



(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)



1-0043951

**A61K 31/4164; A61K 8/49; A61P 17/18; (13) B**

A61P 39/06; A61Q 1/02; A61Q 5/12;

(51)<sup>2021.01</sup> A61Q 11/00; A61Q 17/04; A61Q 19/00;

A61Q 19/10; A61Q 5/02; A61Q 5/06;

A23L 33/10; A61Q 1/12

---

(21) 1-2022-06421

(22) 04/03/2021

(86) PCT/JP2021/008388 04/03/2021

(87) WO 2021/177397 A1 10/09/2021

(30) JP 2020-036577 04/03/2020 JP

(45) 25/03/2025 444

(43) 26/12/2022 417A

(71) Nagase & Co., Ltd. (JP)

1-17, Shinmachi 1-chome, Nishi-ku, Osaka-shi, Osaka 5508668, Japan

(72) NAKATANI, Takeshi (JP); NAKASHIMA, Nanami (JP).

(74) CÔNG TY LUẬT TNHH IP MAX (IPMAX LAW FIRM)

---

(54) CHẾ PHẨM CHỨA L-ERGOTHIONIN

(21) 1-2022-06421

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa L-ergothionin (EGT) và N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin (DTH), nó có thể ngăn chặn sự đổi màu của chế phẩm. Chế phẩm chứa EGT và DTH được bào chế trong đó hàm lượng của DTH được giảm bớt.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa L-ergothionin (EGT). Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm trong đó tính ổn định của L-ergothionin (EGT) được tăng cường khi có mặt của N,N-dimethyl-L-2-thiohistidin (DTH), và phương pháp sản xuất chế phẩm này.

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

L-ergothionin (ở đây, đôi khi được gọi là "EGT"), một loại axit amin chứa lưu huỳnh, được biết đến là có nhiều hoạt động sinh lý khác nhau bao gồm khả năng chống oxy hóa.

Ví dụ, Tài liệu phi sáng chế 1 bộc lộ rằng EGT có khả năng cải thiện hiệu quả của liệu pháp miễn dịch bằng vắc xin ung thư bao gồm kháng nguyên liên kết khối u (TAA) và chất phụ trợ. Tài liệu sáng chế 1 bộc lộ rằng EGT có khả năng điều trị các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn. Thí nghiệm 1 của Tài liệu sáng chế 1 đã xác nhận rằng EGT ở nồng độ 5 mM và 50 mM ngăn chặn sự phát triển của *Escherichia coli*. Do đó, có thể hiểu rằng việc ngăn chặn nhiễm trùng do vi khuẩn được mô tả trong Tài liệu sáng chế 1 đạt được bằng cách ức chế trực tiếp sự phát triển của vi khuẩn bởi EGT.

Tài liệu phi sáng chế 2 bộc lộ rằng việc sản xuất các cytokin (IL-6, IL-12p40, IL-1  $\beta$ , IL-10) bởi các đại thực bào có nguồn gốc từ tủy xương chuột trong điều kiện kích thích với phối tử thụ thể giống Toll được thúc đẩy bởi 10 mM EGT chứ không phải bởi 1 mM, và trong quá trình đồng nuôi cấy đại thực bào F4/80 và tế bào T OT-II CD4<sup>+</sup>, sự phân cực Th17 của tế bào T OT-II CD4<sup>+</sup> được thúc đẩy bởi EGT 30 mM. Như đã mô tả ở trên, Tài liệu phi sáng chế 2 bộc lộ rằng EGT ở nồng độ cao từ 10 mM trở lên sẽ kích hoạt các đại thực bào.

Tài liệu phi sáng chế 3 là một đánh giá về các hoạt động sinh lý của EGT. Tài

liệu phi sáng chế 3 bộc lộ rằng EGT được hấp thụ và tích lũy trong cơ thể động vật và thực vật.

Tài liệu tình trạng kỹ thuật

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: WO2019/089878

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: S. Yoshida et al., Front. Immunol. 10:671(2019)

Tài liệu phi sáng chế 2: PLoS ONE 12(1):e0169360

Tài liệu phi sáng chế 3: Bulletin of the College of Agriculture, Tamagawa University 1: 17-41 (2016)

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

Vấn đề cần được giải quyết bởi sáng chế

Tuy nhiên, độ ổn định của công thức trong các chế phẩm chứa EGT vẫn chưa được nghiên cứu kỹ lưỡng. Đặc biệt, ảnh hưởng của các thành phần khác cùng tồn tại trong các chế phẩm chứa EGT chưa được báo cáo chi tiết.

Cách thức để giải quyết vấn đề

Trước các vấn đề trên, kết quả của các nghiên cứu chuyên sâu đã nhận thấy rằng trong trường hợp chế phẩm chứa EGT trong đó N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin (DTH) cùng tồn tại, EGT bị mất ổn định, và do đó, việc đổi màu của chế phẩm chứa EGT xảy ra, cho đến nay điều này chưa được báo cáo.

Để giải quyết vấn đề mới lạ này, các nhà phát minh hiện nay đã phát hiện ra rằng trong chế phẩm chứa EGT và DTH, việc giảm hàm lượng DTH có thể tăng cường độ ổn định của EGT và ngăn chặn sự đổi màu của chế phẩm, từ đó hoàn thành sáng chế.

Đó là, sáng chế này đề xuất chế phẩm sau đây.

[1] Chế phẩm chứa L-ergothionin và N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin, trong đó

hàm lượng của N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin được giảm bớt.

[2] Chế phẩm theo [1], trong đó hàm lượng của N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin được giảm xuống do đó sự đổi màu của chế phẩm được ngăn chặn.

[3] Chế phẩm theo mục [1] hoặc [2], trong đó hàm lượng của N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin là bằng hoặc ít hơn 50 phần theo khối lượng đối với 100 phần theo khối lượng của L-ergothionin.

[4] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [3], trong đó hàm lượng của N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin là bằng hoặc nhiều hơn 0,0001 phần theo khối lượng đối với 100 phần theo khối lượng L-ergothionin .

[5] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục [1] đến [4], trong đó hàm lượng của N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin là bằng hoặc nhiều hơn 0,05 phần theo khối lượng đối với 100 phần theo khối lượng của L-ergothionin.

[6] Chế phẩm chứa L-ergothionin và N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin, trong đó hàm lượng của N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin là bằng hoặc ít hơn 50 phần theo khối lượng đối với 100 phần theo khối lượng của L-ergothionin để ức chế sự đổi màu của chế phẩm.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất sau đây.

[7] Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa L-ergothionin và N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin bị ngăn chặn sự đổi màu, phương pháp này bao gồm bước giảm hàm lượng của N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin .

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sau đây.

[8] Phương pháp để tạo tác dụng ngăn chặn sự đổi màu cho chế phẩm chứa L-ergothionin và N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin, trong đó hàm lượng của N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin là bằng hoặc ít hơn 50 phần theo khối lượng đối với 100 phần theo khối lượng của L-ergothionin.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

DTH đã được tìm thấy như một thành phần có ảnh hưởng đến sự ổn định của EGT. Theo đó, trong chế phẩm có EGT và DTH cùng tồn tại, việc giảm hàm lượng DTH có thể tăng cường độ ổn định của công thức và ngăn chặn sự đổi màu của chế phẩm.

#### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1 là các biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá độ ổn định của chế phẩm chứa EGT và DTH trong Ví dụ thử nghiệm 1.

Fig.2 là các biểu đồ thể hiện kết quả thử nghiệm ngăn chặn sự đổi màu của chế phẩm chứa EGT và DTH trong Ví dụ thử nghiệm 2.

Fig.3 là các biểu đồ thể hiện kết quả thử nghiệm ngăn chặn sự đổi màu của chế phẩm chứa EGT và DTH trong Ví dụ thử nghiệm 2.

Fig.4 là biểu đồ thể hiện kết quả của một thử nghiệm giảm DTH trong phương pháp lên men EGT trong Ví dụ thử nghiệm 3.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện kết quả của một thử nghiệm giảm DTH trong phương pháp lên men EGT trong Ví dụ thử nghiệm 3.

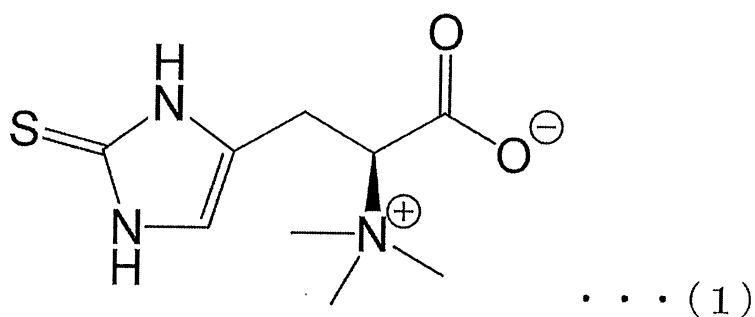
#### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm chứa L-ergothionin (EGT) và N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin (DTH), trong đó hàm lượng DTH được giảm bớt.

[L-ergothionin (EGT)]

EGT là một dẫn xuất histidin (N,N,N-trimetyl-L-2-thiohistidin), có cấu trúc được biểu diễn bằng công thức 1 sau đây.

