



(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



1-0045996

(51)^{2020.01} A23L 33/115; A23L 33/19; A23L 33/00 (13) B

(21) 1-2022-00882 (22) 22/07/2020
(86) PCT/EP2020/070613 22/07/2020 (87) WO2021/013862 28/01/2021
(30) 19187688.7 23/07/2019 EP; 20175745.7 20/05/2020 EP
(45) 26/05/2025 446 (43) 27/06/2022 411A
(73) FRIESLANDCAMPINA NEDERLAND B.V. (NL)
Stationsplein 4, 3818 LE Amersfoort, the Netherlands
(72) VAN NEERVEN, Ruprecht Jules Joost (NL).
(74) Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

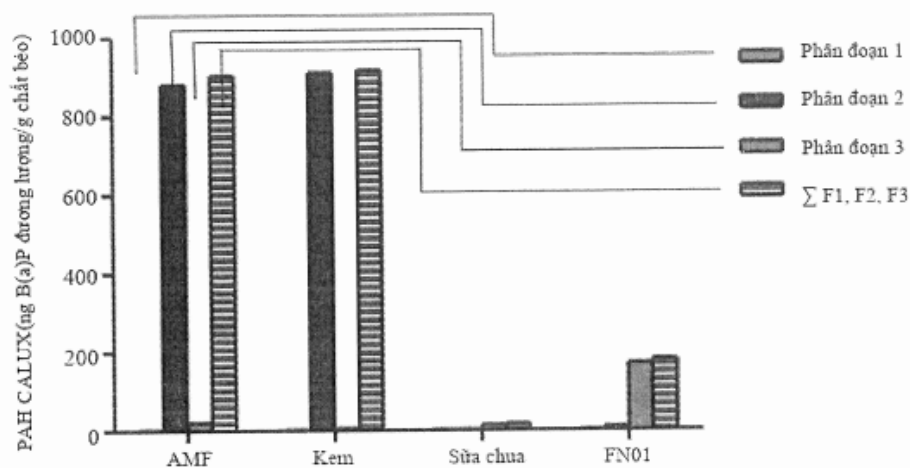
(54) CHẾ PHẨM DINH DƯỠNG BAO GỒM CHẤT BÉO SỮA VÀ GLOBULIN MIỄN DỊCH

(21) 1-2022-00882

(57)

Sáng chế đề cập đến chế phẩm dinh dưỡng tổng hợp bao gồm: chất béo sữa động vật nhai lại trong đó chất béo sữa có khả năng hoạt hóa thụ thể aryl hydrocacbon (AhR) trong thử nghiệm hoạt tính AhR; và globulin miễn dịch động vật nhai lại.

Hình 3



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế được bộc lộ ở đây đề cập đến lĩnh vực các chế phẩm dinh dưỡng. Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến chế phẩm dinh dưỡng bao gồm chất béo sữa động vật nhai lại và globulin miễn dịch động vật nhai lại.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các chế phẩm dinh dưỡng cho trẻ sơ sinh nhằm mục đích giống với sữa mẹ nhiều nhất có thể, vì sữa mẹ nói chung được xem là nguồn dinh dưỡng lý tưởng cho trẻ sơ sinh lên đến ít nhất 6 tháng tuổi. Mặc dù sữa công thức cho trẻ sơ sinh đã trở nên ngày càng tốt hơn theo thời gian, vẫn có những khác biệt quan trọng giữa sữa mẹ và sữa công thức cho trẻ sơ sinh.

Các sự kết hợp của chất béo sữa và chất béo thực vật đã được áp dụng trong các sản phẩm dinh dưỡng đầu đời bởi vì có nhu cầu thu được chế phẩm axit béo đúng của công thức dinh dưỡng đầu đời. Tuy nhiên, các sản phẩm dinh dưỡng đầu đời với chất béo thực vật như nguồn chất béo duy nhất là thường xuyên hơn.

Tuyến ruột chứa bề mặt lớn nhất của cơ thể giữa một người và môi trường bên ngoài anh ấy hoặc cô ấy. Nó ngăn ngừa sự rò rỉ của thực phẩm và các thành phần vi sinh vào các mô, mà có thể làm nảy sinh sự viêm và các phản ứng có hại cho thực phẩm (bất dung nạp và dị ứng thực phẩm). Sự phức tạp của chức năng của nó là hiển nhiên khi nghĩ rằng tại cùng một lúc ruột phải phục vụ hai chức năng trái ngược; khả năng thẩm chọn lọc các dinh dưỡng cần thiết từ lòng ruột vào hệ tuần hoàn và vào môi trường bên trong nói chung và, mặt khác, việc ngăn ngừa sự xâm nhập của các thực thể có hại bao gồm các vi sinh vật, các kháng nguyên niêm mạc, các chất gây dị ứng thực phẩm, và các tác nhân tiền viêm niêm mạc. Chức năng sau được biết như là chức năng rào cản.

Chức năng rào cản ruột được bao gồm bởi bốn tuyến phòng thủ chính: 1) Rào cản sinh học, mà được làm từ hệ sinh vật đường ruột thông thường (hệ vi sinh vật đường ruột) chịu trách nhiệm cho việc kháng tạo khuẩn lạc; 2) Rào cản miễn dịch, mà bao gồm mô bạch huyết liên kết với ruột (GALT), các tế bào T điều hòa và hiệu ứng,

các tế bào (huyết tương) B tạo ra IgA, các tế bào bạch huyết bẩm sinh nhóm 3, và, các đại thực bào cư trú và các tế bào đuôi gai ở lớp đệm niêm mạc; 3) Rào cản cơ học, bao gồm lớp nhày và các tế bào biểu mô ruột niêm mạc kín. Các tế bào biểu mô tiến tới tiếp xúc gần nhất có thể ở phần đỉnh nhất của các màng tế bào bên ("các điểm chạm") bởi các cấu trúc đặc hiệu có tên gọi "các nút giao chặt" (TJs), mà liên kết nối các tế bào và giới hạn việc vận chuyển các ion, các phân tử và các tế bào thông qua không gian giữa tế bào, và 4) bên cạnh rào cản vật lý của chất nhày và lớp biểu mô, rào cản hóa học tồn tại bao gồm các bài tiết tiêu hóa, các peptit kháng khuẩn, và các sản phẩm tế bào khác có nguồn gốc từ các tế bào biểu mô và các tế bào miễn dịch trong niêm mạc bên dưới (các cytokin, các trung gian gây viêm v.v.).

Người lớn tuổi có số lượng gia tăng các nhiễm trùng và các vấn đề đường ruột. Điều này thường liên quan tới chức năng rào cản suy giảm ở người lớn tuổi. Tuy nhiên, trong sự kết hợp với bệnh mãn tính, ví dụ đái tháo đường loại 2, hoặc COPD, chức năng rào cản ruột bị xâm phạm ở người lớn tuổi (Valentini et al., 2014). Điều này có thể giải thích một phần các nhiễm trùng và không thoải mái của tuyến GI tăng lên được thấy ở người lớn tuổi (Hall et al., 2005; Man et al., 2014).

Trong thực tế, chức năng bị suy giảm của chức năng rào cản ruột – một cách độc lập với tuổi già - đã được ghi nhận cho các rối loạn ruột như nhiễm trùng đường ruột và tiêu chảy, bệnh Celiac, bệnh viêm ruột, hội chứng ruột kích thích, dị ứng (thực phẩm), nhưng cũng cả cho các rối loạn ngoài ruột như viêm khớp, béo phì, và đái tháo đường loại 1 và 2 (Bischoff 2011; 2014; Turner 2009). Liên kết giữa chức năng rào cản ruột và các bệnh mãn tính là ít nhất liên quan một phần với thành phần vi sinh vật và việc sản xuất chuỗi axit béo ngắn (SCFA) bị giảm. SCFA đã được biết rõ là tăng cường chức năng rào cản trong các tế bào biểu mô (D'Souza et al 2017; Bach Knudsen 2018). Các SCFA là các axit béo với các đuôi béo ngắn bao gồm từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Chúng được sản xuất khi chất xơ, các polysacarit không phải tinh bột, như GOS được lên men trong ruột.

Thụ thể aryl hydrocarbon (AhR) được biết đến như là thụ thể cho dioxin, và đã được sử dụng để sàng lọc các thành phần này trong thực phẩm. Thụ thể này có thể đóng vai trò trong chức năng rào cản ruột và việc giám sát miễn dịch ở ruột (Li 2011). Chuột bất hoạt AhR có chức năng rào cản bị ảnh hưởng và sự chuyển vị được tăng cường của vi khuẩn đường ruột xảy ra (Li 2011). Các phối tử cho AhR điển hình là các

chất chuyển hóa tryptophan có nguồn gốc từ vi sinh vật hoặc các thành phần được tìm thấy trong một số thực vật như súp lơ trắng và súp lơ xanh. Một số phối tử AhR đã được mô tả là cũng có mặt trong sữa mẹ.

Gần đây, việc kích hoạt AhR dẫn đến việc sản xuất IL-22 cũng được liên kết để ngăn ngừa loét đường loại 2 (Natividad 2018).

Trong bảng (tiền) loét đường, các sự suy giảm đã được ghi nhận trong một số axit béo chuỗi ngắn (SCFA), chủ yếu là butyrat, tạo ra vi khuẩn đường ruột. Ngoài ra, thành phần vi sinh vật đã có liên quan tới việc glucose máu cao hơn ở người lớn tuổi, cũng như với hội chứng chuyển hóa (Wang et al., 2012; Zhang et al., 2013).

Hầu hết sữa sẵn có thương mại của các động vật nhai lại là sữa bò. Sữa bò chứa nhiều thành phần mà có các đặc tính điều hòa miễn dịch và kháng khuẩn. Các globulin miễn dịch của bò (bIg), cụ thể là IgG của bò (bIgG), đã được nghiên cứu từ những năm 1970 về các hiệu quả tiềm năng của chúng về sự miễn dịch và nhiễm trùng ở người.

Sữa bò, sữa non và huyết thanh chứa ba loại globulin miễn dịch: Globulin miễn dịch G (IgG), IgA và IgM.

Trong IgG sữa bò là loại tương tự chính có mặt, đặc biệt trong sữa non, tiếp theo sau bởi IgA và IgM. IgA có mặt trong sữa và sữa non dưới dạng IgA tiết (sIgA). Trong IgG sữa già là loại tương tự chính, trong đó sIgA và IgM có mặt ở các mức thấp hơn khoảng 5-10 lần. Nồng độ của IgG trong sữa già là khoảng 200-700 µg/ml. Trong sữa non các mức IgG là cao hơn nhiều, đạt tới 50-100 mg/ml trong những ngày đầu sau khi sinh.

Các globulin miễn dịch của bò như IgG có thể gắn với nhiều vi khuẩn và virus, bao gồm các tác nhân gây bệnh ở người nhờ đó cung cấp sự ngăn ngừa đối với sự chuyển đổi vi khuẩn và sự rò rỉ của các thành phần vi khuẩn trên biểu mô ruột, điều hòa sự biểu hiện của các protein nút giao chặt biểu mô, và ức chế sự viêm ruột.

Vai trò giảm thiểu tiềm năng của bIgG trong các đáp ứng viêm ruột được kết hợp với chức năng rào cản ruột bị suy giảm, và các hiệu quả của các globulin miễn dịch và sữa non đã được đặt ra trong các mô hình ở người và động vật đối với viêm ruột hoại tử (NEC), hội chứng ruột kích thích (IBS), bệnh viêm ruột (IBD), tổn thương

ruột bị gây ra bởi thuốc kháng viêm không phải steroid (NSAID), và nội độc tố sau phẫu thuật.

Các globulin miễn dịch có thể được phân lập hoặc được cô từ sữa hoặc sữa non sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực (EP2280999, WO 94/13148, WO 01/03515 hoặc từ Heino et al, Functional properties of native and cheese whey protein concentrate powders, International Journal of Dairy Technology, Tập 60, Số 4, 11/2007, trang 277-285).

Khi tạo ra công thức cho trẻ sơ sinh hoặc sản phẩm sữa khác, các yêu cầu pháp lý gia nhiệt công thức cho các lý do an toàn, bởi đó gây ra sự biến tính của các globulin miễn dịch có mặt trong chế phẩm bởi vì các globulin miễn dịch là nhạy cảm với nhiệt. Chúng bắt đầu biến tính ở các nhiệt độ là khoảng 70°C hoặc cao hơn. Ở độ pH axit (< 5,0) sự nhạy cảm đối với sự biến tính được biết là thậm chí còn cao hơn.

Để được sử dụng như thành phần hoạt tính prophylactic ở các sản phẩm thực phẩm của người, lượng đáng kể của các globulin miễn dịch của bò phải được tiêu thụ ở dạng nguyên vẹn của nó và cũng phải có khả năng sống sót khi đi qua dạ dày vào ruột non, hoặc thậm chí xuyên suốt toàn bộ tuyến dạ dày ruột (GI).

