ 0,01 mg/mL và 0,1 mg/mL lần lượt là, với mức biểu hiện HYAL1 của đối chứng âm bằng 1, $1,06 \pm 0,12$ và $1,34 \pm 0,14$.

3-2. Dịch chiết đậu tương

(1) Biểu hiện gen hyaluronan synthaza 1 (HAS1) của người

Mức biểu hiện HAS1 $\pm$ độ lệch chuẩn của chất thử nghiệm (SPA-308) ở nồng độ 0,027 mg/mL và 0,27 mg/mL lần lượt là, với mức biểu hiện HAS1 của đối chứng âm bằng 1, $1,03 \pm 1,2$ và $0,99 \pm 0,16$.

(2) Biểu hiện gen hyaluronan synthaza 2 (HAS2) của người

Mức biểu hiện HAS2 $\pm$ độ lệch chuẩn của chất thử nghiệm (SPA-308) ở nồng độ 0,027 mg/mL và 0,27 mg/mL lần lượt là, với mức biểu hiện HAS2 của đối chứng âm bằng 1, $1,88 \pm 0,46$ ($p < 0,05$) và $1,50 \pm 0,11$ ($p < 0,01$).

(3) Biểu hiện gen hyaluronidaza 1 (HYAL1) của người

Mức biểu hiện HYAL1 $\pm$ độ lệch chuẩn của chất thử nghiệm (SPA-308) ở nồng độ 0,027 mg/mL và 0,27 mg/mL lần lượt là, với mức biểu hiện HYAL1 của đối chứng âm bằng 1, $0,97 \pm 0,08$ và $0,84 \pm 0,06$.

3-3. Sử dụng đồng thời ADN phân tử lượng thấp đặc trưng và dịch chiết đậu tương

(1) Biểu hiện gen hyaluronan synthaza 1 (HAS1) của người

Mức biểu hiện HAS1 $\pm$ độ lệch chuẩn của chất thử nghiệm (ADN-Na thủy phân + SPA-308) ở nồng độ 0,01 mg/mL + 0,27 mg/mL và 0,1 mg/mL + 0,27 mg/mL lần lượt là, với mức biểu hiện HAS1 của đối chứng âm bằng 1, $0,99 \pm 0,08$ và $1,51 \pm 0,26$ ($p < 0,05$).

(2) Biểu hiện gen hyaluronan synthaza 2 (HAS2) của người

Mức biểu hiện (HAS2) $\pm$ độ lệch chuẩn của chất thử nghiệm (ADN-Na thủy phân + SPA-308) ở nồng độ 0,01 mg/mL + 0,27 mg/mL và 0,1 mg/mL + 0,27 mg/mL lần lượt là, với mức biểu hiện (HAS2) của đối chứng âm bằng 1, $1,41 \pm 0,10$ ($p < 0,01$) và $1,54 \pm 0,07$ ($p < 0,001$).

(3) Biểu hiện gen hyaluronidaza 1 (HYAL1) của người

Mức biểu hiện (HYAL1) $\pm$ độ lệch chuẩn của chất thử nghiệm (ADN-Na thủy phân + SPA-308) ở nồng độ 0,01 mg/mL + 0,27 mg/mL và 0,1 mg/mL + 0,27 mg/mL lần lượt là, với mức biểu hiện (HYAL1) của đối chứng âm bằng 1, $0,58 \pm 0,11$ ($p < 0,01$) và $0,93 \pm 0,05$.

Kết quả được mô tả ở trên được thể hiện ở bảng 3. Trong bảng 3, "ADN-Na" là "ADN-Na thủy phân". Bảng 3 tiết lộ rằng khi ADN phân tử lượng thấp đặc trưng (ADN-Na thủy phân) và dịch chiết đậu tương (SPA-308) được sử dụng đồng thời, mức biểu hiện của gen hyaluronan synthaza-1 (HAS1) của người tăng một cách hiệp đồng và mức biểu hiện của gen hyaluronan synthaza-2 (HAS2) của người tăng đáng kể so với đối chứng âm. Ngoài ra, được tiết lộ rằng mức biểu hiện của gen hyaluronidaza 1 (HYAL1) của người giảm một cách hiệp đồng. Kết quả này có thể xác nhận rằng khi ADN phân tử lượng thấp đặc trưng (ADN-Na thủy phân) và dịch chiết đậu tương (SPA-

308) được sử dụng đồng thời, việc thúc đẩy biểu hiện của gen liên quan đến tổng hợp hyaluronan và giảm biểu hiện của gen liên quan đến phân hủy hyaluronan xảy ra đồng thời.