[Công thức 1]



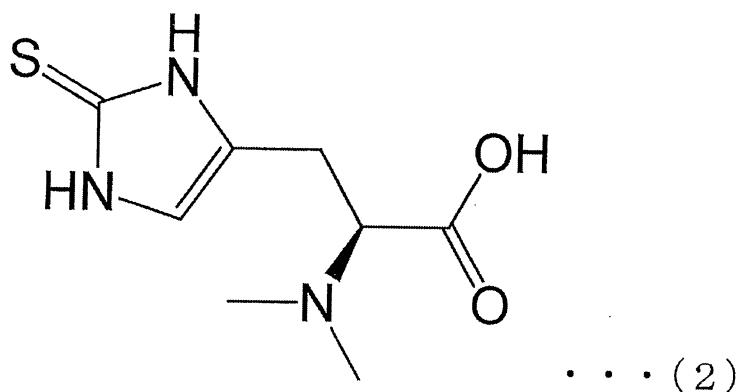
EGT có thể thu được bằng một phương pháp đã được biết đến công khai như phương pháp tổng hợp, phương pháp chiết xuất hoặc phương pháp lên men, và cũng có thể thu được và sử dụng một sản phẩm thương mại có sẵn.

Ví dụ về sản phẩm thương mại có sẵn của EGT là L-ergothionin (do Tetrahedron sản xuất).

[N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin (DTH)]

DTH là một chất tương tự của EGT, có cấu trúc được biểu diễn bằng công thức 2 sau đây.

[Công thức 2]



DTH có thể thu được bằng một phương pháp đã được biết đến công khai như phương pháp tổng hợp, phương pháp chiết xuất hoặc phương pháp lên men, và cũng có thể thu được và sử dụng sản phẩm thương mại có sẵn.

Ví dụ về sản phẩm thương mại có sẵn của DTH là N,N-dimetyl-L-2-

thiohistidin (do Tetrahedron sản xuất).

EGT và/hoặc DTH có thể ở dạng tự do hoặc ở dạng muối. Muối của EGT và/hoặc DTH có thể là muối được tạo thành với nhóm cacboxyl trong các cấu trúc này, hoặc có thể là muối được tạo với nhóm trimethylamino hoặc nhóm dimethylamino. L-ergothionin hoặc chất tương tự L-ergothionin cũng có thể là solvat như hydrat.

Muối của EGT và/hoặc DTH không bị giới hạn đặc biệt miễn là muối đó là muối được chấp nhận về mặt dược lý hoặc sinh lý và các ví dụ cụ thể của chúng bao gồm muối của axit hữu cơ, muối của axit vô cơ, muối của bazơ hữu cơ và muối của bazơ vô cơ. Ví dụ về muối của axit hữu cơ bao gồm monocarboxylat như axetat, trifloaxetat, butyrat, palmitat và stearat; carboxylat đa hóa trị như fumarat, maleat, succinat và malonat; oxycarboxylat như lactat, tartrat và xitrat; và các sulfonat hữu cơ như metansulfonat, toluensulfonat, và tosylat. Ví dụ về muối axit vô cơ bao gồm hydroclorua, sunfat, nitrat, hydrobromua và phosphat. Ví dụ về muối của bazơ hữu cơ bao gồm muối của các amin hữu cơ như metylamin, trietylamin, trietanolin, dietanolin, morpholin, piperazin, pyrrolidin và etylendiamin. Ví dụ về muối của bazơ vô cơ bao gồm các muối khác nhau như muối của kim loại kiềm như natri và kali, kim loại kiềm thổ như canxi và magie, và các kim loại như nhôm. Các muối của EGT và/hoặc DTH này có thể được sử dụng một mình, hoặc có thể được sử dụng trong bất kỳ sự kết hợp nào của hai hoặc nhiều hơn các muối đó. "Muối được chấp nhận về mặt dược lý hoặc sinh lý" có thể bao gồm solvat hoặc hydrat của muối.

Trong các ví dụ sau đây, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng trong trường hợp chế phẩm chứa EGT trong đó DTH cùng tồn tại, EGT bị mất ổn định và do đó, hiện tượng đổi màu của chế phẩm chứa EGT xảy ra, cho đến nay điều này chưa được báo cáo. Hơn nữa, các nhà phát minh đã phát hiện ra rằng trong chế phẩm chứa EGT và DTH, việc giảm hàm lượng của DTH có thể tăng cường tính ổn định của EGT và ngăn chặn sự đổi màu của chế phẩm. Các phương án của chế phẩm chứa EGT trong đó DTH

cùng tồn tại không bị giới hạn đặc biệt. Ví dụ, DTH có thể được thêm vào chế phẩm chứa EGT hoặc có thể được bao gồm nội sinh, ví dụ, tạp chất trong phương pháp chiết xuất, hoặc sản phẩm phụ trong phương pháp tổng hợp, phương pháp lên men hoặc tương tự.

Trong chế phẩm theo sáng chế, "sự đổi màu đã bị ngăn chặn" có nghĩa là độ hấp thụ ở bước sóng 400 nm bị giảm đi bằng cách giảm hàm lượng của DTH trong chế phẩm chứa EGT và DTH với lượng bằng nhau trong cùng điều kiện pH. Sự giảm độ hấp thụ ở bước sóng 400 nm có thể được xác định bằng cách sử dụng một máy quang phổ được biết đến công khai. Ví dụ, sự giảm độ hấp thụ ở bước sóng 400 nm tốt hơn là giảm ít nhất 5%, tốt hơn là giảm ít nhất 10% so với chế phẩm chứa EGT và DTH với lượng bằng nhau.

Trong chế phẩm theo sáng chế, đối với tỷ lệ hàm lượng của DTH so với EGT, hàm lượng của DTH tốt hơn là bằng hoặc ít hơn 50 phần theo khối lượng, tốt hơn là bằng hoặc ít hơn 40 phần theo khối lượng, vẫn tốt hơn là bằng hoặc ít hơn 30 phần theo khối lượng, đặc biệt tốt nhất là bằng hoặc ít hơn 20 phần theo khối lượng, tốt nhất là bằng hoặc ít hơn 10 phần khối lượng so với 100 phần theo khối lượng của EGT, theo quan điểm về sự ngăn chặn đổi màu của chế phẩm và quan điểm về độ ổn định của EGT.

Ngoài ra, trong chế phẩm theo sáng chế, đối với tỷ lệ hàm lượng của DTH so với EGT, hàm lượng của DTH tốt hơn là bằng hoặc nhiều hơn 0,0001 phần theo khối lượng, tốt hơn là bằng hoặc nhiều hơn 0,001 phần theo khối lượng, vẫn tốt hơn là bằng hoặc nhiều hơn 0,005 phần theo khối lượng, đặc biệt tốt hơn là bằng hoặc nhiều hơn 0,01 phần theo khối lượng, tốt nhất là bằng hoặc nhiều hơn 0,05 phần khối lượng so với 100 phần theo khối lượng của EGT, theo quan điểm về hiệu quả sản xuất của chế phẩm và tương tự.

Ngoài ra, trong chế phẩm theo sáng chế, đối với tỷ lệ hàm lượng của DTH so với EGT, hàm lượng của DTH tốt hơn là từ 0,0001 đến 50 phần theo khối lượng, tốt

hơn là từ 0,001 đến 40 phần theo khối lượng, vẫn tốt hơn là từ 0,005 đến 30 phần theo khối lượng, đặc biệt tốt hơn là từ 0,01 đến 20 phần theo khối lượng, tốt nhất là từ 0,05 đến 10 phần khối lượng so với 100 phần theo khối lượng của EGT, theo quan điểm về sự ngăn chặn đổi màu của chế phẩm, quan điểm về độ ổn định của EGT, quan điểm về hiệu quả sản xuất của chế phẩm và tương tự.

Ngoài ra, trong chế phẩm theo sáng chế, hàm lượng của EGT được điều chỉnh một cách thích hợp tùy thuộc vào dạng và cách sử dụng công thức, loại và hàm lượng của các thành phần khác, và tương tự, và không bị giới hạn, nhưng có thể là, ví dụ, 0,000001% khối lượng trở lên đối với tổng lượng chế phẩm, bao gồm 0,000005% khối lượng trở lên, 0,00001% khối lượng trở lên, 0,00005% khối lượng trở lên, 0,0001% khối lượng trở lên, 0,0005% khối lượng trở lên và 0,001 % khối lượng trở lên. Ngoài ra, hàm lượng của EGT có thể là, ví dụ, 99,999% khối lượng trở xuống so với tổng lượng chế phẩm, bao gồm 99,9% khối lượng trở xuống, 99,5% khối lượng trở xuống, 99% khối lượng trở xuống, 98,5% khối lượng trở xuống và 98% khối lượng trở xuống. Theo một phương án khác, khi được bào chế dưới dạng chế phẩm lỏng, hàm lượng của EGT không bị giới hạn, nhưng có thể là, ví dụ, từ 80% khối lượng trở xuống đối với tổng lượng của chế phẩm, bao gồm 70% khối lượng trở xuống, 60% khối lượng khối lượng trở xuống, 50% khối lượng trở xuống, 40% khối lượng trở xuống, 30% khối lượng trở xuống, 20% khối lượng trở xuống, 10% khối lượng trở xuống, 5% khối lượng trở xuống và 1% khối lượng trở xuống.

[Sử dụng]

Trong chế phẩm chứa EGT và DTH, việc giảm hàm lượng của DTH có thể tăng cường tính ổn định của EGT, và do đó sáng chế có thể được sử dụng để ngăn chặn sự đổi màu của chế phẩm.

Ngoài ra, mô tả ở trên đã được biết rằng EGT có các hoạt động sinh lý khác nhau bao gồm khả năng chống oxy hóa. Cũng trong chế phẩm chứa EGT và DTH, khi

sử dụng sáng chế, độ ổn định của EGT có thể được tăng cường và sự phân hủy của nó có thể được ngăn chặn để EGT không bị suy giảm mà có thể biểu hiện các hoạt động sinh lý vốn có.