Ngạc nhiên rằng, đã phát hiện ra rằng chất béo sữa của bò khác với chất béo thực vật ở chỗ nó bao gồm các phối tử khác mà có thể kích hoạt thụ thể aryl hydrocarbon mạnh mẽ hơn (AhR). (Việc kích hoạt của) thụ thể AhR được kết hợp ngược với nhiễm trùng đường ruột và tiêu chảy, bệnh viêm ruột, hội chứng ruột kích thích, bệnh Celiac, cũng như dị ứng thực phẩm, và các bệnh không lây nhiễm như đái tháo đường loại 2. Để thúc đẩy chức năng rào cản ruột, chế phẩm dinh dưỡng bao gồm chất béo sữa động vật nhai lại và các globulin miễn dịch được đề xuất, tốt hơn là cũng chứa một hoặc nhiều trong số các oligosacarit, các nguồn thức ăn cho lợi khuẩn (prebiotic), hoặc các lợi khuẩn ở sữa mẹ. Thành phần như vậy cung cấp chức năng gấp hai hoặc thậm chí gấp ba lần cho chức năng rào cản ruột: Các thành phần hoạt hóa AhR có mặt trong chất béo sữa, thúc đẩy việc sản xuất và tiết của các peptit kháng khuẩn vào lòng ruột b) cung cấp nguyên vẹn về mặt chức năng các globulin miễn dịch ở bò, như IgG, ngăn ngừa sự nhiễm trùng và sự xảy ra của việc viêm và tổn thương mô như là kết quả của việc nhiễm trùng và/hoặc sự rò rỉ của các thành phần vi khuẩn vào niêm mạc và tùy chọn c) làm tăng việc sản xuất của các axit béo chuỗi ngắn bởi vi sinh

vật bằng việc dùng các oligosacarit không tiêu hóa được hoặc các nguồn thức ăn cho lợi khuẩn. Các chế phẩm với IgG ở bò tốt hơn là cũng chứa các protein sữa có hoạt tính sinh học khác mà có thể tác động chức năng rào cản, ví dụ, lactoferin hoặc TGF- β .

Chế phẩm theo sáng chế là đặc biệt hữu dụng cho các trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ do chúng dễ phát triển các nhiễm trùng ở đường dạ dày ruột. Chức năng rào cản ruột tốt là sự quan trọng chủ chốt để bảo vệ chúng chống lại sự nhiễm trùng. Chế phẩm theo sáng chế là cũng đặc biệt hữu dụng cho người lớn tuổi sức khỏe đường ruột bị tổn hại ruột bị suy giảm hoặc các sự không thoải mái liên quan đến ruột khác như các sự nhiễm trùng hoặc các rối loạn viêm. Ngoài ra, hoặc thay vào đó, chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để giảm bớt tác động của đái tháo đường loại 2.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo đó, trong khía cạnh thứ nhất sáng chế đề cập đến chế phẩm dinh dưỡng tổng hợp bao gồm:

- i. chất béo sữa động vật nhai lại trong đó chất béo sữa có khả năng hoạt hóa thụ thể aryl hydrocacbon (AhR) trong thử nghiệm hoạt tính AhR; và
- ii. globulin miễn dịch động vật nhai lại;

khác biệt ở chỗ ít nhất 30% của globulin miễn dịch động vật nhai lại là không bị biến tính.

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng của chế phẩm này trong công thức cho trẻ sinh non, công thức cho trẻ sơ sinh, công thức nối tiếp hoặc công thức cho trẻ nhỏ, hoặc thay vào đó ở công thức cho người trưởng thành hoặc người lớn tuổi. Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng của chế phẩm này để điều trị bất kỳ một hoặc nhiều trong số các chỉ định được lựa chọn từ nhóm bao gồm chức năng rào cản ruột bị suy giảm, viêm ruột hoại tử (NEC), hội chứng ruột kích thích (IBS), bệnh viêm ruột (IBD), tổn thương ruột bị gây ra bởi thuốc kháng viêm không phải steroid (NSAID), và nội độc tố sau phẫu thuật, hoặc để điều trị đái tháo đường loại 2. Một cách tương tự, sáng chế đề cập đến chế phẩm này để sử dụng trong việc điều trị của bất kỳ một hoặc nhiều trong số các chỉ định được lựa chọn từ nhóm bao gồm chức năng rào cản ruột bị suy giảm, viêm ruột hoại tử (NEC), hội chứng ruột kích thích (IBS), bệnh viêm ruột (IBD),

tổn thương ruột bị gây ra bởi thuốc kháng viêm không phải steroid (NSAID), và nội độc tố sau phẫu thuật; hoặc để điều trị đái tháo đường loại 2.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Trong hình 1 A-C, việc phân tích PAH CALUX của các tiêu chuẩn tăng vọt (A. tiêu chuẩn PCB126, B. tiêu chuẩn hỗn hợp PAH, C. tiêu chuẩn I3C) tiếp theo sự phân đoạn trên cột silic oxit khử hoạt hóa được thể hiện.

Trong hình 2, hoạt tính PAH CALUX được phân đoạn như được xác định trong 3 sản phẩm sữa bò và 1 chất béo thực vật được thể hiện (A. tiêu chuẩn PCB126, B. tiêu chuẩn hỗn hợp PAH, C. tiêu chuẩn I3C).

Hoạt tính PAH CALUX tổng (tổng của hoạt tính PAH trong phân đoạn 1, 2 và 3) được thể hiện trên hình 3. Phân đoạn 1 được thể hiện ở bên trái, phân đoạn 2 là thứ hai từ bên trái, phân đoạn 3 là thứ hai từ bên phải và tóm tắt của tất cả hoạt tính trong sản phẩm được thể hiện ở bên phải.

Việc gắn phối tử AhR và hoạt tính PAH CALUX sau đó trong AMF và kem chủ yếu là các kết quả của việc gắn của các phối tử AhR “thông thường” không ổn định chuyển hóa trong đó việc gắn phối tử AhR được quan sát thấy và hoạt tính PAH CALUX sau đó trong FN01 chủ yếu là kết quả của sự có mặt của các phối tử AhR “tự nhiên” không ổn định chuyển hóa như là các dẫn xuất indol và các chất chuyển hóa tryptophan. Ở sữa chua, chỉ hoạt tính PAH CALUX nhỏ được quan sát thấy.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Thuật ngữ "sự điều trị", liên quan đến bệnh hoặc rối loạn nhất định, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, việc ức chế bệnh hoặc rối loạn, ví dụ, làm ngừng sự phát triển của bệnh hoặc rối loạn; làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn, ví dụ, gây ra sự thoái triển của bệnh hoặc rối loạn; hoặc làm thuyên giảm tình trạng bệnh gây ra bởi hoặc bắt nguồn từ bệnh hoặc rối loạn, ví dụ, làm thuyên giảm, ngăn ngừa hoặc điều trị triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn.

Thuật ngữ "sự ngăn ngừa" liên quan đến bệnh hoặc rối loạn nhất định có nghĩa là ngăn ngừa sự khởi phát của sự phát triển bệnh nếu chưa xảy ra, ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn khỏi xảy ra ở đối tượng mà có thể có khuynh hướng bị rối loạn hoặc

bệnh nhưng chưa được chẩn đoán là mắc rối loạn hoặc bệnh, và/hoặc ngăn ngừa sự phát triển bệnh/rối loạn khác nếu đã có mặt.

Cũng cần hiểu rằng sáng chế này không giới hạn ở các phương án và phương pháp cụ thể được mô tả trong bản mô tả này, vì các thành phần và/hoặc điều kiện cụ thể có thể, tất nhiên, thay đổi. Ngoài ra, thuật ngữ được sử dụng ở đây chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể của sáng chế và không dự định làm giới hạn theo cách bất kỳ.

Cần lưu ý rằng, như được sử dụng ở đây và các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, các danh từ số ít “một” bao gồm sự tham chiếu đến nghĩa số nhiều trừ khi ngữ cảnh chỉ ra rõ ràng là khác. Ví dụ, việc đề cập đến thành phần ở số ít được dự định là bao gồm nhiều thành phần.

Sẽ được hiểu rằng theo sáng chế, tham chiếu bất kỳ đến khối lượng, tỷ lệ khối lượng, và tương tự là đề cập đến chất khô, cụ thể là chất khô của chế phẩm, trừ khi được nêu rõ khác đi.

Trừ khi có chỉ dẫn khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học dùng ở đây nhìn chung có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế này thuộc về.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "bao gồm", mà đồng nghĩa với "có chứa" hoặc "chứa", có nghĩa mở, và không loại trừ (các) phần tử, (các) thành phần hoặc (các) bước phương pháp khác không được chỉ ra, trong khi đó thuật ngữ "gồm" có nghĩa đóng, mà loại trừ phần tử, bước, hoặc thành phần bổ sung bất kỳ mà không được chỉ ra rõ ràng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "về cơ bản gồm" là thuật ngữ mở một phần, mà không loại trừ (các) phần tử, (các) bước, hoặc (các) thành phần khác không được chỉ ra, miễn là (các) phần tử, (các) bước, hoặc (các) thành phần khác này không ảnh hưởng về chất đến đặc tính cơ bản và mới của sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "bao gồm" do đó bao gồm thuật ngữ “gồm”, cũng như thuật ngữ "về cơ bản gồm". Do đó, thuật ngữ "bao gồm", trong đơn này, có nghĩa cụ thể hơn là bao hàm thuật ngữ "gồm", và thuật ngữ "về cơ bản gồm".

Trong toàn bộ đơn này, khi đề cập đến các tài liệu công bố, việc bộc lộ các tài liệu công bố này với toàn bộ nội dung của chúng được kết hợp vào đơn này bằng cách viện dẫn nhằm mô tả đầy đủ hơn tình trạng kỹ thuật của lĩnh vực mà sáng chế này thuộc về.

Thuật ngữ "đối tượng" như được sử dụng ở đây là để chỉ người. Thuật ngữ "đối tượng" dùng để chỉ cả nam giới và nữ giới trừ khi một giới tính được chỉ rõ một cách cụ thể. Đối tượng người có thể là đối tượng trẻ sơ sinh, thiếu niên, thanh niên, người trưởng thành hoặc người lớn tuổi.

Như được sử dụng ở đây, "dùng chế phẩm cho người" bao gồm bước cho người như trẻ nhỏ, trẻ em, hoặc trẻ sơ sinh ăn, nó cũng bao gồm người ăn hoặc uống chế phẩm này. Đường dùng được ưu tiên là đường miệng.

Các viết tắt thông thường cho các đơn vị khác nhau được sử dụng, ví dụ, "mg" được sử dụng để biểu thị miligam, trong khi "μg" biểu thị microgam.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chế phẩm dinh dưỡng tổng hợp" hoặc "chế phẩm tổng hợp" là để chỉ chế phẩm dinh dưỡng được sản xuất bởi người. "Chế phẩm tổng hợp" được điều chế nhân tạo và tốt hơn là có nghĩa là chế phẩm bao gồm ít nhất một hợp chất mà được sản xuất ex vivo theo đường hóa học và/hoặc theo đường sinh học, ví dụ bởi phản ứng hóa học, phản ứng enzym; hoặc sản phẩm mà được phân lập hoặc được cô từ hỗn hợp của các sản phẩm. Việc cô được định nghĩa là sự tăng về % theo khối lượng của sản phẩm, trên cơ sở thành phần khô, đối với tổng thành phần mà nó ở trong. Chế phẩm tổng hợp là không tương đồng với chế phẩm có mặt trong tự nhiên, nghĩa là nó không phải là sữa được sản xuất bởi động vật nhai lại như là sữa bò, sữa dê hoặc sữa cừu. Ngoài ra, trong một số phương án, các chế phẩm tổng hợp có thể bao gồm một hoặc nhiều thành phần hoạt tính được hoặc dinh dưỡng mà không tác động tiêu cực đến hiệu quả của các hợp chất được đề cập ở trên. Một số phương án không giới hạn của chế phẩm tổng hợp theo sáng chế cũng được mô tả dưới đây.

Hoạt tính sinh học của protein phụ thuộc không chỉ vào thứ tự của các amino axit (cấu trúc bậc một) nhưng cũng cả cách nó được cuộn (cấu trúc 3D). Protein "không bị biến tính", hoặc protein "hoạt tính chức năng" như được sử dụng ở đây, có nghĩa là protein là không bị biến tính hoặc bị tháo cuộn ví dụ như là kết quả của việc xử lý nhiệt, và nó có thể được phát hiện bởi các phương pháp mà phân biệt giữa các

globulin miễn dịch nguyên vẹn và bị biến tính, như là các thử nghiệm ELISA mà có thể phân biệt giữa IgG trong bột sữa UHT được tiệt trùng (mà không được phát hiện thấy), và IgG trong sữa tươi (mà được phát hiện thấy). Globulin miễn dịch động vật nhai nguyên vẹn về chức năng, không bị biến tính có thể được thể hiện là gắn với các vi khuẩn hoặc các virus gây bệnh như được mô tả bởi den Hartog et al (Den Hartog et al 2014). Điều này phân biệt các globulin miễn dịch này với các globulin miễn dịch bị biến tính mà không thể gắn với các kháng nguyên tương ứng của chúng và không thể có hoạt tính chức năng (Ohnuki 2005). Như được sử dụng ở đây, globulin miễn dịch được gọi là "hoạt tính sinh học", my đều được gọi là globulin miễn dịch là nguyên vẹn, hoặc là nguyên vẹn về chức năng, nói cách khác globulin miễn dịch là không bị biến tính.