[Bảng 3]

Chất thử nghiệm	Nồng độ	Gen hyaluronan synthaza 1 (HAS1) của người	Gen hyaluronan synthaza 2 (HAS2) của người	Gen hyaluronidaza 1 (HYAL1) của người
ADN-Na	0,01 mg/mL	1,11±0,04	1,25±0,09*	1,06±0,12
	0,1 mg/mL	1,02±0,07	1,49±0,05***	1,34±0,14
SPA-308	0,027 mg/mL	1,03±1,2	1,88±0,46*	0,97±0,08
	0,27 mg/mL	0,99±0,16	1,50±0,11**	0,84±0,06
ADN-Na SPA-308 (Sử dụng đồng thời)	0,01 mg/mL 0,27 mg/mL	0,99±0,08	1,41±0,10**	0,58±0,11**
	0,1 mg/mL 0,27 mg/mL	1,51±0,26*	1,54±0,07***	0,93±0,05

n=3, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001

(Sử dụng đồng thời) Nồng độ; Dòng trên: ADN-Na, Dòng dưới: SPA-308

Kết quả trên gợi ý rằng việc tăng sản xuất hiệp đồng collagen và hyaluronan khi ADN phân tử lượng thấp đặc trưng (ADN-Na thủy phân) và dịch chiết đậu tương (SPA-308) được sử dụng đồng thời được thể hiện ở ví dụ 1 do sự xảy ra đồng thời của việc thúc đẩy biểu hiện của gen liên quan đến tổng hợp collagen và hyaluronan và giảm biểu hiện của gen liên quan đến sự phân hủy của chúng.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Chất chống lão hóa da theo sáng chế có các hoạt động và chức năng khác với chất chống lão hóa thông thường và có khả năng ngăn chặn và/hoặc cải thiện hiệu quả sự lão hóa da hơn chất chống lão hóa thông thường và vì vậy đặc biệt hữu ích trong lĩnh vực sản phẩm mỹ phẩm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chất để hoạt hóa chức năng của nguyên bào sợi ở da chứa:

ADN phân tử lượng thấp đặc trưng và dịch chiết đậu tương làm thành phần hoạt tính, trong đó

ADN phân tử lượng thấp đặc trưng là sản phẩm thủy phân của ADN được chiết từ tinh hoàn (tinh dịch cá) của cá, và chứa từ 10 đến 80% phân đoạn có khối lượng phân tử bằng 12000 hoặc nhỏ hơn;

dịch chiết đậu tương là dịch chiết của ít nhất một trong số được chọn từ nhóm bao gồm hạt, mầm, và chồi đậu tương; và

sự hoạt hóa chức năng là ít nhất một hoạt động được chọn từ nhóm bao gồm hoạt động thúc đẩy tăng sinh, hoạt động thúc đẩy sản xuất collagen loại I, và hoạt động thúc đẩy sản xuất hyaluronan trên nguyên bào sợi ở da.

2. Chất để hoạt hóa chức năng của nguyên bào sợi ở da theo điểm 1, trong đó hàm lượng của ADN phân tử lượng thấp đặc trưng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1% khối lượng và hàm lượng của dịch chiết đậu tương nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1% khối lượng.

3. Chất để điều hòa biểu hiện gen của nguyên bào sợi ở da chứa:

ADN phân tử lượng thấp đặc trưng và dịch chiết đậu tương làm thành phần hoạt tính, trong đó:

ADN phân tử lượng thấp đặc trưng là sản phẩm thủy phân của ADN được chiết từ tinh hoàn (tinh dịch cá) của cá, và chứa từ 10 đến 80% phân đoạn có khối lượng phân tử bằng 12000 hoặc nhỏ hơn;

dịch chiết đậu tương là dịch chiết của ít nhất một trong số được chọn từ nhóm bao gồm hạt, mầm, và chồi đậu tương; và

sự điều hòa biểu hiện gen là thúc đẩy biểu hiện gen của một hoặc cả hai gen hyaluronan synthaza 1 của người, và gen hyaluronan synthaza 2 của người của nguyên bào sợi ở da, hoặc giảm biểu hiện gen của gen hyaluronidaza 1 của người.

4. Chất để điều hòa biểu hiện gen của nguyên bào sợi ở da theo điểm 3, trong đó hàm lượng của ADN phân tử lượng thấp đặc trưng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1% khối lượng và hàm lượng của dịch chiết đậu tương nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1% khối lượng.

[Fig. 1]