Cũng trong chế phẩm chứa EGT và DTH, khi sử dụng sáng chế, chế phẩm có thể được sử dụng thích hợp để chống oxy hóa, cải thiện chức năng não, chống lão hóa, sử dụng cho các bệnh về mắt, làm trắng da, hấp thụ tia cực tím, để ngăn chặn sản xuất hắc tố, để loại bỏ các gốc oxy hoạt tính, để ức chế hoạt động của elastaza, để ngăn chặn sự hình thành nếp nhăn, để ngăn chặn sự chảy xệ của da, để ngăn chặn sự hình thành các đốm da, để ngăn chặn các quầng tối quanh mắt, để giảm tổn thương da (ngăn chặn sự lão hóa do ánh sáng) bởi tia cực tím, sử dụng cho da khô, da nhạy cảm, sử dụng cải thiện tóc, thúc đẩy quá trình tự thực bào và tương tự, mà là những hoạt động sinh lý vốn có của EGT.

Chế phẩm của sáng chế có thể chứa thêm thành phần hoạt tính hoặc chất phụ gia một cách thích hợp có thể được sử dụng cho thực phẩm hoặc đồ uống, thực phẩm có công bố chức năng, thực phẩm cho mục đích y tế cụ thể, dược mỹ phẩm, dược phẩm, sản phẩm mỹ phẩm, nhu yếu phẩm hàng ngày, thức ăn chăn nuôi, và những thứ tương tự, và có thể được bào chế một cách thích hợp bằng phương pháp bào chế đã được biết đến công khai được sử dụng cho những chế phẩm này.

Như các sản phẩm mỹ phẩm và nhu yếu phẩm hàng ngày, ví dụ, chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành kem xúc dưỡng da, nhũ tương, gel, serum, kem dưỡng, kem chống nắng, kem đắp mặt, mặt nạ, kem nền, bột đắp mặt, chất dùng để tắm, kem xúc dưỡng thể, dầu gội, dung dịch để chăm sóc tóc, ủ tóc, dầu xả, chế phẩm làm tóc, thuốc bổ tóc, bột đánh răng, nước súc miệng và các loại tương tự.

[Công thức]

Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng qua đường uống hoặc đường tiêm (kể cả dùng bên ngoài), ví dụ, chế phẩm dạng rắn như viên nén, viên nang, hạt, hoặc

bột; hoặc dưới dạng công thức chất lỏng như dung dịch, xi-rô, thuốc tiêm, kem, kem xúc dưỡng da, bột nhão, thuốc mỡ, nhũ tương (nhũ tương dầu trong nước, nhũ tương nước trong dầu, nhũ tương nhiều lớp, vi nhũ tương, nhũ tương PET, nhũ tương nhỏ giọt), gel (hydrogel, gel cón), hoặc huyền phù. Đối với chế phẩm rắn, tá dược, tá dược trơn, tá dược dính và tá dược rã có thể được sử dụng; và đối với công thức chất lỏng, dung môi, chất hòa tan, chất nhũ hóa, chất ổn định nhũ tương, chất làm đặc, chất giữ ẩm, chất tạo huyền phù, chất tăng trương lực, chất đệm, chất giảm đau, và những chất tương tự có thể được sử dụng. Nếu cần, chất phụ gia như chất khử trùng, chất chống oxy hóa, chất tạo màu, chất tạo ngọt hoặc nước hoa cũng có thể được sử dụng.

Ví dụ về tá dược bao gồm rượu đường như sorbitol, mannitol và xylitol, sacarit như glucoza, đường trắng, lactoza và fructoza, xenluloza tinh thể, natri carmelloza, natri croscarmelloza, canxi hydro phosphat, tinh bột mì, tinh bột gạo, tinh bột ngô, tinh bột khoai tây, dextrin,  $\beta$ -xyclodextrin, axit silixic khan, oxit titan, magie aluminat metasilicat, bột talc, kaolin và dầu ô liu.

Ví dụ về tá dược dính bao gồm các dẫn xuất xenluloza như methyl xenluloza, ethyl xenluloza, hydroxypropyl xenluloza và hydroxypropyl methyl xenluloza, polyvinyl pyrrolidon, rượu polyvinyllic, polyme gốc axit acrylic, gelatin, gôm arabic, pullulan, tinh bột biến tính, aga, nhựa tragacan, natri alginat và propylen glycol alginat.

Ví dụ về tá dược rã bao gồm tinh bột, hydroxypropyl xenluloza được thay thế thấp, canxi carboxymethyl xenluloza, natri croscarmelloza, tinh bột hydroxypropyl và tinh bột biến tính một phần.

Ví dụ về dung môi bao gồm nước, rượu, propylen glycol, macrogol, dầu mè và dầu ngô.

Ví dụ về tá dược trơn bao gồm axit stearic, magie stearat, canxi stearat, polyoxyl stearat, cetanol, bột talc, dầu cứng, este sucroza của axit béo, dimethylpolysiloxan, sáp ong và sáp ong trắng.

Ví dụ về chất hòa tan bao gồm polyetylen glycol, propylen glycol, mannitol, benzyl benzoat, etanol, tris(hydroxymetyl)aminometan, cholesterol, trietanolamin, natri cacbonat và natri xitrat.

Ví dụ về chất tạo huyền phù/chất nhũ hóa bao gồm chất hoạt động bề mặt như stearylamin, trietanolamin, natri lauryl sulfat, axit laurylaminopropionic, lexitin, benzalkonium clorua, benzethonium clorua, và glyceryl monostearat; polyme ưa nước như rượu polyvinyllic, polyvinylpyrrolidon, natri carboxymetylxenluloza, metyloxenluloza, hydroxymetylxenluloza, hydroxyetylxenluloza và hydroxypropyloxenluloza; và các loại sáp như sáp shellac, sáp ong, sáp carnauba, sáp cá nhà táng, lanolin, lanolin lỏng, lanolin được khử, lanolin cứng, lanolin vòng, sáp lanolin, sáp candelilla, sáp Nhật Bản, sáp montan và sáp gạo.

Ví dụ về chất tăng trương lực bao gồm natri clorua, glycerin, và D-mannitol.

Ví dụ về chất đệm bao gồm chất đệm phosphat, axetat, cacbonat và xitrat.

Ví dụ về chất khử trùng bao gồm este của axit paraoxybenzoic, clobutanol, rượu benzylic, rượu phenetylic, axit dehydroaxetic và axit sorbic.

Ví dụ về chất chống oxy hóa bao gồm sulfit và axit ascorbic.

Khi chế phẩm theo sáng chế được tạo thành trong một công thức rắn, một phương pháp sản xuất được biết đến công khai trong lĩnh vực có thể được sử dụng. Ví dụ về phương pháp này bao gồm phương pháp trong đó sản phẩm được ép đùn, tạo hạt và tạo khuôn bằng cách nhào trộn chế phẩm và đưa chế phẩm đã nhào qua sàng để được tán thành bột và định cỡ, và phương pháp khuấy tạo hạt được thực hiện bằng cách thêm nước nhào vào chế phẩm, tiếp theo là đúc bằng máy tạo hạt thẳng đứng, và sau đó sản phẩm tạo hạt được nghiền thành bột bằng máy nghiền và sàng. Ngoài ra, một phương pháp được bao gồm trong đó thành phần công thức được nén bằng máy đầm lặn, sau đó nghiền thành bột bằng máy tạo hạt cuộn và sàng. Hơn nữa, một phương pháp được bao gồm trong đó sấy tầng sôi được thực hiện sau khi khuấy hạt. Hơn nữa, ví dụ, trong

trường hợp sản xuất bằng phương pháp nén trực tiếp, chế phẩm đã pha trộn có thể được đưa trực tiếp vào máy ép viên và nén.

[Thực phẩm và đồ uống]

Chế phẩm theo sáng chế cũng có thể được sử dụng như một chế phẩm thực phẩm và đồ uống, hoặc có thể được cung cấp ở trạng thái được bao gồm trong thực phẩm hoặc thực phẩm chức năng. Ví dụ về các loại thực phẩm hoặc thực phẩm chức năng đó bao gồm gạo; các loại mì khác nhau bao gồm mì kiều mạch, mì Nhật Bản, mì harusame, mì Trung Quốc, mì ăn liền và mì ly; đồ uống như nước ngọt, đồ uống có ga, đồ uống dinh dưỡng, đồ uống trái cây, đồ uống chứa axit lactic và đồ uống thể thao; cà ri roux, món hầm, và các món súp khác nhau; bánh kẹo đông lạnh như kem, kem ga ngọt và đá bào; bánh kẹo như kẹo Nhật, bánh quy, kẹo, kẹo cao su, sôcôla, bánh kẹo viên, bánh kẹo ăn nhẹ, bánh quy bơ, thạch, mứt, kem và các loại bánh kẹo nướng khác; thực phẩm chế biến từ cá và gia súc như kamaboko, hanpen, dăm bông và xúc xích; các sản phẩm từ sữa như sữa chế biến và sữa lên men; dầu và mỡ, và các loại thực phẩm chế biến từ dầu và mỡ như dầu xalat, dầu tempura, bơ thực vật, sốt mayonnaise, shortening, kem đánh bông và nước xốt; gia vị như nước chấm, nước xốt, miso, nước tương và nước thịt; súp, món hầm, xalat, món ăn kèm, bánh furikake và rau muối; và nhiều dạng thực phẩm bổ sung dinh dưỡng và sức khỏe khác, thực phẩm có công bố chức năng và thực phẩm cho các mục đích sức khỏe cụ thể.