Trong khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chế phẩm dinh dưỡng tổng hợp bao gồm:

- i. chất béo sữa động vật nhai lại trong đó chất béo sữa có khả năng hoạt hóa thụ thể aryl hydrocarbon (AhR) trong thử nghiệm hoạt tính AhR; và
- ii. globulin miễn dịch động vật nhai lại;

khác biệt ở chỗ ít nhất 30% của globulin miễn dịch động vật nhai lại là không bị biến tính. Tốt hơn là, ít nhất 40% của globulin miễn dịch động vật nhai lại là không bị biến tính, tốt hơn nữa là ít nhất 50%, ví dụ 60%, đặc biệt tốt hơn là, ít nhất 70% là không bị biến tính, tốt nhất là ít nhất 80% là không bị biến tính.

Thuật ngữ "chất béo sữa động vật nhai lại" như được sử dụng ở đây là để chỉ nguồn của chất béo sữa từ sữa của các động vật nhai lại, tốt hơn là chất béo sữa của bò. Nguồn chất béo sữa về nguyên tắc có thể là nguồn chất béo sữa động vật nhai lại sẵn có bất kỳ, như là sữa nguyên phần, kem, chất béo sữa khan (AMF) hoặc các phân đoạn chất béo sữa là kết quả từ việc phân đoạn khô, chiết xuất CO₂ tới hạn hoặc các phương pháp phân đoạn khác đã biết trong lĩnh vực. Tuy nhiên, đã phát hiện ra rằng đặc biệt thích hợp để sử dụng sữa toàn phần và/hoặc kem làm nguồn chất béo từ sữa. Tốt hơn là chất béo sữa động vật nhai lại là chất béo sữa của bò và chất béo được lựa chọn từ nhóm bao gồm sữa nguyên phần, kem, và chất béo sữa khan (AMF). Tốt hơn nữa là, loài bò là bò. Trong một phương án, chất béo sữa là sữa nguyên phần hoặc kem ở bò. Trong một phương án, chất béo sữa động vật nhai lại là sữa nguyên phần ở bò, trong

một phương án khác chất béo sữa động vật nhai lại là kem ở bò, trong một phương án khác nữa chất béo sữa động vật nhai lại là AMF ở bò. Sữa của động vật nhai lại được sử dụng để thu được chất béo sữa động vật nhai lại từ, và chất béo sữa động vật nhai lại không nên tiếp xúc với các nhiệt độ cao hoặc độ pH axit (độ pH < 5,0) do điều này sẽ làm giảm khả năng hoạt hóa thụ thể AhR. Trong bối cảnh này, nhiệt độ trên 80°C được xem là nhiệt độ cao, tốt hơn là nhiệt độ không vượt quá 75°C, tốt hơn là nó không vượt quá 74°C, đặc biệt tốt hơn là, nó không vượt quá 72°C, tốt nhất là nó không vượt quá 69°C. Tương tự như vậy, khoảng thời gian trong đó sữa hoặc chất béo sữa bị tiếp xúc với nhiệt độ được tăng cao nên càng ngắn càng tốt. Theo đó, các kỹ thuật thông thường có thể được áp dụng để sản xuất các nguồn chất béo sữa khác nhau như sữa nguyên phần, kem, chất béo sữa khan (AMF) hoặc các phân đoạn chất béo sữa là kết quả từ việc phân đoạn khô, chiết xuất CO₂ tới hạn hoặc các phương pháp phân đoạn khác. Nếu bước tiệt trùng là cần thiết ví dụ để đạt các yêu cầu pháp lý, việc này là có thể, nhưng việc tiếp xúc không cần thiết với các nhiệt độ cao nên được tránh và do đó chất béo sữa hoặc nguồn chất béo sữa nên được duy trì ở các nhiệt độ dưới 22°C tốt hơn là dưới 10°C, tốt hơn nữa là dưới 5°C càng nhiều càng tốt. Mặt khác, chất béo sữa động vật nhai lại có thể được thu nhận từ sữa tươi.

Cần hiểu rằng các sự kết hợp nhiệt độ và thời gian để xử lý chất béo sữa hoặc để xử lý sữa mà chất béo sữa có nguồn gốc từ đó, hoặc thành phần bất kỳ khác của chế phẩm theo sáng chế, nên được tiến hành các điều kiện tiệt trùng theo pháp lý nếu được yêu cầu trong ứng dụng của sản phẩm theo sáng chế, ví dụ như được xác định trong quy định (EC) số 852/2004 của nghị viện châu Âu và của hội đồng ngày 29/04/2004 về vệ sinh thực phẩm. Ví dụ, các điều kiện tiệt trùng theo pháp lý bao gồm việc xử lý bao gồm nhiệt độ là ít nhất 60°C trong ít nhất 30 phút hoặc bao gồm nhiệt độ cao hơn trong thời gian ngắn hơn như là ít nhất 72°C trong ít nhất 15 giây hoặc kết hợp bất kỳ khác của các điều kiện thời gian-nhiệt độ mà dẫn đến hiệu quả tương đương ví dụ như có thể được thể hiện bởi thử nghiệm phosphatase âm tính ngay lập tức sau việc xử lý này. Các thử nghiệm và các kỹ thuật tiệt trùng này là đã biết trong lĩnh vực. Nếu thành phần chất béo sữa chưa được kết hợp với thành phần lg, các nhiệt độ trên 80°C có thể là có thể trong khoảng thời gian giới hạn (giây) để đạt các yêu cầu quy định. Các điều kiện thích hợp có thể được xác định một cách dễ dàng sử dụng thử nghiệm AhR ví dụ sinh thử nghiệm gen báo cáo CALUX® PAH trên cơ sở AhR như được bộc lộ trong ví

dụ 1.

Các quy trình để điều chế bột ví dụ bột sữa nguyên phân, là đã biết trong lĩnh vực ví dụ xịt khô hoặc đông khô ví dụ như được mô tả trong Dairy Science and Technology 2nd Edition (P. Walstra, J.T.M. Wouters and T.J. Geurts, CRC Press Taylor&Francis 2006, chapter 20. Các quy trình như vậy là linh hoạt và có thể được sử dụng ở các nhiệt độ thấp hoặc cao hơn 80°C.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được điều chế bằng việc trộn lẫn phân đoạn sữa và phân đoạn globulin miễn dịch trong trạng thái lỏng hoặc khô. Nếu được trộn lẫn trong trạng thái lỏng, thì nó có thể được làm khô sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Chất béo sữa ở động vật nhai lại (ví dụ bò) có thể được áp dụng trong các chế phẩm dinh dưỡng trong đó giữa 5% và 100% của tổng hàm lượng chất béo trong chế phẩm được làm từ chất béo sữa của bò, tốt hơn là giữa 10% và 90% chất béo trong chế phẩm được cấu thành bởi chất béo sữa, tốt hơn nữa là từ 20 đến 80% của tất cả chất béo trong chế phẩm là chất béo sữa của bò, tốt nhất là, từ 20 đến 60% của tất cả chất béo trong chế phẩm dinh dưỡng là chất béo sữa của bò. Trong một phương án khác, lượng chất béo sữa của bò trong chế phẩm theo sáng chế là giữa 45 và 55% tổng lượng của chất béo (nghĩa là của tất cả chất béo) trong chế phẩm.

Như được thể hiện trong các ví dụ, chất béo sữa có các phối tử khác ngoài chất béo thực vật để hoạt hóa AhR. Do đó, trong một phương án, chế phẩm theo sáng chế tốt hơn là bao gồm hỗn hợp của chất béo sữa động vật nhai lại và thực vật. Lượng chất béo sữa động vật nhai lại là dưới 90% theo khối lượng như được so sánh với tổng lượng của chất béo, ví dụ dưới 80% theo khối lượng, tốt hơn là dưới 65%, tốt hơn nữa là dưới 50% theo khối lượng. Lượng chất béo sữa động vật nhai lại là ít nhất 5% theo khối lượng như được so sánh với tổng lượng của chất béo trong chế phẩm, ví dụ ít nhất 10% theo khối lượng, tốt hơn là ít nhất 20% theo khối lượng, tốt hơn nữa là ít nhất 30% theo khối lượng, đặc biệt tốt hơn là lượng chất béo sữa là ít nhất 40% theo khối lượng như được so sánh với tổng lượng của chất béo trong chế phẩm. Lượng chất béo trong chế phẩm phụ thuộc vào quần thể mục tiêu. Nó có thể là giữa 5 và 50 gam mỗi 100 gam chế phẩm khô. Tốt hơn là nó là giữa 10 và 40 gam mỗi 100 gam chế phẩm khô, tốt hơn nữa là giữa 15 và 35 gam. Đặc biệt tốt hơn là, tổng lượng của chất béo là giữa 10 và 40 gam mỗi 100 gam chế phẩm khô và lượng chất béo từ động vật nhai lại là giữa 10 và 90% theo khối lượng tổng chất béo. Thậm chí tốt hơn nữa là tổng lượng của

chất béo là giữa 10 và 40 gam mỗi 100 gam chế phẩm khô và lượng chất béo từ động vật nhai lại là giữa 20 và 80% theo khối lượng tổng chất béo.

Trong một phương án khác nữa của chế phẩm theo sáng chế, lượng globulin miễn dịch là giữa 115 μ g và 50 mg mỗi gam chế phẩm khô; và lượng chất béo sữa là giữa 10 và 60 g chất béo mỗi 100 gam công thức, trong đó lượng chất béo từ động vật nhai lại là giữa 5 và 90% theo khối lượng như được xác định với tổng lượng của chất béo.

Hoạt tính sinh học của globulin miễn dịch có thể được thử nghiệm sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Trong một phương án, hoạt tính sinh học của globulin miễn dịch được xác định trong thử nghiệm ELISA mà phân biệt giữa các globulin miễn dịch nguyên bản và bị biến tính. Các phương pháp như vậy là sẵn có thương mại (xem ví dụ <https://www.bethyl.com/> tại trang phụ product/E10-118/Bovine+IgG+ELISA+Quantitation+Set và <https://www.bethyl.com/> tại trang phụ product/E11-118/Bovine+IgG+ELISA+Kit), và các phương pháp này đã được mô tả trước đó trong WO2008127105A1, và WO2011087364A1. Các globulin miễn dịch của động vật nhai lại điển hình là nhạy cảm với nhiệt, và các kết quả bất hoạt nhiệt trong việc mất phát hiện trong ELISA (ví dụ Li et al 2006, J Agric Food Chem, 54 pp 739-746; Godden et al, 2006 J. Dairy Sci, 89 pp 3476-3483; Ohnuki et al, 2005, Animal Science Journal 76 pp 283-290).

Trong một phương án khác, hoạt tính sinh học của globulin miễn dịch có thể được thử nghiệm bằng việc tìm kiếm việc gắn của globulin miễn dịch với tác nhân gây bệnh hoặc chất gây dị ứng ở người. Điều này ví dụ như đã được mô tả chi tiết trong Den Hartog et al 2014, Ohnuki 2005, và trong WO2008127105A1. Việc gắn của các globulin miễn dịch với các tác nhân gây bệnh hoặc chất gây dị ứng ở người đã được biết là làm giảm hoặc biến mất do sự biến tính của các protein này ví dụ bởi các nhiệt độ cao.

Các globulin miễn dịch (Igs) là nhạy cảm với nhiệt. Do đó, để giữ cho chúng hoạt tính sinh học, các phân đoạn sữa bao gồm Igs tốt hơn là không được tiếp xúc với các nhiệt độ trên 80°C, tốt hơn là nhiệt độ không vượt quá 75°C, tốt hơn là nó không vượt quá 74°C, đặc biệt tốt hơn là, nó không vượt quá 72°C, tốt nhất là nó không vượt quá 69°C. Tương tự như vậy, khoảng thời gian trong đó sữa hoặc chất béo sữa bị tiếp

xúc với nhiệt độ được tăng cao nên càng ngắn càng tốt. Như được biểu thị ở trên, phân đoạn Igs hoặc sữa mà Igs có nguồn gốc từ đó, hoặc thành phần bất kỳ khác của chế phẩm theo sáng chế, có thể được tiến hành các điều kiện tiệt trùng theo pháp lý nếu được yêu cầu trong ứng dụng của sản phẩm theo sáng chế.