Ngoài ra, các chất bổ sung (như bột, hạt, viên nang mềm, viên nang cứng, viên nén, viên nén nhai, viên nén tan nhanh, xi-rô và công thức lỏng) bao gồm chế phẩm theo sáng chế có thể được điều chế.

Chế phẩm theo sáng chế cũng có thể được bao gồm trong thức ăn cho động vật như vật nuôi.

Nếu cần, các chất phụ gia được thêm vào thực phẩm hoặc đồ uống. Ví dụ về các chất phụ gia như vậy bao gồm glucoza, fructoza, sucroza, maltoza, sorbitol,

trehaloza, steviosit, rubusosit, xi-rô ngô, lactoza, mannitol, dextrin, axit xitric, natri xitrat, axit tartaric, axit malic, axit succinic, axit lactic, L- axit ascorbic, tocopherol, natri erythorbat, glycerin, propylen glycol, este glycerin của axit béo, este polyglycerin của axit béo, este sucroza của axit béo, este sorbitan của axit béo, gồm arabic, carrageenan, casein, gelatin, pectin, aga, vitamin B, amit nicotinic axit, canxi pantothenat, axit amin, muối canxi, chất hoạt động bề mặt, thuốc nhuộm, hương liệu và chất bảo quản.

Chế phẩm theo chế độ sáng chế có thể được sử dụng cho các loại thực phẩm hoặc đồ uống mà chỉ định cải thiện, ngăn ngừa, tiến triển hoặc tương tự các triệu chứng hoặc tình trạng khác nhau. Ở đây, trong sáng chế này, thực phẩm hoặc đồ uống cho phép chỉ định cải thiện, ngăn ngừa, tiến triển, hoặc tương tự các triệu chứng hoặc tình trạng cho phép là thực phẩm và đồ uống có hiệu lực được chính phủ hoặc tổ chức công cấp phép/chỉ định, và ví dụ là, thực phẩm có công bố chức năng, thực phẩm chức năng cho sức khỏe như thực phẩm cho các mục đích y tế cụ thể và thực phẩm và thực phẩm chuyên dùng. Lưu ý rằng tên và quy định của các loại thực phẩm và đồ uống đó khác nhau tùy thuộc vào tình huống, thời điểm và hệ thống ở mỗi quốc gia, nhưng chúng về cơ bản là giống nhau và được bao gồm trong sáng chế.

Trong sáng chế này, lượng pha trộn của chế phẩm theo sáng chế không bị đặc biệt giới hạn, và được thiết lập thích hợp tùy thuộc vào mục đích ứng dụng (bệnh mục tiêu, loại triệu chứng, v.v.), vị trí đích được áp dụng, giới tính và tuổi của đối tượng áp dụng, các dạng sản phẩm như thực phẩm và đồ uống, thực phẩm có công bố chức năng, thực phẩm cho mục đích y tế cụ thể, dược mỹ phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm, nhu yếu phẩm hàng ngày hoặc thức ăn chăn nuôi, phương pháp và số lượng sử dụng hoặc tiêu thụ chúng, và sở thích.

Khi chế phẩm theo chế độ sáng chế được sử dụng, có thể đặt một lượng hữu hiệu có thể thể hiện các hoạt động sinh lý vốn có của EGT như một lượng ăn (lượng sử dụng)

mỗi ngày. Ví dụ, khi được tiêu hóa bởi (áp dụng cho) một người lớn khỏe mạnh, lượng EGT ăn vào (lượng áp dụng) mỗi ngày có thể được sử dụng, ví dụ, 0,005 đến 4000 mg, tốt hơn là 0,1 đến 3000 mg, tốt hơn nữa là 0,5 đến 2000 mg, vẫn tốt hơn nữa là từ 1 đến 1000 mg, đặc biệt tốt hơn là từ 2 đến 500 mg, tốt nhất là từ 3 đến 300 mg.

Khi chế phẩm theo sáng chế được sử dụng làm thực phẩm hoặc đồ uống, thực phẩm hoặc đồ uống không bị giới hạn, nhưng tốt hơn là thực phẩm chức năng trên quan điểm có thể biểu hiện các hoạt động sinh lý vốn có của EGT. Trong số các sản phẩm thực phẩm chức năng, ví dụ như thực phẩm có công bố chức năng, thực phẩm chức năng dinh dưỡng, thực phẩm bổ sung dinh dưỡng và thực phẩm cho các mục đích sức khỏe cụ thể, những thực phẩm có công bố chức năng được ưu tiên sử dụng trên quan điểm có thể biểu hiện rõ ràng công dụng.

[Đối tượng được áp dụng]

Đối tượng mà chế phẩm sáng chế được áp dụng không bị giới hạn đặc biệt miễn là đối tượng ở trong độ tuổi cần các hoạt động sinh lý vốn có của EGT, nhưng đối tượng có thể khoảng 30 tuổi trở lên, trong độ tuổi nhóm dễ bị căng thẳng từ môi trường sống như công việc, có thể là người trung niên (khoảng từ 45 đến 55 tuổi) thuộc nhóm tuổi dễ cảm thấy cơ thể có sự thay đổi do thay đổi cân bằng hormon, thay đổi môi trường sống, hoặc tương tự hoặc có thể là người già (55 tuổi trở lên).

[Độ pH]

Độ pH của chế phẩm theo sáng chế được thiết lập thích hợp tùy thuộc vào loại và hàm lượng của các thành phần pha trộn khác, công thức chế tạo, phương pháp sử dụng và tương tự, và không bị giới hạn miễn là độ pH nằm trong khoảng chấp nhận được về mặt dược lý hoặc sinh lý, nhưng có thể là, ví dụ, độ pH từ 2 đến 10. Từ quan điểm biểu hiện hiệu quả của sáng chế một cách ổn định, độ pH của chế phẩm theo sáng chế có thể là, ví dụ, pH từ 2 đến 10, pH từ 2 đến 9, pH từ 2 đến 8, pH từ 2 đến 7, pH từ 3 đến 10, pH từ 3 đến 9, pH từ 3 đến 8, pH từ 3 đến 7, pH từ 4 đến 10, pH từ 4 đến 9,

pH từ 4 đến 8, pH từ 4 đến 7, pH từ 5 đến 10, pH từ 5 đến 9, pH từ 5 đến 8, pH từ 5 đến 7, pH từ 6 đến 10, pH từ 6 đến 9, pH từ 6 đến 8 hoặc pH từ 6 đến 7.

[Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa EGT và DTH mà đã bị ngăn chặn sự đổi màu]

Trong sáng chế này, phương pháp sản xuất chế phẩm chứa EGT và DTH mà đã bị ngăn chặn sự đổi màu bao gồm bước giảm hàm lượng của DTH.

Về bước giảm hàm lượng của DTH, bất kỳ cách thức được biết đến công khai nào đều có thể được sử dụng miễn là làm giảm hàm lượng DTH. Ví dụ, khi EGT và DTH được trộn để bào chế một chế phẩm, bước giảm tỷ lệ hàm lượng của DTH so với EGT có thể được thực hiện. Như đã mô tả ở trên, cách thức mà DTH cùng tồn tại trong chế phẩm chứa EGT không bị giới hạn đặc biệt, và có thể là, ví dụ, cách thức trong đó DTH tồn tại trong các tạp chất trong phương pháp chiết xuất EGT hoặc cách thức trong đó DTH tồn tại dưới dạng sản phẩm phụ trong phương pháp tổng hợp, phương pháp lên men hoặc tương tự.

Ví dụ về phương pháp giảm DTH trong tạp chất trong phương pháp chiết xuất EGT từ nấm, thực vật, và tương tự bao gồm chiết xuất bằng dung môi, tách bằng chênh lệch độ hòa tan, sắc ký như sắc ký sử dụng chất hấp phụ như silica gel hoặc nhôm oxit, sắc ký trao đổi cation, sắc ký trao đổi anion, sắc ký kỵ nước, sắc ký lọc gel, sắc ký thiopropyl-sepharose 6B, hoặc sắc ký pha đảo, các phương pháp như kết tinh, xử lý than hoạt tính và xử lý màng, và các phương pháp kết hợp các phương pháp này.

Về phương pháp sản xuất EGT bằng phương pháp lên men, một phương pháp sử dụng *E. coli* hoặc loại tương tự được biết đến công khai từ WO 2019/163767 A và tương tự. Ví dụ về phương pháp giảm DTH trong tạp chất trong phương pháp lên men cho EGT bao gồm các phương pháp được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế được mô tả dưới đây. Cụ thể, trong phương pháp lên men EGT, áp dụng bước xóa gen *metJ* của vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* có khả năng sản xuất EGT có thể làm giảm DTH trong dung dịch nuôi cấy, và sản xuất EGT một cách hiệu quả.

Ở bước xóa gen *metJ*, một phương pháp được biết đến công khai có thể được sử dụng và các ví dụ về phương pháp đó bao gồm phương pháp làm mất chức năng hoặc làm biến đổi cấu trúc gen *metJ* bằng tái tổ hợp tương đồng, xử lý đột biến, chỉnh sửa bộ gen hoặc tương tự.

Ví dụ về vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae có khả năng sản xuất EGT bao gồm, nhưng không giới hạn bởi, vi khuẩn thuộc các chi *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella* và *Salmonella*. Các ví dụ đặc biệt thích hợp về vi khuẩn đường ruột bao gồm vi khuẩn đường ruột thuộc *Escherichia* như *Escherichia coli* và *Pantoea* như *Pantoea ananatis*.

Việc nuôi cấy vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae có thể được thực hiện bằng phương pháp tiêu chuẩn. Cụ thể, có thể sử dụng môi trường LB, môi trường  $2 \times$  YT, môi trường NZY, môi trường M9, môi trường SOC, môi trường YPD hoặc tương tự. Môi trường được mô tả ở trên có thể được sử dụng để sản xuất EGT và DTH, nhưng môi trường được sử dụng không bị giới hạn ở đó. EGT và DTH được tạo ra có thể được tích lũy trong tế bào vi khuẩn, hoặc có thể được tiết ra và tích lũy bên ngoài tế bào (trong dung dịch nuôi cấy).

Việc thu thập EGT và DTH có trong tế bào vi khuẩn hoặc được giải phóng khỏi tế bào vi khuẩn có thể được thực hiện bằng phương pháp đã được biết đến công khai. Ví dụ, phần nổi trên bề mặt nuôi cấy (dịch chiết) của EGT và DTH có thể thu được bằng cách sự nuôi cấy được đưa sang phân tách rắn-lỏng như ly tâm hoặc lọc, trong khi dịch chiết của chúng trong tế bào vi khuẩn có thể thu được bằng cách chiết dung môi, chiết nước nóng, xử lý nghiền nát, hoặc tương tự. Từ dịch chiết EGT và DTH hoặc phần nổi trên bề mặt nuôi cấy, có thể thu được EGT bằng cách cho dịch chiết hoặc phần nổi trên bề mặt nuôi cấy vào sắc ký đã được biết đến công khai như sắc ký trao đổi ion, sắc ký kỵ nước, hoặc sắc ký lọc gel.

Trong các cách thức khác nhau để giảm hàm lượng DTH, tỷ lệ hàm lượng ưu

tiên của DTH so với EGT là như được mô tả ở trên.

Phương pháp sản xuất có thể còn bao gồm bước điều chỉnh độ pH. Số phạm vi pH tối ưu là như được mô tả ở trên.

[Phương pháp để tạo tác dụng ngăn chặn sự đổi màu cho chế phẩm chứa EGT và DTH]

Trong sáng chế này, cũng có thể đưa ra phương pháp để tạo tác dụng ngăn chặn sự đổi màu cho chế phẩm chứa EGT và DTH bằng cách đặt hàm lượng của DTH thành bằng hoặc ít hơn 50 phần khối lượng so với 100 phần theo khối lượng của EGT. Tỷ lệ hàm lượng ưu tiên của DTH so với EGT là như được mô tả ở trên.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Tiếp theo, một bản mô tả cụ thể được đưa ra về sáng chế có tham chiếu đến các Ví dụ và Ví dụ Thử nghiệm, nhưng sáng chế này không bị giới hạn trong các Ví dụ và Ví dụ Thử nghiệm sau đây. Khi không có mô tả cụ thể, thí nghiệm được thực hiện bằng phương pháp được mô tả trong bộ quy trình chuẩn liên quan đến sinh học phân tử và vi sinh ứng dụng, hoặc một phương pháp đã được sửa đổi hoặc biến đổi. Trừ khi có chỉ định khác, % biểu diễn cho % trọng lượng/thể tích.

(Ví dụ thử nghiệm 1. Đánh giá độ ổn định 1 trong chế độ chứa EGT và DTH)

Đối với các chế phẩm chứa L-ergothionin (EGT) và N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin (DTH), độ ổn định bảo quản trong các điều kiện pH khác nhau được kiểm tra như sau.

EGT (do Tetrahedron sản xuất) và DTH (do Tetrahedron sản xuất) được hòa tan riêng lẻ trong Britton-Robinson Buffers (nồng độ cuối cùng: 30 mM) có độ pH là 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 sao cho nồng độ cuối cùng của EGT và DTH, và độ pH được thể hiện trong Bảng 1. Bằng cách này, mỗi dung dịch hỗn hợp của DTH và EGT được chuẩn bị có thể tích 3,0 ml và có độ pH và nồng độ khác nhau.

Britton-Robinson Buffer, là một loại đệm khoảng rộng được sử dụng để điều chỉnh độ pH, được chuẩn bị như sau. Dung dịch hỗn hợp axit boric + axit phosphoric + axit axetic (nồng độ cuối cùng: mỗi axit 200 mM) được phân đoạn thành các phân đoạn 20 ml và các phân đoạn được điều chỉnh riêng rẽ thành pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 với NaOH 1 N, và sau đó pha loãng thành 40 ml với nước để tạo ra 300 mM (mỗi axit 100 mM) Đệm Britton-Robinson có pH từ 3 đến 10. Hơn nữa, đệm Britton-Robinson 300 mM ở mỗi pH và nước được sử dụng để hòa tan EGT và DTH sao cho nồng độ cuối cùng của đệm Britton-Robinson là 30 mM. Bằng cách này, các dung dịch hỗn hợp EGT và DTH trong Bảng 1 đã được chuẩn bị.

Đối với mỗi số mẫu, cho vào hai ống nghiệm được chuyển 1,0 ml dung dịch hỗn hợp EGT và DTH được mô tả trong Bảng 1, sau đó để ở nhiệt độ 30°C hoặc 70°C trong 21 ngày. Ngay sau khi bắt đầu (vào Ngày 0), vào Ngày 8, Ngày 14 và Ngày 21, một bức ảnh của ống được chụp để ghi lại sự thay đổi màu sắc của dung dịch, và thêm 100  $\mu$ l dung dịch được lấy mẫu, và sau đó được định lượng EGT và DTH bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (do Tập đoàn Shimadzu sản xuất) trong các điều kiện được mô tả trong Bảng 2. Fig.1 là ảnh chụp các dung dịch được thực hiện vào ngày 14.

Như thể hiện trong Fig.1, trong số các mẫu được bảo quản ở 70°C trong 14 ngày, màu của dung dịch từ trong và không màu đến nâu đỏ đã được xác nhận trong các mẫu của các nhóm thử nghiệm có EGT 100 mg/L + DTH 20 mg/L, EGT 100 mg/L + DTH 50 mg/L và EGT 100 mg/L + DTH 100 mg/L. Ngoài ra, mức độ màu trở nên mạnh hơn khi nồng độ DTH tăng lên. Hơn nữa, mức độ màu trở nên mạnh hơn khi thời gian bảo quản DTH tăng lên. Từ những điều trên, một vấn đề mà dung dịch hỗn hợp của EGT và DTH có màu lần đầu tiên được xác nhận trong Ví dụ thử nghiệm này.

[Bảng 1]

| No. | EGT<br>(mg/L) | DTH<br>(mg/L) | pH | No. | EGT<br>(mg/L) | DTH<br>(mg/L) | pH |
|-----|---------------|---------------|----|-----|---------------|---------------|----|
| 1   | 100           | 0             | 3  | 17  | 100           | 50            | 3  |

|    |     |    |    |    |     |     |    |
|----|-----|----|----|----|-----|-----|----|
| 2  |     |    | 4  | 18 |     |     | 4  |
| 3  |     |    | 5  | 19 |     |     | 5  |
| 4  |     |    | 6  | 20 |     |     | 6  |
| 5  |     |    | 7  | 21 |     |     | 7  |
| 6  |     |    | 8  | 22 |     |     | 8  |
| 7  |     |    | 9  | 23 |     |     | 9  |
| 8  |     |    | 10 | 24 |     |     | 10 |
| 9  |     |    | 3  | 25 |     |     | 3  |
| 10 |     |    | 4  | 26 |     |     | 4  |
| 11 |     |    | 5  | 27 |     |     | 5  |
| 12 |     |    | 6  | 28 |     |     | 6  |
| 13 | 100 | 20 | 7  | 29 | 100 | 100 | 7  |
| 14 |     |    | 8  | 30 |     |     | 8  |
| 15 |     |    | 9  | 31 |     |     | 9  |
| 16 |     |    | 10 | 32 |     |     | 10 |

[Bảng 2]

|                       |                                                                      |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Thiết bị được sử dụng | HPLC Prominence được sản xuất bởi Tập đoàn Shimadzu                  |
| Cột                   | YMC-Pack ODS-AQ (4.6 × 250 mm, đường kính hạt 5 µm) sản xuất bởi YMC |
| Dung môi              | 0.1% axit formic                                                     |
| Điều kiện Gradient    | đẳng dòng                                                            |
| Bước sóng phát hiện   | 263 nm                                                               |
| Tốc độ dòng           | 0.8 mL/phút                                                          |
| Nhiệt độ cột          | 30°C                                                                 |
| Lượng tiêm            | 5 µl                                                                 |
| Thời gian rửa giải    | DTH: khoảng 5.1 min, EGT: khoảng 6.0 min                             |

(Ví dụ thử nghiệm 2. Đánh giá 1 về sự ngăn chặn đổi màu trong chế phẩm chứa EGT và DTH)

Từ kết quả của Ví dụ thử nghiệm 1, một vấn đề mới đã được tìm ra là dung dịch hỗn hợp của EGT và DTH đã được đổi màu. Theo đó, mức độ đổi màu được định lượng bằng phép đo độ hấp thụ, trong khi nồng độ của EGT và DTH được thử nghiệm khác nhau để tìm kiếm một phương pháp để ngăn chặn sự đổi màu.