Sáng chế như được bộc lộ ở đây là để chỉ chất béo sữa động vật nhai lại và các globulin miễn dịch ở động vật nhai lại (cũng được gọi là các kháng thể). Tốt hơn là động vật nhai lại đã nêu là bò, tốt hơn là thành viên của chi *Bos*, tốt hơn nữa là động vật nhai lại là của loài *Gayal*, *Bos frontalis* (bò tót thuần hóa), *Bos mutus* (bò Tây Tạng) hoặc *Bos taurus* (gia súc thuần hóa). Trong một phương án khác, động vật nhai lại là dê hoặc cừu, tốt hơn là thành viên của tiểu họ *Caprinae*, tốt hơn nữa là thành viên của các chi *Ovis* hoặc *Capra*. Trong chi *Ovis*, loài *Ovis aries* (cừu thuần hóa) được ưu tiên. Trong chi *Capra* loài *Capra aegagrus hircus* (dê thuần hóa) được ưu tiên. Trong một phương án khác, động vật nhai lại đã nêu là lạc đà, lừa, trâu, ngựa hoặc lạc đà. Động vật nhai lại được ưu tiên nhất là bò.

Trong một phương án, globulin miễn dịch trong chế phẩm theo sáng chế, được lựa chọn từ một hoặc nhiều trong nhóm bao gồm IgG, IgA, IgM, sIgA, tốt hơn là trong đó globulin miễn dịch là IgG, tốt hơn nữa là IgG1 do IgG1 là dồi dào nhất trong sữa bò.

Trong một phương án khác, globulin miễn dịch là IgA hoặc sIgA. (s)IgA có mặt ở các mức cao trong sữa mẹ.

Ở bò, sữa non là loại sữa đầu tiên được sản xuất bởi bò ngay trước và một khoảng thời gian ngắn (cho đến 4 ngày) sau khi đẻ con bê. Sữa non chứa các mức rất cao của các globulin miễn dịch ở bò, cho tới từ 50 đến 100 mg/ml (với khoảng 1 mg/ml đối với sữa thông thường). IgG1 là loại tương tự globulin miễn dịch chủ đạo trong sữa non và trong sữa của bò. Các globulin miễn dịch trong sữa non được hấp thụ vào máu bởi các con bê để bảo vệ chúng chống lại sự nhiễm trùng. Các mức globulin miễn dịch trong sữa non là cao hơn khoảng 50-100 lần so với trong sữa thông thường. Nguồn dồi dào khác của các globulin miễn dịch là huyết thanh, ví dụ được thu thập khi các động vật nhai lại bị xẻ thịt.

Chất béo sữa như được sử dụng trong sáng chế này là chất béo sữa mà hoạt hóa thụ thể aryl hydrocacbon (AhR) trong thử nghiệm hoạt tính AhR. Các thử nghiệm báo cáo này là đã biết trong lĩnh vực ví dụ như được mô tả trong ví dụ 1 và trong Pieterse

et al 2013 (Pieterse et al, 2013, Environ Sci Technol. 47(20) pp 11651-9. doi: 10.1021/es403810w). Các thử nghiệm này có thể ví dụ như được truy cập thông qua BioDetection Systems BV, Amsterdam, Hà Lan, mặt khác, bộ kit thử nghiệm thụ thể aryl hydrocacbon (AhR) ở người là sẵn có từ Indigo Biosciences, PA, Mỹ (<https://indigobiosciences.com/at-indigo-kits-services/aryl-hydrocarbon-receptor/>). Trong một phương án, việc hoạt hóa của thụ thể aryl hydrocacbon được xác định sử dụng thử nghiệm Calux ví dụ như được mô tả trong ví dụ 1 (*vide infra*)

Chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế tốt hơn là bao gồm 115 μg - 50 mg kháng thể của động vật nhai lại (nghĩa là globulin miễn dịch) mỗi gam chế phẩm dinh dưỡng. Các lượng được biểu thị dưới dạng khối lượng kháng thể của động vật nhai lại mỗi khối lượng chế phẩm dinh dưỡng tổng cộng (để bao gồm kháng thể của động vật nhai lại). Chế phẩm dinh dưỡng tốt hơn là bao gồm 200 μg -20 mg các kháng thể của động vật nhai lại mỗi gam chế phẩm dinh dưỡng, tốt hơn nữa là 0,2-5 mg các kháng thể của động vật nhai lại mỗi gam chế phẩm dinh dưỡng. Các khoảng là cho khối lượng khô của chế phẩm.

Các chế phẩm dinh dưỡng nước điển hình là có lượng thấp hơn của kháng thể của động vật nhai lại mỗi lượng của chế phẩm lỏng. Cái được gọi là "công thức lỏng" điển hình được làm từ chế phẩm dinh dưỡng khô bằng việc hòa tan bột trong nước. Tỷ lệ điển hình là 16,5 gam bột trong 90 ml nước để thu được 100 ml công thức lỏng.

Các chế phẩm dinh dưỡng nước theo sáng chế do đó bao gồm 0,16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - 8,3 mg/ml kháng thể của động vật nhai lại. Các lượng được biểu thị dưới dạng khối lượng kháng thể của động vật nhai lại mỗi ml của chế phẩm dinh dưỡng tổng cộng (so bao gồm kháng thể của động vật nhai lại). Chế phẩm dinh dưỡng dạng nước tốt hơn là bao gồm 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - 3,3 mg/ml các kháng thể của động vật nhai lại, tốt hơn nữa là 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - 0,8 mg/ml các kháng thể của động vật nhai lại trong chế phẩm dinh dưỡng được cấu thành. Lượng kháng thể trong chế phẩm được cấu thành là để chỉ tổng lượng kháng thể của động vật nhai lại trong chế phẩm sau khi nó đã được trộn lẫn với chất lỏng giống nước theo các hướng dẫn được cung cấp với chế phẩm. Trong việc xác định hàm lượng kháng thể, chế phẩm được nói là có dạng nước khi nó chứa ít nhất 75% nước đối với khối lượng của tổng thành phần (w/w). Điều này là bất kể việc sử dụng của các chất tạo gel hoặc độ nhớt của chế phẩm.

Theo sáng chế, sản phẩm khô hoặc sản phẩm ở trạng thái khô bao gồm ít nhất 70% theo khối lượng chất khô, tốt hơn nữa là ít nhất 73% theo khối lượng chất khô, hoặc 75% theo khối lượng chất khô, tốt hơn nữa là ít nhất 77% theo khối lượng chất khô, hoặc 80% theo khối lượng chất khô, tốt hơn nữa là ít nhất 82% theo khối lượng chất khô hoặc 85% theo khối lượng chất khô, tốt hơn nữa là ít nhất 87% theo khối lượng chất khô, hoặc 90% theo khối lượng chất khô, và tốt nhất là ít nhất 92% theo khối lượng chất khô hoặc 95% theo khối lượng chất khô hoặc thậm chí nhiều hơn 98% theo khối lượng chất khô. Trong một phương án, chế phẩm tổng hợp theo sáng chế là sản phẩm khô.

Trong một phương án khác nữa lượng globulin miễn dịch trong chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế là giữa 115 μ g và 50 mg mỗi gam chế phẩm khô; và lượng chất béo sữa là giữa 5 và 90% theo khối lượng tổng lượng của chất béo trong chế phẩm.

Chế phẩm có thể cũng chứa một hoặc nhiều các thành phần nguồn thức ăn cho lợi khuẩn đã biết trong lĩnh vực. Các ví dụ của các nguồn thức ăn cho lợi khuẩn thích hợp là các fructo và/hoặc galacto-oligosacarit, với các mạch ngắn hoặc dài, inulin, các oligosacarit chứa fucoza, các beta glycan, bột carob, các gôm, các pectin, các sialyloligosacarit, sialyllactoza, các galactan với các mạch ngắn hoặc dài, các glucosaminogalactan và glucosamin khác chứa các oligosacarit và các nucleotit. Trong phương án ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế bao gồm sialyllactoza và GOS. Một cách tùy chọn, chế phẩm có thể ngoài ra còn bao gồm các oligosacarit ở sữa mẹ và/hoặc các oligosacarit không tiêu hóa được để tạo ra nguồn thức ăn cho lợi khuẩn mà tạo ra các axit béo chuỗi ngắn (SCFA). Các SCFA này là quan trọng để thúc đẩy chức năng rào cản và cũng để ngăn ngừa sự viêm (có liên quan đến nhiễm trùng) trong niêm mạc đường ruột. Do đó trong một phương án khác, chế phẩm theo sáng chế ngoài ra còn bao gồm một hoặc nhiều oligosacarit được lựa chọn từ nhóm bao gồm các oligosacarit ở sữa mẹ (HMO) và các oligosacarit không tiêu hóa được. Trong một phương án lượng HMO là giữa 0,01 và 5,0 gam mỗi 100 gam chế phẩm (khối lượng khô), tốt hơn là giữa 0,1 và 4,0 gam mỗi 100 gam chế phẩm. Trong một phương án khác, lượng oligosacarit không tiêu hóa được là giữa 0,1 và 25 gam mỗi 100 gam chế phẩm khô, tốt hơn là giữa 1 và 20 gam, tốt hơn nữa là giữa 2 và 15 gam. Trong một phương án khác nữa, lượng HMO là giữa 0,01 và 5,0 gam mỗi 100 gam chế phẩm và lượng oligosacarit không tiêu hóa được là giữa 0,1 và 25 gam mỗi 100 gam chế phẩm khô.

Các oligosacarit sữa mẹ (HMO) là thành phần cấu tạo then chốt của sữa mẹ. Chúng là nhóm đa dạng về mặt cấu trúc và sinh học của các carbohydrate không tiêu hóa được phức tạp. Cho đến nay, đã xác định được hơn 200 oligosacarit khác nhau, thay đổi kích thước từ 3 đến 22 đơn vị monosacarit. Các HMO phổ biến nhất là các oligosacarit được fucosyl hóa và các oligosacarit không được fucosyl hóa trung hòa. Số lượng và cấu trúc của các HMO này khác nhau đáng kể giữa những người phụ nữ và phụ thuộc vào trạng thái nhóm máu Secretor và Lewis (L. Bode, J. Nutr. 136: 2127–2130, 2006.). Các HMO được fucosyl hóa được phát hiện là thành phần chiếm nhiều nhất (~77%), trong khi các HMO được sialyl hóa chiếm khoảng 16% tổng số lượng các HMO. Các HMO được fucosyl hóa là các phân tử trung hòa, trong khi các HMO được sialyl hóa có tính axit. Trong một phương án, chế phẩm theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều HMO.

Các HMO của sữa mẹ bao gồm các monosacarit khác nhau, cụ thể là glucoza, galactoza, fucoza, N-axetylglucosamin và các axit sialic (axit N-axetylneuraminic). Đường fucoza là phân tử không thông thường tức là nó có cấu hình L, trong khi các phân tử đường khác trong cơ thể có cấu hình D. Cấu trúc của các HMO là đơn vị lactoza mà có thể được kéo dài ở đầu không khử với một hoặc nhiều các gốc galactoza và/hoặc N-axetylglucosamin (cấu trúc lõi). Cấu trúc lõi HMO có thể được gắn thêm bằng một hoặc nhiều gốc fucoza (tức là HMO được fucosyl hóa) và với một hoặc nhiều đơn vị axit sialic (tức là HMO được sialyl hóa). HMO cũng có thể được fucosyl hóa và sialyl hóa. Trong một phương án, HMO trong chế phẩm theo sáng chế được lựa chọn từ một hoặc nhiều trong nhóm bao gồm HMO lõi, HMO được sialyl hóa, và HMO được fucosyl hóa. Trong sữa mẹ, HMO chiếm nhiều nhất là 2'-fucosyllactoza (trisacarit trung hòa gồm các đơn vị L-fucoza, D-galactoza, và D-glucoza, Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)Glc được liên kết; CAS Nr 41263-94-9), với nồng độ là khoảng 2 g/l (Adams *et al*; 2018, Nutrafoods pp 169 – 173). Các HMO được ưu tiên là 3'-Sialyllactoza (3'SL); 6'-Sialyllactoza (6'SL); 2'-Fucosyllactoza (2'FL); 3-Fucosyllactoza (3-FL); lacto-N-tetraoza (LNT), lacto-N-neotetraoza (LNnT) và disialyllacto-N-tetraoza (DSLNT); đây là các HMO được ưu tiên. Các chế phẩm dinh dưỡng được đặc biệt ưu tiên bao gồm ít nhất 2'FL. Trong một phương án khác nữa, chế phẩm theo sáng chế bao gồm ít nhất 0,05 gam 6SL mỗi 100 gam chế phẩm (khối lượng khô). Trong một phương án, chế phẩm theo sáng chế bao gồm ít nhất 0,05 gam

LNT mỗi 100 gam chế phẩm (khối lượng khô). Trong một phương án khác nữa, chế phẩm theo sáng chế bao gồm ít nhất 0,05 gam LNT mỗi 100 gam chế phẩm (khối lượng khô). HMO có thể thu được bằng cách sử dụng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ, HMO có thể được tinh chế từ sữa mẹ. Các HMO riêng lẻ có thể còn được tách bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực như điện di mao dẫn, HPLC (ví dụ, sắc ký trao đổi anion hiệu năng cao với sự phát hiện đo xung ampe; HPAEC-PAD), và sắc ký lớp mỏng. Xem, ví dụ, Đơn sáng chế Mỹ số 2009/0098240. Theo cách khác, phương pháp enzym có thể được sử dụng để tổng hợp HMO. Phương pháp khác để sản xuất HMO là thông qua sự sinh tổng hợp trong vi khuẩn đã được thiết kế. Ví dụ, phương pháp để điều chế 2'-FL được bộc lộ trong WO 2012/112777. Mặt khác, 2'-FL là sẵn có thương mại.