[0088]

Theo cách giống như trong Ví dụ thử nghiệm 1, EGT (do Tetrahedron sản xuất) và DTH (do Tetrahedron sản xuất) được hòa tan trong Britton-Robinson Buffer (nồng độ cuối cùng: 30 mM) sao cho nồng độ cuối cùng của EGT và DTH, và độ pH được thể hiện trong Bảng 3 và 4, và mỗi dung dịch hỗn hợp EGT và DTH được chuẩn bị có thể tích 2,0 ml.

[0089]

1,5 ml của mỗi dung dịch hỗn hợp EGT và DTH được mô tả trong Bảng 3 và 4 được chuyển vào một ống 2,0 ml. Sau đó, 200  $\mu$ l dầu khoáng được phủ lên bề mặt chất lỏng để ngăn sự bay hơi của dung dịch. Mẫu đã chuẩn bị được để ở nhiệt độ 70°C trong 28 ngày, và 200  $\mu$ l được thu thập trong một khay vi thể 96 giếng ngay sau khi bắt đầu (vào ngày 0), vào ngày 4, vào ngày 7, vào ngày 14, vào ngày 21 và vào ngày 28, để đo độ hấp thụ ở bước sóng 250 đến 800 nm bằng MULTISKAN GO (do Thermo SCIENTIFIC sản xuất). Fig.2 được tạo ra bằng cách sử dụng dữ liệu độ hấp thụ ở 400 nm trong số dữ liệu thu được bằng phép đo độ hấp thụ cho các mẫu trong Bảng 3. Hơn nữa, sử dụng 100  $\mu$ l mẫu sau khi đo độ hấp thụ, việc định lượng EGT và DTH được thực hiện bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (do Tập đoàn Shimadzu sản xuất) với các điều kiện nêu trong Bảng 2.

[Bảng 3]

| No. | EGT (mg/L) | DTH (mg/L) | pH | No. | EGT (mg/L) | DTH (mg/L) | pH |
|-----|------------|------------|----|-----|------------|------------|----|
| 1   | 100        | 50         | 3  | 37  | 100        | 50         | 7  |
| 2   |            | 20         |    | 38  |            | 20         |    |
| 3   |            | 10         |    | 39  |            | 10         |    |
| 4   |            | 5          |    | 40  |            | 5          |    |
| 5   |            | 2.5        |    | 41  |            | 2.5        |    |
| 6   |            | 1          |    | 42  |            | 1          |    |
| 7   |            | 0.1        |    | 43  |            | 0.1        |    |

|    |     |       |   |    |     |       |    |
|----|-----|-------|---|----|-----|-------|----|
| 8  |     | 0.01  |   | 44 |     | 0.01  |    |
| 9  |     | 0.001 |   | 45 |     | 0.001 |    |
| 10 | 100 | 50    | 4 | 46 | 100 | 50    | 8  |
| 11 |     | 20    |   | 47 |     | 20    |    |
| 12 |     | 10    |   | 48 |     | 10    |    |
| 13 |     | 5     |   | 49 |     | 5     |    |
| 14 |     | 2.5   |   | 50 |     | 2.5   |    |
| 15 |     | 1     |   | 51 |     | 1     |    |
| 16 |     | 0.1   |   | 52 |     | 0.1   |    |
| 17 |     | 0.01  |   | 53 |     | 0.01  |    |
| 18 |     | 0.001 |   | 54 |     | 0.001 |    |
| 19 | 100 | 50    | 5 | 55 | 100 | 50    | 9  |
| 20 |     | 20    |   | 56 |     | 20    |    |
| 21 |     | 10    |   | 57 |     | 10    |    |
| 22 |     | 5     |   | 58 |     | 5     |    |
| 23 |     | 2.5   |   | 59 |     | 2.5   |    |
| 24 |     | 1     |   | 60 |     | 1     |    |
| 25 |     | 0.1   |   | 61 |     | 0.1   |    |
| 26 |     | 0.01  |   | 62 |     | 0.01  |    |
| 27 |     | 0.001 |   | 63 |     | 0.001 |    |
| 28 | 100 | 50    | 6 | 64 | 100 | 50    | 10 |
| 29 |     | 20    |   | 65 |     | 20    |    |
| 30 |     | 10    |   | 66 |     | 10    |    |
| 31 |     | 5     |   | 67 |     | 5     |    |
| 32 |     | 2.5   |   | 68 |     | 2.5   |    |
| 33 |     | 1     |   | 69 |     | 1     |    |
| 34 |     | 0.1   |   | 70 |     | 0.1   |    |
| 35 |     | 0.01  |   | 71 |     | 0.01  |    |
| 36 |     | 0.001 |   | 72 |     | 0.001 |    |

[Bảng 4]

| No. | EGT<br>(mg/L) | DTH<br>(mg/L) | pH | No. | EGT<br>(mg/L) | DTH<br>(mg/L) | pH |
|-----|---------------|---------------|----|-----|---------------|---------------|----|
| 1   | 1000          | 500           | 3  | 37  | 1000          | 500           | 7  |
| 2   |               | 200           |    | 38  |               | 200           |    |
| 3   |               | 100           |    | 39  |               | 100           |    |
| 4   |               | 50            |    | 40  |               | 50            |    |

|    |      |      |   |    |      |      |    |
|----|------|------|---|----|------|------|----|
| 5  |      | 25   |   | 41 |      | 25   |    |
| 6  |      | 10   |   | 42 |      | 10   |    |
| 7  |      | 1    |   | 43 |      | 1    |    |
| 8  |      | 0.1  |   | 44 |      | 0.1  |    |
| 9  |      | 0.01 |   | 45 |      | 0.01 |    |
| 10 | 1000 | 500  | 4 | 46 | 1000 | 500  | 8  |
| 11 |      | 200  |   | 47 |      | 200  |    |
| 12 |      | 100  |   | 48 |      | 100  |    |
| 13 |      | 50   |   | 49 |      | 50   |    |
| 14 |      | 25   |   | 50 |      | 25   |    |
| 15 |      | 10   |   | 51 |      | 10   |    |
| 16 |      | 1    |   | 52 |      | 1    |    |
| 17 |      | 0.1  |   | 53 |      | 0.1  |    |
| 18 |      | 0.01 |   | 54 |      | 0.01 |    |
| 19 | 1000 | 500  | 5 | 55 | 1000 | 500  | 9  |
| 20 |      | 200  |   | 56 |      | 200  |    |
| 21 |      | 100  |   | 57 |      | 100  |    |
| 22 |      | 50   |   | 58 |      | 50   |    |
| 23 |      | 25   |   | 59 |      | 25   |    |
| 24 |      | 10   |   | 60 |      | 10   |    |
| 25 |      | 1    |   | 61 |      | 1    |    |
| 26 |      | 0.1  |   | 62 |      | 0.1  |    |
| 27 |      | 0.01 |   | 63 |      | 0.01 |    |
| 28 | 1000 | 500  | 6 | 64 | 1000 | 500  | 10 |
| 29 |      | 200  |   | 65 |      | 200  |    |
| 30 |      | 100  |   | 66 |      | 100  |    |
| 31 |      | 50   |   | 67 |      | 50   |    |
| 32 |      | 25   |   | 68 |      | 25   |    |
| 33 |      | 10   |   | 69 |      | 10   |    |
| 34 |      | 1    |   | 70 |      | 1    |    |
| 35 |      | 0.1  |   | 71 |      | 0.1  |    |
| 36 |      | 0.01 |   | 72 |      | 0.01 |    |

Kết quả của thử nghiệm đánh giá sự ngăn chặn đổi màu sử dụng các mẫu của Bảng 3 được thể hiện trong Fig.2. Như thể hiện trong Fig.2, đối với mẫu EGT 100 mg/L + DTH 50 mg/L, độ hấp thụ ở bước sóng 400 nm (Giá trị A 400) đại diện cho mức độ màu được tăng lên theo thời gian ở tất cả các nhóm pH và màu của dung dịch

hỗn hợp EGT và DTH được xác nhận trong Ví dụ 1 cũng có thể được xác nhận từ độ hấp thụ. Hơn nữa, như kết quả của việc kiểm tra các nồng độ DTH khác nhau, đã xác nhận rằng giá trị A 400 đã được hạ xuống bằng cách giảm nồng độ DTH trong tất cả các nhóm pH. Mặc dù không bị giới hạn, nhưng thấy rằng việc đổi màu theo thời gian bị ngăn chặn đáng kể, đặc biệt khi tỷ lệ hàm lượng của DTH là bằng hoặc ít hơn 20 phần khối lượng so với 100 phần theo khối lượng của EGT. Kết quả định lượng EGT trong mỗi mẫu chỉ ra rằng sự phân hủy EGT có thể được ngăn chặn bằng cách giảm nồng độ DTH, tương tự như sự đổi màu được chỉ ra.

Ngoài ra, trong thử nghiệm đánh giá sự ngăn chặn đổi màu bằng cách sử dụng dung dịch hỗn hợp EGT và DTH được trình bày trong Bảng 4, kết quả tương tự như kết quả đã thu được của các mẫu trong Bảng 3. Kết quả được thể hiện trong Fig.3. Cụ thể, có thể khẳng định rằng giá trị A 400 đã được hạ xuống bằng cách giảm nồng độ DTH trong tất cả các nhóm pH, và đặc biệt, xác nhận được rằng sự đổi màu theo thời gian có thể được ngăn chặn đáng kể bằng cách thiết lập tỷ lệ hàm lượng của DTH là bằng hoặc nhỏ hơn 20 phần theo khối lượng đối với 100 phần theo khối lượng của EGT.