Trong một phương án lượng HMO trong chế phẩm theo sáng chế là giữa 0,01 và 5,0 gam mỗi 100 gam, tốt hơn là giữa 0,1-2 gam mỗi 100 gam chế phẩm (khô) hoặc trong một phương án khác, khi chế phẩm là chất lỏng, lượng HMO là giữa 0,01 và 5,0 gam mỗi 100 mL, tốt hơn là giữa 0,1-2 gam mỗi mL chế phẩm.

Trong các phương án khác, chế phẩm theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều các sialyloligosacarit, tốt hơn là các sialyloligosacarit được lựa chọn từ một hoặc nhiều trong nhóm bao gồm disialyllacto-N-tetraosa, 3'-sialyllactoza, 6'-sialyllactoza, 3'-sialyllactosamin, 6'-sialyllactosamin, 3'-sialyl-3-fucosyllactoza, sialyllacto-N-tetraosa a, sialyllacto-N-tetraosa b, sialyllacto-N-tetraosa c, disialyllactoza, 3'-sialyl Lewis A, 3'-sialyl Lewis X, disialyllacto-N-hexaoza I, disialyllacto-N-hexaoza II, sialyl Lea tetra, sialyllacto-N-neotetraosa c, và disialyllacto-N-fucopentaoza II. Các sialyloligosacarit có thể được phân tách từ sữa, nước sữa (whey) hoặc trứng, hoặc được sản xuất từ các thành phần có nguồn gốc từ đó.

Trong một phương án khác của phương án theo sáng chế, chế phẩm bao gồm 0,25 đến 20% theo khối lượng các oligosacarit không tiêu hóa được trên cơ sở khối lượng khô của chế phẩm, tốt hơn là trong đó các oligosacarit không tiêu hóa được được lựa chọn từ một hoặc nhiều trong số các galacto-oligosacarit (GOS), và các fructo-oligosacarit (FOS), tốt hơn nữa là, trong đó các oligosacarit không tiêu hóa được là các galacto-oligosacarit. Theo các phương án khác, lượng tối thiểu của các oligosacarit không thể tiêu hóa được là ít nhất 1% theo khối lượng tính theo khối lượng khô của chế phẩm, như ít nhất 5% theo khối lượng. Theo phương án khác nữa,

lượng tối thiểu của các oligosacarit không thể tiêu hóa được này là 25% theo khối lượng tính theo khối lượng khô của chế phẩm, tốt hơn là nhỏ hơn 20% theo khối lượng, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 15% theo khối lượng. Các cấu thành chính trong GOS là các oligosacarit bao gồm một hoặc nhiều đơn vị beta-galactosa với gốc glucoza ở đầu khử. Các đơn vị galactosa được liên kết chủ yếu trong liên kết beta 1-4 hoặc beta 1-6, mặc dù các liên kết beta 1-2 và beta 1-3 có thể cũng xảy ra. Trong phương án ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế bao gồm các galacto oligosacarit và các galacto oligosacarit bao gồm 2'galactosyl lactoza ($\text{Gal}\beta 1\text{-}2\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{Glc}$) và 3' galactosyl lactoza ($\text{Gal}\beta 1\text{-}3\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{Glc}$). Trong một phương án ưu tiên khác, chế phẩm theo sáng chế bao gồm các galacto oligosacarit và các galacto oligosacarit bao gồm 3'galactosyl lactoza ($\text{Gal}\beta 1\text{-}3\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{Glc}$) và 6' galactosyl lactoza ($\text{Gal}\beta 1\text{-}6\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{Glc}$). Tốt hơn là lượng oligosacarit không tiêu hóa được là giữa 0,1 và 25 gam mỗi 100 gam chế phẩm khô.

Các chủng vi khuẩn nhất định đã thu hút được sự chú ý đáng kể bởi vì chúng đã được tìm ra là thể hiện các đặc tính có giá trị cho người nếu được tiêu hóa. Cụ thể là, các chủng cụ thể của các chi *Lactobacilli* và *Bifidobacteria* đã được phát hiện là có khả năng khuẩn lạc hóa niêm mạc đường ruột, để giảm khả năng của vi khuẩn gây bệnh để dính vào biểu mô ruột, để có các hiệu quả điều hòa miễn dịch và để hỗ trợ trong việc duy trì sự khỏe mạnh. Vi khuẩn này đôi khi được gọi là các lợi khuẩn.

Mặc dù chưa biết nhiều về các loài riêng lẻ của vi khuẩn chịu trách nhiệm cho các hoạt tính có lợi này, nó thường được chấp nhận rằng *Bifidobacteria* và *Lactobacilli* cấu thành các thành phần quan trọng của hệ vi sinh vật đường ruột có lợi. *Bifidobacteria* và *Lactobacilli* là dồi dào trong đường ruột của trẻ em bú ti nhưng không bú bình, và được công nhận là vi khuẩn cộng sinh có lợi. Sự có mặt của chúng tương quan với việc ít nhiễm khuẩn đường không khí và tuyến dạ dày ruột hơn, và nhiều loài *Lactobacilli* và *Bifidobacteria* cho đến nay đã được sử dụng như lợi khuẩn. Sự phát triển vượt bậc của các vi khuẩn này được thúc đẩy bởi các cacbohydrat khó tiêu phức tạp (các oligosacarit ở sữa người và các oligosacarit nguồn thức ăn cho lợi khuẩn) mà có mặt trong sữa mẹ. Các oligosacarit nguồn thức ăn cho lợi khuẩn hiện nay được thiết lập tốt như thành phần cho công thức cho trẻ sơ sinh để thúc đẩy sự phát triển vượt bậc của *Bifidobacteria* trong ruột của các trẻ sơ sinh.

Các nghiên cứu sâu rộng đã được tiến hành để xác định các chủng lợi khuẩn mới. Ví dụ, EP 0 199 535, EP 0 768 375, WO 97/00078, EP 0 577 903 và WO

00/53200 bộc lộ các chủng cụ thể của Lactobacilli và Bifidobacteria và các hiệu quả có lợi của chúng.

Trong một phương án, lợi khuẩn bao gồm vi khuẩn của chi *faecalibacterium*, tốt hơn là nó bao gồm *Faecalibacterium prausnitzii*.

Đã được đề xuất để bổ sung các lợi khuẩn vào các công thức cho trẻ sơ sinh để khuyến khích việc tạo khuẩn lạc ruột diễn ra và để thúc đẩy việc tạo khuẩn lạc với vi khuẩn "tốt" - các loài Bifidobacteria và Lactobacilli - thay vì vi khuẩn có hại - các tác nhân gây bệnh như là Clostridia, v.v.. Do đó, trong một phương án khác nữa, chế phẩm theo sáng chế bao gồm lợi khuẩn, nghĩa là một hoặc nhiều lợi khuẩn. Tốt hơn là, lợi khuẩn là chủng Lactobacillus, chủng Bifidobacterium, chủng Streptococcus, chủng Lactococcus, chủng Leuconostoc, chủng Enterobacteriaceae hoặc chủng Enterococcus. Tốt hơn nữa là, lợi khuẩn là chủng Lactobacillus hoặc chủng Bifidobacterium.

Trong một phương án, chủng Lactobacillus là chủng Lactobacillus rhamnosus hoặc Lactobacillus paracasei. Trong một phương án khác, chủng Bifidobacterium là chủng Bifidobacterium lactis, Bifidobacterium longum Bifidobacterium breve hoặc Bifidobacterium animalis.

Trong một phương án khác nữa, tốt hơn là các lợi khuẩn được lựa chọn từ một hoặc nhiều trong nhóm bao gồm Bifidobacterium lactis (được bán đầu tiên bởi công ty Christian Hansen), Streptococcus thermophilus (ví dụ được cung cấp dưới tên gọi TH4 bởi Chr. Hansen, Đan Mạch), Lactobacillus paracasei rhamnosus GG (ATCC 53103) (ví dụ như được cung cấp bởi Valio Oy, Phần Lan), và Bifidobacterium longum BB536 (ví dụ như được cung cấp bởi Morinaga Milk Industry Co. Ltd, Nhật Bản).

Trong một phương án khác nữa, chế phẩm theo sáng chế bao gồm ít nhất hai loại lợi khuẩn khác nhau.

Các lợi khuẩn trong chế phẩm theo sáng chế tốt hơn là có mặt với lượng từ 10^6 đến 10^9 cfu/gam sản phẩm khô, tốt hơn là từ 10^6 đến 10^8 cfu/g sản phẩm khô, và thậm chí tốt hơn nữa là từ 10^7 đến 5×10^7 cfu/gam sản phẩm khô.

Các nguồn thức ăn cho lợi khuẩn (prebiotics) có một số các ưu điểm so với các lợi khuẩn (probiotics); thực tế về cơ bản là chúng không sống có nghĩa là chúng có thể được xử lý trong khoảng rộng hơn nhiều của các thực phẩm so với các lợi khuẩn dễ

tổn thương. Hơn thế nữa, các nguồn thức ăn cho lợi khuẩn không có chung vấn đề sống sót của lợi khuẩn khi tiêu hóa bởi người tiêu thụ. Do các nguồn thức ăn cho lợi khuẩn kích thích sự phát triển của vi khuẩn mà sẵn có mặt trong đường ruột, chúng có thể được xem như là các phụ gia hoặc các thành phần "tự nhiên" hơn so với các lợi khuẩn, mà là cần thiết cho việc dùng các vi khuẩn bên ngoài.

Chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế có thể ngoài ra còn bao gồm lactoferin, tốt hơn là lactoferin ở bò. Lactoferin là protein vận chuyển sắt được tìm thấy trong sữa mẹ với hoạt tính kháng khuẩn. Thuật ngữ "lactoferin" như được sử dụng ở đây bao gồm cả lactoferin bị biến tính và các đoạn hoạt tính sinh học, lớn của lactoferin (ví dụ, các đoạn lactoferin) và lactoferin tự nhiên hoặc không bị biến tính. Lactoferin là glycoprotein mà thuộc về họ transferin hoặc vận chuyển sắt. Nó được tìm thấy ở sữa bò và sữa động vật có vú khác dưới dạng thành phần protein thiểu số của các protein nước sữa. Lactoferin chứa 703 amino axit, có khối lượng phân tử là 80 kilodalton, và cũng được tìm thấy trong sữa mẹ. Các nồng độ lactoferin trong chế phẩm theo sáng chế tốt hơn là ít nhất khoảng 10 mg/L, tốt hơn là ít nhất khoảng 50 mg/L. Trong một phương án, lượng lactoferin ở bò trong chế phẩm theo sáng chế là từ 10 mg/L đến 2000 mg/L, tốt hơn là từ 50 mg/L đến 2000 mg/L, tốt hơn nữa là từ 100 đến 1500 mg/L. Sữa mẹ, so sánh, thường chứa từ khoảng 1390 đến khoảng 1940 mg/L lactoferin. Các lượng trong mg/L như được sử dụng trong sự kết hợp với Lactoferin là để chỉ lượng lactoferin mỗi lit của sản phẩm sẵn sàng cho việc tiêu thụ.

Các nguồn thích hợp của lactoferin cho việc sử dụng ở đây bao gồm các phân phân lập, các phần cô, hoặc các phần chiết của sữa hoặc các sản phẩm từ sữa của động vật có vú, bao gồm sữa mẹ và sữa bò. Sữa bò là nguồn lactoferin được ưu tiên cho việc sử dụng ở đây, bao gồm các phần cô protein nước sữa được làm giàu như được mô tả ở đây. Các nguồn riêng lẻ của lactoferin thích hợp cho việc sử dụng ở đây bao gồm Lactoferin FD (80% Lactoferin), sẵn có từ FrieslandCampina Ingredients, Hà Lan.

Chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế, cũng được gọi là chế phẩm theo sáng chế, là đặc biệt thiết hợp cho các đối tượng người từ 0 đến 36 tháng tuổi, cụ thể là các trẻ sơ sinh (người từ 0 đến 12 tháng tuổi theo CODEX Alimentarius (CODEX STAN 72-1981), còn được gọi là CODEX) và trẻ nhỏ cho tới 36 tháng tuổi. Các chế phẩm dinh dưỡng cho trẻ sơ sinh còn được gọi phổ biến là sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh. Khi được sử dụng như công thức cho trẻ sơ sinh, chế phẩm như được sử dụng trong

các phương án khác nhau theo sáng chế nên chứa các thành phần với các lượng như được quy định bởi CODEX và, nếu cần thiết, như được quy định bởi các quy định bổ sung của các quốc gia riêng lẻ. Mặt khác, các yêu cầu đối với công thức cho các trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ đã được mô tả trong Quy định được ủy quyền (châu Âu) 2016/127 vào 25/09/2015 hướng dẫn Quy định (châu Âu) số 609/2013 và Chỉ thị của Ủy ban 2006/141/EC. Ví dụ về danh mục các thành phần của sữa công thức cho trẻ sơ sinh đáp ứng các yêu cầu của châu Âu, Trung Quốc và Codex có thể, ví dụ được tìm thấy trên [www.frieslandcampinaingredients.com/](http://www.frieslandcampinaingredients.com/app/uploads/2019/04/PDS_ELN_Essential®-Start-IF-110.pdf) tại [app/uploads/2019/04/PDS_ELN_Essential®-Start-IF-110.pdf](http://www.frieslandcampinaingredients.com/app/uploads/2019/04/PDS_ELN_Essential®-Start-IF-110.pdf).

Theo đó, trong phương án ưu tiên, chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế cho các trẻ sơ sinh bao gồm chất béo sữa động vật nhai lại và globulin miễn dịch như được xác định ở mục khác tại đây và ngoài ra còn bao gồm protein, các cacbohydrat, các vitamin, các chất khoáng và các nguyên tố vi lượng và các hợp chất khác theo các đặc tả được quy định bởi CODEX và, nếu cần thiết, bởi các quy định quốc gia bổ sung.

Chế phẩm theo sáng chế là thích hợp cho các đối tượng người ví dụ trẻ nhỏ (người từ 12 đến 36 tháng tuổi, - cũng được gọi là trẻ mới biết đi) và chế phẩm là 'công thức tiếp nối cho trẻ nhỏ' (FUF-YC),— công thức này có thể cũng được gọi là 'các sữa cho sự lớn lên', 'các công thức cho sự lớn lên' hoặc 'sữa của trẻ mới biết đi', hoặc thay vào đó nó có thể được gọi là "công thức cho trẻ nhỏ". Sữa công thức như vậy chứa lipid, protein, và các carbohydrat tiêu hóa được như được mô tả trên đây, và có thể còn chứa các vitamin, các chất khoáng và các chất vi lượng và các chất khác theo các thông số kỹ thuật được quy định bởi Tiêu chuẩn của CODEX đối với sữa công thức cho giai đoạn tiếp theo (CODEX STAN 156-1987) và, nếu cần, bởi các quy định quốc gia bổ sung. Theo đó, chế phẩm như được sử dụng trong các khía cạnh khác nhau theo sáng chế được lựa chọn từ một hoặc nhiều trong nhóm bao gồm công thức cho trẻ sơ sinh, công thức nối tiếp và công thức cho trẻ nhỏ, tốt hơn là, chế phẩm là công thức cho trẻ sơ sinh hoặc công thức nối tiếp, tốt hơn nữa là công thức cho trẻ sơ sinh.

Các trẻ sơ sinh sinh non có nhiều vấn đề hơn với ruột non bị rò rỉ và /hoặc tắc rào cản ruột. Chế phẩm theo sáng chế cung cấp sự hoạt hóa của thụ thể Ahr và globulin miễn dịch, do đó có thể là đặc biệt hữu ích cho các trẻ sơ sinh sinh non do chế phẩm này hỗ trợ chức năng rào cản ở ruột tốt, tốt hơn là khi chế phẩm ngoài ra còn bao

gồm một hoặc nhiều HMO. Do đó, trong một phương án khác nữa, chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế là công thức cho trẻ sinh non, nghĩa là công thức được thiết kế cho các em bé sinh non, nghĩa là các em bé sinh ra sau khi thụ thai không nhiều hơn 37 tuần.

Chế phẩm theo sáng chế có thể là dạng thích hợp bất kỳ trong lĩnh vực, ví dụ trong một phương án nó sẵn sàng để sử dụng dạng lỏng, hoặc tốt hơn là, trong một phương án khác, nó có dạng bột, tốt hơn nữa là, bột nổi tự do.

Chế phẩm theo sáng chế có thể là hỗn hợp trộn sơ bộ, ví dụ hỗn hợp trộn sơ bộ mà có thể được sử dụng như nền cho công thức như công thức cho trẻ sơ sinh, công thức tiếp nối, công thức cho trẻ nhỏ, hoặc công thức cho trẻ sinh non. Trong một phương án khác nữa, chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế là hỗn hợp trộn sơ bộ thành phần, tốt hơn là hỗn hợp trộn sơ bộ dinh dưỡng đầu đời.

Trong một phương án khác nữa, chế phẩm theo sáng chế bao gồm:

- i. giữa 10 và 60 g chất béo mỗi 100 gam công thức, trong đó lượng chất béo từ động vật nhai lại là giữa 5 và 90% theo khối lượng như được xác định với tổng lượng của chất béo;
- ii. giữa 115 μ g - 50 mg globulin miễn dịch động vật nhai lại mỗi gam chế phẩm (khối lượng khô);
- iii. giữa 10^6 và 10^9 cfu lợi khuẩn mỗi gam sản phẩm khô;
- iv. giữa 0,1 và 25 gam oligosacarit không tiêu hóa được mỗi 100 gam công thức (khối lượng khô);
- v. giữa 0,01 và 5,0 gam HMO mỗi 100 gam sản phẩm khô;
- vi. giữa 0,1 và 20 mg lactoferin mỗi gam sản phẩm khô.

Các thành phần khác trong chế phẩm có thể ví dụ như được lựa chọn từ lactoza, các cacbohydrat, các vitamin, các chất khoáng v.v.. Trong một phương án khác nữa, chế phẩm này không chứa các lợi khuẩn, nói cách khác chế phẩm bao gồm các mục i. ii. iv. v. và vi.

Trong một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng của chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế trong công thức cho trẻ sinh non, công thức cho trẻ sơ sinh, công thức nối tiếp hoặc công thức cho trẻ nhỏ.

Trong một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến việc sử dụng của chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế để điều trị bất kỳ một hoặc nhiều trong số các chỉ dẫn được lựa chọn từ nhóm bao gồm chức năng rào cản ruột bị suy giảm, viêm ruột hoại tử (NEC), hội chứng ruột kích thích (IBS), bệnh viêm ruột (IBD), tổn thương ruột bị gây ra bởi thuốc kháng viêm không phải steroid (NSAID), và nội độc tố sau phẫu thuật.

Trong một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến việc sử dụng của chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế để xử lý đối tượng đang chống chọi bệnh đái tháo đường loại 2 (T2D).

Việc điều trị của bệnh hoặc chứng bệnh bao gồm việc dùng chế phẩm theo sáng chế để ngăn ngừa việc đối tượng phải chống chọi bệnh hoặc chứng bệnh đã nêu và/hoặc để giảm các triệu chứng của bệnh.

Chế phẩm theo sáng chế có thể cũng được sử dụng trong các công thức cho người trưởng thành hoặc người lớn tuổi nghĩa là các sản phẩm thực phẩm cho người lớn, người lớn tuổi hoặc người trưởng thành. Cụ thể là trong việc điều trị, hoặc việc ngăn ngừa bệnh đái tháo đường loại 2, IBS hoặc IBD. Các công thức cho người trưởng thành hoặc người lớn tuổi có thể dưới dạng các hỗn hợp trộn sơ bộ mà có thể được kết hợp với thực phẩm khác ví dụ với các sản phẩm sữa hoặc sữa chua. Mặt khác, nó có thể là sản phẩm sẵn sàng để tiêu thụ như viên nhộng, viên nang, thanh ví dụ thanh ngũ cốc hoặc thanh sôcôla; kẹo. Mặt khác, trong một phương án khác, sản phẩm thực phẩm là chất lỏng.

Sản phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để hỗ trợ chức năng rào cản ruột ở người, ví dụ để ngăn ngừa hoặc điều trị tiêu chảy hoặc các nhiễm trùng đường ruột. Việc sử dụng này có thể liên quan tới các công thức dinh dưỡng đầu đời để hỗ trợ chức năng rào cản ở đường dạ dày ruột của các trẻ sơ sinh sinh non, các trẻ sơ sinh và trẻ rất nhỏ (0-3 tuổi), nhưng cũng có thể liên quan đến việc sử dụng của các công thức dinh dưỡng cho người >3 tuổi để ngăn ngừa và điều trị các bệnh liên quan đến chức năng rào cản ruột như là bệnh viêm ruột, hội chứng ruột kích thích, cũng như các bệnh mãn tính liên quan đến chức năng rào cản ruột như là đái tháo đường loại 2.

Chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế có thể cũng được sử dụng theo cách không trị liệu để làm giảm các triệu chứng được kết hợp với được lựa chọn từ nhóm bao gồm chức năng rào cản ruột bị suy giảm, viêm ruột hoại tử (NEC), hội chứng ruột kích thích (IBS), bệnh viêm ruột (IBD), tổn thương ruột bị gây ra bởi thuốc kháng viêm không phải steroid (NSAID), và nội độc tố sau phẫu thuật. Trong một phương án khác cũng có thể được sử dụng trong cách không trị liệu để làm giảm các triệu chứng được kết hợp với đại tháo đường loại 2.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Kem sữa và chất béo trong sữa khan (AMF) được sản xuất bởi FrieslandCampina Hà Lan.

Kem sữa có % chất béo là 41,7% theo khối lượng. Kem sữa và AMF được sản xuất sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực.

Sữa chua được thu thập từ siêu thị (sữa chua Campina Boerenland volle, FrieslandCampina, Hà Lan).

FN01 là hỗn hợp của các chất béo thực vật, được thu thập từ Loders Croklaan, Wormerveer, Hà Lan.

Các globulin miễn dịch được dùng dưới dạng chất cô protein nước sữa (WPC), chất cô protein huyết thanh sữa và/hoặc sữa bò được xử lý nhiệt tối thiểu, chứa hỗn hợp của tất cả các loại globulin miễn dịch có mặt (FrieslandCampina Hà Lan).

Ví dụ 1: Minh chứng của việc kích hoạt AhR bởi chất béo sữa

Sự có mặt của các phối tử AhR trong chất béo sữa, kem, sữa chua và FN01 hỗn hợp chất béo thực vật được nghiên cứu sử dụng các sinh thử nghiệm gen báo cáo PAH CALUX® trên cơ sở AhR (BioDetection Systems BV, Amsterdam, Hà Lan ("BDS")).

Sinh thử nghiệm PAH CALUX® là sinh thử nghiệm chuyển hoạt hóa thụ thể aryl-hydrocacbon (AhR) bao gồm dòng tế bào hepatoma ở chuột H4IIE được cải biến gen, kết hợp gen luciferaza đom đóm được ghép với các thành phần đáp ứng dioxin (các DRE) dưới dạng gen báo cáo cho sự có mặt của các hợp chất có khả năng gắn thụ thể Ah. Sinh thử nghiệm PAH CALUX® phát hiện các phối tử AhR ổn định chuyển hóa (các phối tử AhR độc tố như là các dioxin, các furan và các PCB giống dioxin), các phối tử AhR không ổn định chuyển hóa (các poly hydrocacbon thơm (các PAH) và

các phối tử thụ thể Ah tự nhiên, có thể chuyển hóa như là các chất dẫn xuất indol, các chất chuyển hóa tryptophan và quercetin).

Các kỹ thuật phân tách và làm sạch khác nhau được sử dụng để phân biệt giữa các phối tử thụ thể Ah có độc, không có khả năng chuyển hóa (các dioxin (các dibenzodioxin được polyclorin hóa hoặc các PCDD), các furan (các dibenzofuran được polyclorin hóa hoặc các PCDF) và các biphenyl được poly clorin hóa giống dioxin (các dl-PCB)), các phối tử thụ thể Ah xenobiotic, có thể chuyển hóa (các poly hydrocacbon thơm (các PAH)) và các phối tử thụ thể Ah tự nhiên, có thể hoạt hóa (ví dụ các chất dẫn xuất indol, các chất chuyển hóa tryptophan, quercetin).

Các tế bào PAH CALUX® mà được tiếp xúc với các hợp chất quan tâm không chỉ biểu hiện các protein mà trong các hoàn cảnh bình thường được kết hợp với các gen được điều hòa DRE được kích hoạt thụ thể Ah, nhưng cả luciferaza. Bằng việc bổ sung hợp chất thích hợp cho luciferaza, ánh sáng được phát ra. Lượng ánh sáng được sản xuất là tỷ lệ với lượng gắn thụ thể đặc hiệu phối tử, mà được lấy chuẩn đối với các hợp chất tham chiếu tương ứng (B[a]P cho sinh thử nghiệm PAH CALUX®).