(Ví dụ thử nghiệm 3. Thử nghiệm để giảm DTH trong phương pháp lên men EGT)

Sản xuất EGT bằng vi sinh vật đã được thử sử dụng vi khuẩn *E. coli* biểu hiện các gen tổng hợp EGT (tài liệu tham chiếu: WO 2019/163767 A). Kết quả của các nghiên cứu chuyên sâu vô tình phát hiện ra rằng hàm lượng DTH trong dung dịch nuôi cấy đã giảm đáng kể do sử dụng một chủng trong đó gen *metJ* bị phá vỡ. Dưới đây là mô tả về ví dụ này.

Viện Khoa học và Công nghệ Nara đã thu được một chủng vi khuẩn *E. coli*  $\Delta$  *metJ* thiếu gen mã hóa *metJ* được điều chế từ chủng vi khuẩn *E. coli* BW25113 (NBRC103404) theo phương pháp được mô tả trong Mol. Syst. Biol., 2006; 2: 2006.0008 (Baba, T., et al., Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene

knockout mutants: the Keio collection).

Chủng vi khuẩn *E. coli*  $\Delta$  metJ cũng có thể được điều chế, ví dụ, theo phương pháp sau. Cấu tạo được thực hiện bằng một phương pháp thông thường đã biết để xóa từng vùng gen của chủng vi khuẩn *E. coli* BW25113 bằng phương pháp tái tổ hợp tương đồng sử dụng vector chọn lọc ngược (bao gồm gen sacB hoặc gen kháng thuốc) bao gồm trình tự ngược dòng và xuôi dòng của gen metJ. Đối với cấu tạo của chủng bị phá vỡ nói trên, có thể tham khảo M. S. Donnenberg and J. S. Kaper, *Infect. Immun.*, 1991, 4310-4317, H. Mizoguchi et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2007, 71 (12), 2905-2911, và tương tự.

Là một vector sản xuất EGT, pACG-EGT (tài liệu tham chiếu: WO 2019/163767 A) đã được sử dụng. Chủng BW25113 và chủng  $\Delta$  metJ đã được sử dụng, và quá trình biến đổi được thực hiện bằng cách sử dụng pACG-EGT để tạo ra các chủng sản xuất EGT (BW25113/pACG-EGT,  $\Delta$  metJ/pACG-EGT).

Một thử nghiệm sản xuất lên men EGT được thực hiện bằng cách sử dụng chủng sản xuất EGT  $\Delta$  metJ/pACG-EGT như đã xây dựng ở trên. BW25113/pACG-EGT thu được bằng cách đưa pACG-EGT vào chủng BW25113 được sử dụng làm chủng đối chứng. Mỗi gốc glycerol của BW25113/pACG-EGT và  $\Delta$  metJ/pACG-EGT được thêm vào một ống nghiệm bao gồm tetracycline (nồng độ cuối cùng: 10  $\mu$ g/mL) trong 3 mL môi trường LB (10g polypepton, 5g chiết xuất nấm men, 10g môi trường NaCl/1 L), tiếp theo lắc môi trường nuôi cấy ở 30°C, 200 vòng/phút trong 15-18 giờ cho đến khi đạt pha tĩnh để thu được dung dịch trước nuôi cấy. Hơn nữa, dung dịch trước nuôi cấy được thêm vào 5 mL môi trường 2  $\times$  YT (16g polypepton, 10g chiết xuất nấm men, 5g NaCl, 5% Glucoza, 5 mM L-Histidin, 2,5 mM L-Cystine, 5 mM L - Methionine, 10  $\mu$ g/mL tetracycline/1 L môi trường nuôi cấy) trong ống nghiệm  $\Phi$  24 mm để có OD = 0,5, tiếp theo là nuôi cấy chính kèm theo lắc ở 30°C, 300 vòng/phút trong 96 giờ.

Định lượng EGT và DTH được thực hiện như sau. Trong suốt quá trình nuôi cấy chính, 1 mL dung dịch nuôi cấy được lấy mẫu ở 24, 48, 72 và 96 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy để đánh giá mẫu nuôi cấy. Độ đục tế bào vi khuẩn (OD 600) của dung dịch nuôi cấy lấy mẫu được đo, sau đó ly tâm ở tốc độ 14000 vòng/phút trong 10 phút để tách dung dịch nuôi cấy ngoại bào ra khỏi kết tủa (tế bào vi khuẩn). Hàm lượng EGT trong dung dịch nuôi cấy ngoại bào đã tách (mẫu ngoại bào) được đo bằng HPLC. Các điều kiện đo HPLC được thể hiện trong Bảng 5 dưới đây và việc định lượng được thực hiện dựa trên đỉnh EGT xuất hiện trong khoảng thời gian lưu giữ là 10 phút và đỉnh DTH xuất hiện trong khoảng thời gian lưu giữ là 8 phút.

[Bảng 5]

|                     |                                                                                         |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Cột                 | Inertsil HILIC (5 $\mu$ m; 4.6 $\phi$ mm $\times$ 250 mm) sản xuất bởi GL Sciences Inc. |
| Dung môi            | 100 mM ammonium axetat/acetonitril/isopropanol/nước (2 : 82 : 6 : 10)                   |
| Điều kiện Gradien   | Đẳng dòng                                                                               |
| Bước sóng phát hiện | 265 nm                                                                                  |
| Tốc độ dòng         | 1 mL/phút                                                                               |
| Nhiệt độ cột        | 40°C                                                                                    |

Kết quả kiểm tra lượng sản xuất EGT và DTH từ WT/pACG-EGT và  $\Delta$  metJ/pACG-EGT được nuôi cấy như được thể hiện trong các Fig.4 và 5, thấy rằng khi chủng  $\Delta$  metJ được sử dụng, lượng DTH trong dung dịch nuôi cấy ở 96 giờ giảm đáng kể xuống khoảng 1/7 so với WT.

## **YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Chế phẩm chứa L-ergothionin và N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin, trong đó hàm lượng của N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin là bằng hoặc ít hơn 50 phần theo khối lượng so với 100 phần theo khối lượng của L-ergothionin.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó hàm lượng của N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin là bằng hoặc nhiều hơn 0,0001 phần theo khối lượng so với 100 phần theo khối lượng của L-ergothionin.
3. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 hoặc 2, trong đó hàm lượng của N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin là bằng hoặc nhiều hơn 0,05 phần theo khối lượng so với 100 phần theo khối lượng của L-ergothionin.
4. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa L-ergothionin và N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin bị ngăn chặn sự đổi màu, phương pháp này bao gồm bước thiết lập hàm lượng của N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin là bằng hoặc ít hơn 50 phần theo khối lượng so với 100 phần theo khối lượng của L-ergothionin.
5. Phương pháp tạo hiệu quả ngăn chặn sự đổi màu cho chế phẩm chứa L-ergothionin và N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin, phương pháp này bao gồm bước thiết lập hàm lượng của N,N-dimetyl-L-2-thiohistidin là bằng hoặc ít hơn 50 phần khối lượng so với 100 phần khối lượng của L-ergothionin.