Để thu được các phối tử AhR từ các sản phẩm sữa bò (sữa, sữa chua, kem) và chất béo thực vật (FN01), các mẫu được chiết với hexan/DEE, 97/3 v/v.. Sau khi chiết, chất béo có thể chiết được loại bỏ sử dụng cột nhôm khử hoạt hóa 8% (rửa giải 210 ml pentan) sau đó các phối tử AhR ổn định chuyển hóa (các PCDD/F, các dlPCB), các phối tử AhR không ổn định chuyển hóa (các PAH) và các phối tử AhR không ổn định chuyển hóa tự nhiên (ví dụ các chất dẫn xuất indol) được phân tách trên cột silic oxit khử hoạt hóa 1,5%. Sau khi rửa giải (1: 15 ml hexan; 2: 10 ml hexan/DEE (85/15 v/v); 3: 25 ml DEE), 3 phân đoạn được thu thập (phân đoạn 1: các PCDD/F, các PCB, các chất diệt sinh vật gây hại không phân cực; phân đoạn 2: các PAH, các chất diệt sinh vật gây hại phân cực; phân đoạn 3: các indol, v.v.). Hiệu quả phân tách và chiết của việc rửa cột silic oxit khử hoạt hóa/nhôm khử hoạt hóa được kết hợp được đánh giá sử dụng các mẫu tăng vọt chứa PCB-126, các tiêu chuẩn PAH, indol-3-carbinol (I3C), 3-Indol-Axit axetic (3IAA) và Tryptamin (TTAM). Các phân đoạn được thu thập được bay hơi và được hòa tan lại trong DMSO.

Các sự pha loãng theo chuỗi của các phần chiết được phân tách/được làm sạch trong DMSO được chuẩn bị và được phân tích cho việc phát tín hiệu thụ thể Ah trong

sinh thử nghiệm PAH CALUX®. Nói ngắn gọn, các tế bào PAH CALUX® được gieo trong các đĩa 96 giếng. Sau 24 giờ, các tế bào được tiếp xúc trong 4 giờ (với các mức pha loãng theo dãy của các phần chiết DMSO cuối cùng gấp ba lần và sau đó được ly giải để đo các hoạt tính luciferaza. Trên mỗi đĩa 96 giếng, đường chuẩn hoàn chỉnh cho mỗi sinh thử nghiệm tương ứng cũng được phân tích. Các kết quả phân tích được nội suy trong đường chuẩn cho việc xác định của hoạt tính thụ thể Ah. Hoạt tính thụ thể Ah cuối cùng được biểu hiện dưới dạng các đương lượng pg B(a)P mỗi gam chất béo được xử lý.

Để thử nghiệm hiệu quả của việc phân đoạn silic oxit khử hoạt tính, các tiêu chuẩn tăng vọt (PCB-126, hỗn hợp PAH, I3C/3IAA/hỗn hợp TTAM) được phân tách trên cột silic oxit khử hoạt tính. Ba phân đoạn được thu thập và được thử nghiệm cho hoạt tính PAH CALUX. Trong hình 1, các kết quả phân tích PAH CALUX tiếp theo sự phân đoạn của các tiêu chuẩn tăng vọt (PCB-126, hỗn hợp PAH, indol-3-carbinol (I3C)) trên cột silic oxit khử hoạt hóa 1,5% được cho. Các kết quả biểu thị rằng cột silic oxit khử hoạt hóa được áp dụng phân tách I3C phối tử AhR “tự nhiên” tham chiếu từ các phối tử AhR “độc tính” ổn định chuyển hóa (PCB-126) và các phối tử AhR “thông thường” không ổn định chuyển hóa (hỗn hợp PAH). Các phối tử AhR “tự nhiên” không ổn định chuyển hóa được rửa giải trong phân đoạn 3 trong đó các phối tử AhR “tự nhiên” không ổn định chuyển hóa được thu thập trong phân đoạn 2. Phối tử AhR “độc tính” ổn định chuyển hóa PCB-126 được tìm ra là đã được rửa giải trong cả các phân đoạn 1 và 2 biểu thị sự phân đoạn không hoàn toàn.

Bảng 1 Các nguồn chất béo

Mã sản phẩm	Sản phẩm	Chất béo quá mức (g)
AMF	Chất béo ở sữa khan (bò)	0,2001
Kem	Kem (bò)	0,2059
Sữa chua	Sữa chua (bò)	0,1384
FN01	Chất béo thực vật	0,203

Trong bảng 1, lượng chất béo có thể chiết được thu, và được xử lý thêm để xác định hoạt tính PAH CALUX của các phối tử AhR trong 3 sản phẩm sữa thu được và cho chất béo thực vật FN01. Cho việc xác định của các phối tử thụ thể Ah ổn định chuyển hóa, "độc tính", không ổn định chuyển hóa, giống PAH" và "không ổn định chuyển hóa, tự nhiên", chất béo được loại bỏ sử dụng các cột nhôm được khử hoạt hóa sau đó dịch chiết được làm sạch được tạo phân đoạn sử dụng silic oxit được khử hoạt hóa. 3 phân đoạn cuối cùng được thu cho mỗi trong số 4 mẫu được tạo phân đoạn được hòa tan trong DMSO. Các mức pha loãng theo dãy của các phân đoạn được làm sạch cuối cùng trong DMSO được sử dụng để tiếp xúc các tế bào PAH CALUX trong 4 giờ. Trong bảng 2, các kết quả phân tích PAH CALUX của các sản phẩm sữa được phân đoạn và chất béo thực vật được tóm tắt. Trong hình 2, biểu diễn đồ họa của các kết quả phân tích PAH CALUX được phân đoạn của các mẫu khác nhau được thử nghiệm được cho. Không có mẫu nào trong số các mẫu thể hiện hoạt tính PAH CALUX trong phân đoạn 1 biểu thị sự vắng mặt của các phối tử AhR "độc tính" như là các PCDD/F và các dlPCB. Ngược lại, phân đoạn 2 (các phối tử AhR có thể chuyển hóa "bình thường" như là các PAH) của AMF và các phần chiết được tạo phân đoạn kem thể hiện hoạt tính PAH CALUX cao trong đó sữa chua và các phần chiết FN01 chỉ thể hiện các mức nhỏ của hoạt tính PAH hoạt tính PAH CALUX trong phân đoạn 3, biểu thị sự có mặt của phối tử AhR có thể chuyển hóa "tự nhiên" như là các dẫn xuất indol và các chất chuyển hóa tryptophan, được quan sát thấy trong tất cả các mẫu. Tuy nhiên, hoạt tính trong phân đoạn của chiết xuất FN01 được xem xét là cao hơn như được so sánh với hoạt tính được quan sát thấy trong ba phần chiết mẫu được tạo phân đoạn khác.

Bảng 2 Các kết quả phân tích PAH CALUX của các sản phẩm sữa khác nhau được thu để phân tích tiếp sau việc chiết, việc làm sạch và việc phân đoạn.

Mã sản phẩm	Sản phẩm được xử lý (g vet)	Phân đoạn	Hoạt tính PAH CALUX (đương lượng ng B(a)P/g chất béo)
AMF	0,2001	F1 – các PCB	<LOQ

		F2 – các PAH	880
		F3 – Các indol/các chất tự nhiên	22
Kem	0,2059	F1 – các PCB	<LOQ
		F2 – các PAH	910
		F3 – Các indol/các chất tự nhiên	5,4
Sữa chua	0,1384	F1 – các PCB	<LOQ
		F2 – các PAH	1,7
		F3 – Các indol/các chất tự nhiên	14
FN01	0,2030	F1 – các PCB	<LOQ
		F2 – các PAH	8,7
		F3 – Các indol/các chất tự nhiên	170

Trong ví dụ này được thể hiện rằng việc chiết của các phối tử AhR từ các sản phẩm sữa bò và chất béo thực vật tiếp theo sau bởi việc phân tách sau đó của các PAH không ổn định chuyển hóa, “độc tính” ổn định chuyển hóa, và các phối tử AhR “tự nhiên” không ổn định chuyển hóa có mặt trong các phần chiết mẫu, biểu thị rõ ràng sự có mặt của các mức cao hơn nhiều và các loại khác nhau của các phối tử AhR trong AMF, kem như được so sánh với FN01 và sữa chua như được xác định sử dụng các sinh thử nghiệm gen báo cáo PAH CALUX®. Trong AMF và kem, hoạt tính PAH CALUX chủ yếu là kết quả của sự có mặt của các phối tử AhR “bình thường” không ổn định chuyển hóa như là các PAH. Ngược lại, hoạt tính PAH CAUX trong FN01 chủ yếu được gây ra bởi sự có mặt của các phối tử AhR “tự nhiên” không ổn định chuyển hóa như là các dẫn xuất indol và các chất chuyển hóa tryptophan.

Ví dụ 2

- A) Nghiên cứu ở người: việc ngăn ngừa sự mất chức năng rào cản bởi chế phẩm dinh dưỡng sau thách thức NSAID
- B) Hoặc sử dụng ETEC như mô hình, sử dụng chế phẩm, đo chức năng rào cản với các chất đánh dấu tương ứng

Việc điều chế của sản phẩm thử nghiệm bột nền

Sữa nguyên phần tươi và sữa không kem được chuẩn hóa theo tỷ lệ protein/chất béo và cung cấp Igs hoạt hóa. Vào đó được bổ sung các chất khoáng trộn sơ bộ, các vitamin trộn sơ bộ và lactoza. Sản phẩm được xử lý nhiệt trong 30 giây ở 75 C, được bay hơi trong MVR ở 60 C, được đồng nhất (120/30 bar) và được xịt khô.

Việc điều chế của sản phẩm tham chiếu bột nền

Các chất khoáng trộn sơ bộ, các vitamin trộn sơ bộ + lactoza được trộn lẫn với sữa không kem. Sản phẩm được gia nhiệt cho tới 80 C, được giữ trong 2 phút ở nhiệt độ này và sau đó được gia nhiệt trong 5 giây ở 100 C trong DSI tiếp theo sau bởi việc bay hơi trong MVR ở 68 C. Hỗn hợp chất béo thực vật được thêm sau khi bay hơi, tiếp theo sau bởi việc đồng nhất hóa (120/30 bar) và xịt khô.

Thành phần của bột nền (g/100 g)	Thử nghiệm	Tham chiếu
Protein [Nx6,25]	19,5	18,8
Chất béo	16,6	21,6
Lượng chất béo sữa trong chất béo	16,4	0,3
Lactoza	55,4	51,2
Các chất khoáng	4,3	4,2
Các chất khác	2,2	2,2
Các thành phần trộn lẫn (g/100g)	Thử nghiệm	Tham chiếu
Sản phẩm thử nghiệm bột nền	77,1	
Sản phẩm tham chiếu bột nền		83,0
Bột các galacto-oligosacarit (GOS)	4,4	4,4
Sirô glucoza	5,5	9,7
Bột trộn lẫn chất béo	10,0	0
2'Fucosyllactoza	0,5	0,5
Lactoferin	0,52	0,52

Các nucleotit, các nguyên tố vi lượng	1,16	1,16
Dầu / các chất khoáng / các vitamin	0,81	0,76
Sau khi hoàn nguyên 15 g bột với 90 ml nước chế phẩm bao gồm:		
	Thử nghiệm	Tham chiếu
Tổng IG [mg/100 g]	28	29
IG hoạt hóa [mg/100 g]	21	0
Chất béo sữa [g/100 g]	12,6	0,2
Chất béo sữa/tổng chất béo	70%	1%

Ví dụ 2A Ngăn ngừa sự mất chức năng rào cản đường ruột bởi NSAID

Để đánh giá các hiệu quả của chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế về chức năng rào cản ruột, thử nghiệm chéo ở những người tình nguyện trưởng thành được thực hiện. Các tình nguyện viên (bảy người trưởng thành khỏe mạnh) được nhận chế phẩm dinh dưỡng trong khoảng thời gian 1 tuần trước khi ăn indomethacin trong 5 ngày cơ bản như được mô tả trong (Playford et al 1999 Gut vol 44 pp 653–8).

Khả năng thấm rào cản đường ruột được đánh giá bằng việc đánh giá tỷ lệ lactuloza/rhamnoza trong nước tiểu như sau đây. Sau khi nhịn đói qua đêm, các đối tượng làm trống bàng quang của họ và sau đó uống dung dịch đường được chuẩn hóa chứa 5 g lactuloza, 2 g mannitol và 1 g rhamnoza trong tổng cộng 450 ml nước (sự thẩm thấu được tính toán 69 osmol/kg nước). Các đối tượng được cho phép tiêu thụ không giới hạn dịch sau giờ đầu tiên của thử nghiệm để đảm bảo đầu ra nước tiểu đạt yêu cầu. Nước tiểu được thu thập và được gộp lại trong 5 giờ tiếp theo và tổng thể tích được ghi lại. Tỷ lệ lactuloza/rhamnoza được sử dụng như chỉ số của chấn thương đường ruột.