Fig.1

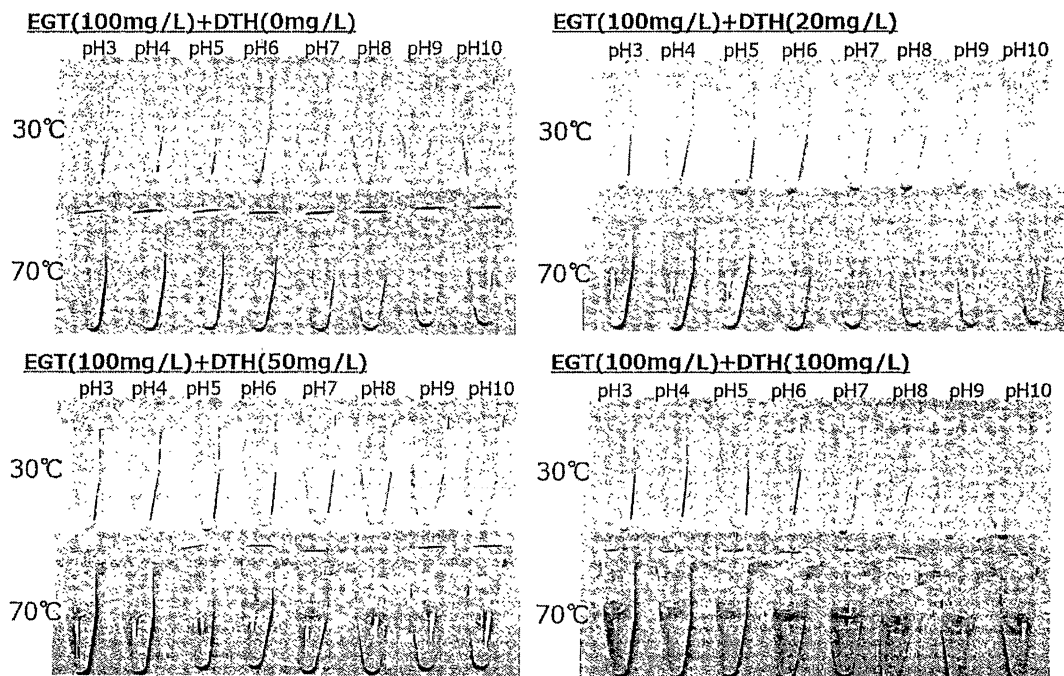


Fig.2

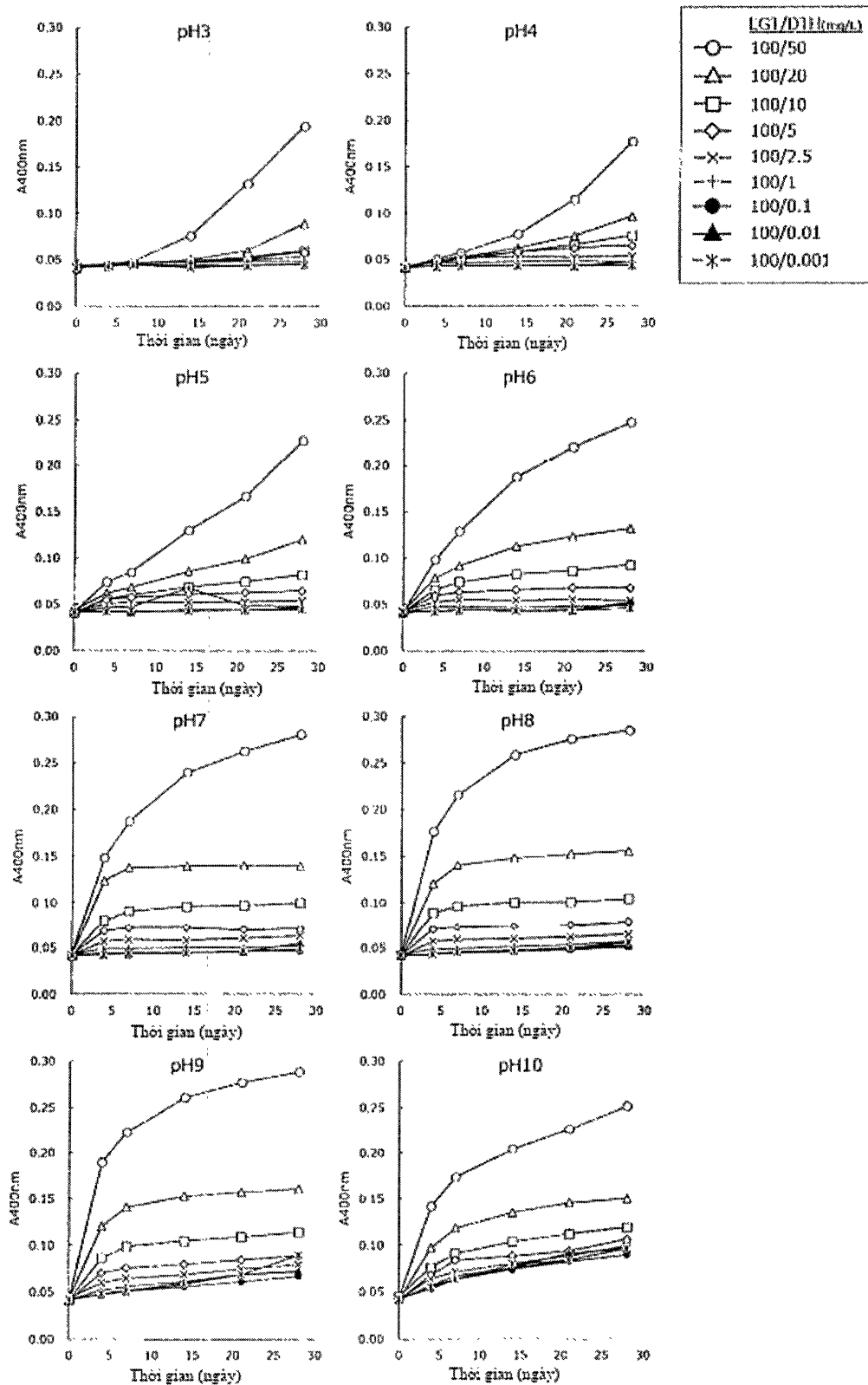


Fig.3

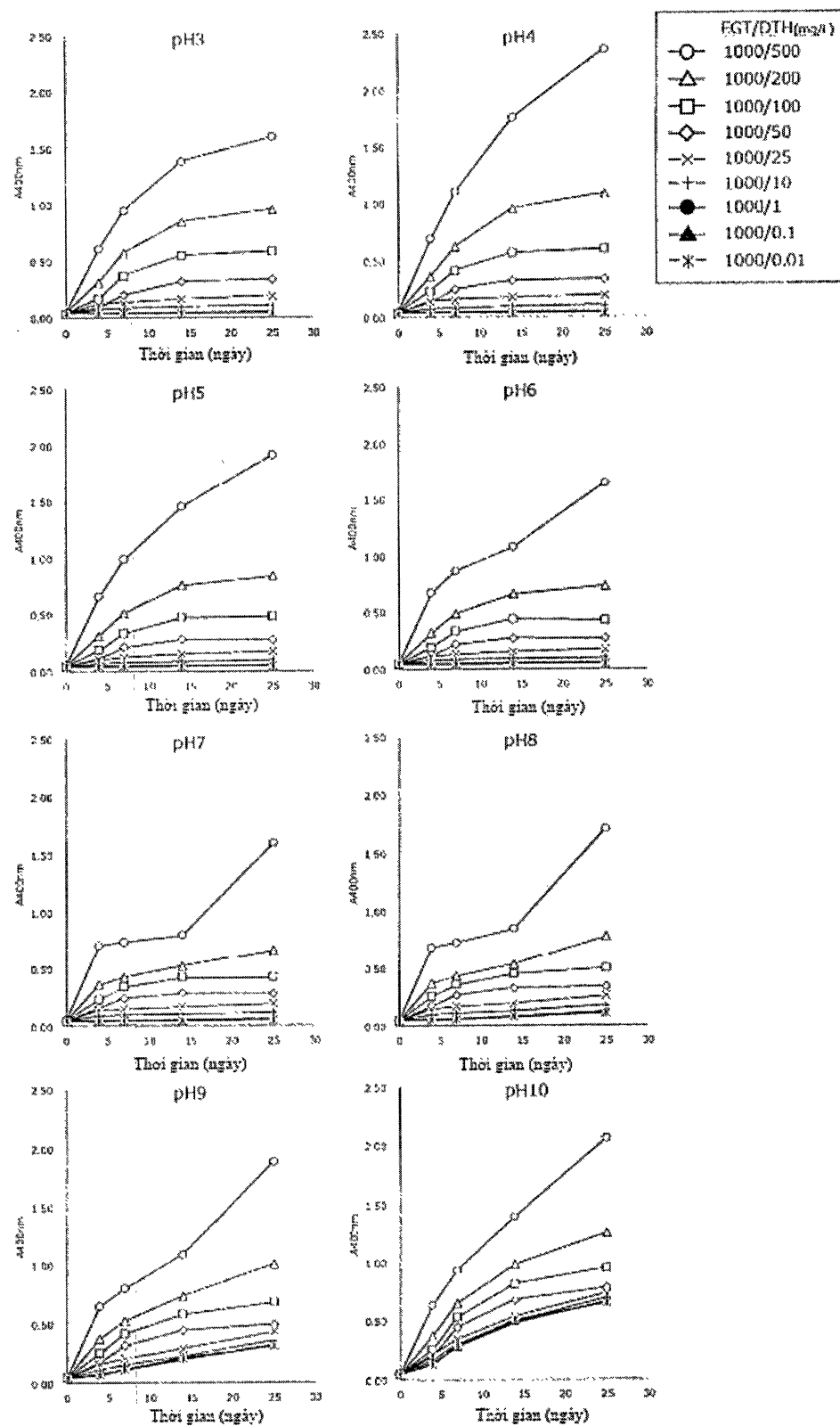


Fig.4

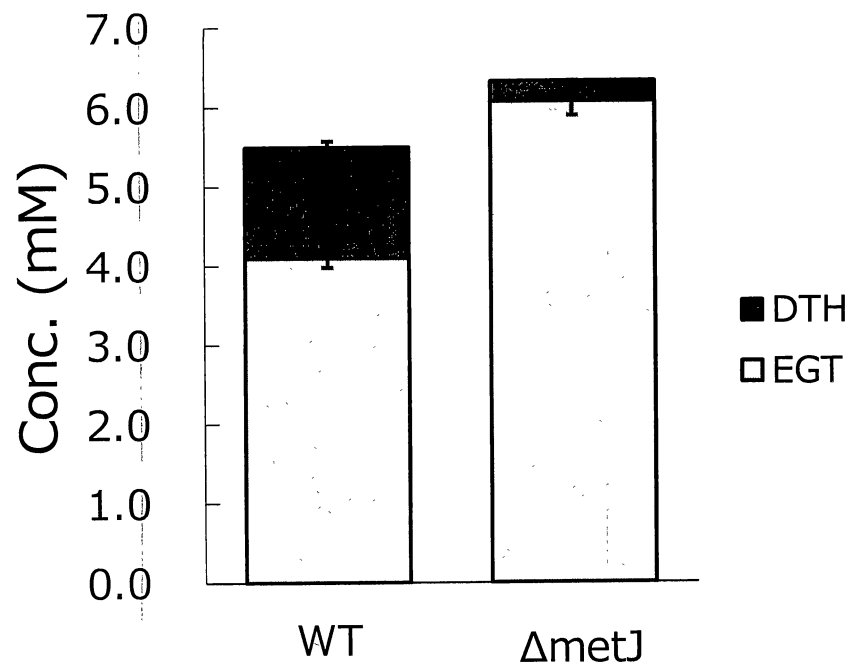


Fig.5