Tiếp sau việc đánh giá khả năng thấm đường cơ sở ban đầu và việc thu thập của mẫu phân đường cơ sở, các tình nguyện viên thu, theo thứ tự ngẫu nhiên, chế phẩm dinh dưỡng (ví dụ 18,75 gam bột được hòa tan trong 125 ml, hai lần mỗi ngày) hoặc chế phẩm đối chứng trong 7 ngày. Trong 5 ngày cuối cùng của mỗi tay thử nghiệm, họ cũng tiêu thụ indomethacin 50 mg, tds. Tại cuối chu kỳ thử nghiệm khả năng thấm đường ruột được đánh giá lại, và mẫu phân khác được thu thập. Khoảng thời gian 'làm sạch' 2 tuần được đặt giữa hai giai đoạn thử nghiệm. Sau đó các tình nguyện viên trải qua cùng quy trình, nhưng tiêu thụ các chế phẩm khác, sao cho tất cả các cá thể được tiến hành cả chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế và chế phẩm thử nghiệm.

Các mẫu phân được sử dụng để đo các chỉ thị chức năng rào cản ruột như được đo trong nước phân được thu thập từ các mẫu phân.

Các phần chiết nước phân được chuẩn bị bằng việc bổ sung 3,6 ml PBS và 40 μ l chất ức chế Proteaza (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Hà Lan P8340) vào 9,4 gam phân, lắc ít nhất 30 giây, và ly tâm ở 3000x g trong 10 phút ở 4°C. Các phần chiết của phân được lưu trữ ở -80°C cho đến khi đo.

Để đánh giá chức năng rào cản ruột Calprotectin phân (Human S100A8/S100A9), alpha-1-antitrypsin (Human SERPIN-A1) và Zonulin được đo trong các phần chiết nước phân bởi ELISA theo các hướng dẫn của nhà sản xuất (Calprotectin và alpha-1-antitrypsin: Các hệ thống R&D, zonulin : Alere).

Trong tay đối chứng, 5 ngày tiêu thụ indometacin được kỳ vọng là gây ra sự tăng các tỷ lệ lactuloza/rhamnoza. Việc đồng sử dụng chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế sẽ dẫn đến sự tăng thấp hơn hoặc không tăng.

Ví dụ 2B : Tác động trong mô hình thử thách ETEC

Tác động của chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế cũng được nghiên cứu trong mô hình lây nhiễm ETEC thử nghiệm tình nguyện viên người trưởng thành như được mô tả trong ví dụ mười Bruggencate 2016.

Người trưởng thành khỏe mạnh, tuổi từ 18 đến 55, được tuyển dụng cho nghiên cứu và các cá thể mà sử dụng các thuốc kháng sinh, các thuốc ức chế miễn dịch, các thuốc kháng axit, các thuốc nhuận tràng, hoặc các thuốc chống tiêu chảy trong vòng 3 tháng trước khi nghiên cứu, đang có hoặc có từ trước bệnh nền của tuyến dạ dày ruột, hoặc bất dung nạp lactoza được loại trừ.

Khả năng thâm rào cản đường ruột được đánh giá bằng việc đánh giá tỷ lệ lactuloza/rhamnoza trong nước tiểu như sau đây. Sau khi nhịn đói qua đêm, các đối tượng làm rỗng bàng quang của họ và sau đó uống dung dịch đường được chuẩn hóa chứa 5 g lactuloza, 2 g mannitol và 1 g rhamnoza trong tổng cộng 450 ml nước (sự thẩm thấu được tính toán 69 osmol/kg nước). Các đối tượng được cho phép tiêu thụ không giới hạn dịch sau giờ đầu tiên của thử nghiệm để đảm bảo đầu ra nước tiểu đạt yêu cầu. Nước tiểu được thu thập và được gộp lại trong 5 giờ tiếp theo và tổng thể tích

được ghi lại. Tỷ lệ lactuloza/rhamnoza được sử dụng như chỉ số của chấn thương đường ruột, sự kết hợp mà đã được khuyến nghị cho việc đánh giá bệnh đường ruột.

Sau khi đạt sàng lọc thứ nhất này, mẫu máu khi không nhịn ăn được thu thập. Sera được chuẩn bị và được phân tích cho IgG đặc hiệu đối với epitop sinh miễn dịch đặc hiệu của kháng nguyên tác nhân xâm nhập *E. coli* tiêu chảy II (CFAII). Ngoài ra, mẫu phân tươi được thu thập và được phân tích cho *E. coli* tiêu chảy bởi qPCR. Các cá nhân với các độ chuẩn globulin miễn dịch có thể phát hiện đối với CFAII, được gây ra bởi các nhiễm trùng ETEC trước đó, hoặc các số đếm *E. coli* tiêu chảy phân có thể phát hiện được loại trừ từ việc tham gia vào nghiên cứu bởi nhiều khả năng chống lại chủng *E. coli* được dùng trong nghiên cứu này. Nghiên cứu có 2 kết quả chính: sự bài tiết *E. coli* tiêu chảy phân và đầu ra phân. Trên cơ sở thử nghiệm thống kê 2 chiều cho dữ liệu không được ghép cặp, $a = 0,05$ (xác suất của sai số loại I) và $b = 0,20$ (xác suất của sai số loại II), và để bù cho các phần bỏ, 30 người tham gia mỗi nhóm nên được bao gồm. Những người tham gia được tăng theo theo tuổi, giới tính, lactobacilli ở phân, và các độ chuẩn globulin miễn dịch có thể phát hiện đối với CFAII (được xác định khi sàng lọc) và được chỉ định ngẫu nhiên cho MFGM hoặc nhóm đối chứng. Việc phân tầng và ngẫu nhiên hóa được thực hiện bởi người không bị ràng buộc không tham gia vào nghiên cứu. Mã ngẫu nhiên của mỗi người tham gia được giữ trong các phong bì niêm phong, và mã được mở sau khi hoàn thành tất cả các phân tích phòng thí nghiệm và thống kê.

Nghiên cứu can thiệp song song bốn tuần, vô danh hai lần, đối chứng giả, ngẫu nhiên được thực hiện. Những người tham gia được hướng dẫn là duy trì mẫu hình thông thường của họ về hoạt động thể chất và khẩu phần thói quen của họ trong suốt toàn bộ nghiên cứu, nhưng kiêng các sản phẩm từ sữa và các sản phẩm chứa các lợi khuẩn và nguồn thức ăn cho lợi khuẩn. Những người tham gia nhận danh sách các sản phẩm từ sữa và các sản phẩm giàu các lợi khuẩn và nguồn thức ăn cho lợi khuẩn trong nhật ký đối tượng giấy của họ. Các thực phẩm từ sữa không được bao gồm trong khẩu phần bởi vì chúng góp phần đáng kể vào tổng lượng tiêu thụ canxi hàng ngày. Các sản phẩm bơ sữa được thay thế bằng việc cung cấp cho những người tham gia các thức uống đậu nành ít canxi. Trong toàn bộ nghiên cứu, những người tham gia tiêu thụ hai lần mỗi ngày 250 mL đồ uống sữa đậu nành (ví dụ Alpro- Soya Bio Nature). Các đồ

uống được tiêu thụ vào buổi sáng (125 mL) và buổi tối (125 mL) trong bữa sáng và bữa tối.

Bốn ngày sau thử thách *E. coli* tiêu chảy và 24 giờ sau thử thách *E. coli* tiêu chảy, khả năng thấm rào cản đường ruột được đánh giá bằng việc đánh giá tỷ lệ lactuloza/rhamnoza trong nước tiểu như được mô tả ở trên.

Hai ngày trước và 2 ngày sau thử thách *E. coli* tiêu chảy, những người tham gia báo cáo một cách định lượng tất cả thực phẩm và đồ uống được tiêu thụ trong nhật ký dinh dưỡng trực tuyến. Khối lượng của thực phẩm và đồ uống được tiêu thụ được lưu ý. Nếu không biết, các lượng được tiêu thụ được thể hiện bằng dụng cụ đo trong gia đình (ví dụ, cốc, lát). Năng lượng trung bình hàng ngày và lượng tiêu thụ dinh dưỡng đa lượng trong mỗi giai đoạn được tính toán, ví dụ sử dụng bảng chế phẩm thực phẩm được vi tính hóa computerized [NEVO phiên bản trực tuyến 2011/3.0; RIVM (Viện quốc gia về sức khỏe cộng đồng và môi trường)].

Những người tham gia được yêu cầu trộn lẫn 18,75 gam công thức theo sáng chế hoặc chế phẩm dinh dưỡng được xử lý nhiệt độ cao như trong ví dụ 2A (sản phẩm tham chiếu) chứa cùng lượng của calori, protein và đường (nhóm đối chứng) hai lần mỗi ngày trong 125 ml của đồ uống sữa đậu nành của họ trong suốt toàn bộ nghiên cứu.

Sau thời gian thích thức 2 tuần với các sản phẩm can thiệp, những người tham gia nhịn ăn trong ít nhất 4 giờ trước thử thách đường miệng với chủng *E. coli* tiêu chảy sống nhưng giảm độc lực như được mô tả ở trên (Bovee-Oudenhoven 2003; Ouwehand 2014). Chủng *E. coli* được sử dụng (E1392/75-2A) là biến thể dương tính CFAR không bền nhiệt/ổn định nhiệt (LT/ST) của chủng O6:H16 LT'/ST' độc tố ruột trước đó. Trước (vào ngày 21) và sau (vào các ngày 1, 2, 3, 4, và 14) thử thách *E. coli* tiêu chảy, ADN được phân lập từ các mẫu phân lỏng được đồng nhất, và *E. coli* tiêu chảy được định lượng bởi qPCR như được mô tả trước đó (Ten Bruggencate et al 2015).

Trước (vào các ngày 21 và 22) và sau (vào các ngày 1, 2, 3, 4, và 14) thử thách *E. coli* tiêu chảy, các mẫu phân 24 giờ được thu thập. Các mẫu phân được đông lạnh ở 22°C ngay sau khi đại tiện và được vận chuyển tới phòng thí nghiệm trong các điều kiện đông lạnh, được cân, và được đồng nhất hóa; các phân phân ước được lưu trữ ở

22°C cho các phân tích sau này. Tiêu chảy được xác định bằng tổng lượng phân ướt bài tiết hàng ngày (tổng đầu ra phân), và bằng phần trăm của khối lượng phân khô như được xác định sau khi đông khô (độ đặc của phân).

Trong toàn bộ nghiên cứu, những người tham gia báo cáo hàng ngày thông tin về độ đặc của phân bằng việc sử dụng thước đo phân Bristol Stool (Heaton et al 1991) và về tần suất phân trong nhật ký trực tuyến. Hơn thế nữa, trong nhật ký trực tuyến, những người tham gia hàng ngày ghi lại các triệu chứng theo thang đánh giá triệu chứng tiêu hóa đã được xác thực (GSRS) (Svedlund et al 1988). GSRS là một công cụ dành riêng cho bệnh gồm 15 mặt hàng kết hợp thành 5 cụm triệu chứng: trào ngược, đau bụng, khó tiêu, tiêu chảy và táo bón. Vùng "tiêu chảy" bao gồm lượng phân tăng lên, phân lỏng và đi cầu gấp. GSRS có thang điểm kiểu Likert 7 điểm, trong đó 1 = không khó chịu, 2 = khó chịu ít, 3 = khó chịu nhẹ, 4 = khó chịu vừa, 5 = khó chịu vừa phải, 6 = khó chịu nặng, 7 = khó chịu rất nặng.

Các mẫu máu (10 mL) được lấy bởi nhân viên có chuyên môn của bệnh viện địa phương vào một thời điểm trước (ngày 24) và vào 2 thời điểm sau (ngày 3 và 14) khi thử thách E. coli tiêu chảy. Sera được chuẩn bị bởi việc ly tâm tốc độ thấp (20 phút ở 3000 g ở 10°C) và được lưu trữ ở 28°C. Các nồng độ của IgG đặc hiệu đối với CFAII trong sera được xác định bởi ELISA trực tiếp như đã được mô tả ở phần khác (Bovee-Oudenhoven et al 2003).

Các phân chiết nước phân được chuẩn bị bằng việc bổ sung 3,6 ml PBS và 40µl chất ức chế Proteaza (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Hà Lan P8340) vào 9,4 gam phân, lắc ít nhất 30 giây, và được ly tâm ở 3000x g trong 10 phút ở 4°C. Các phân chiết của phân được lưu trữ ở -80°C cho đến khi đo.

Để đánh giá chức năng rào cản ruột Calprotectin phân (Human S100A8/S100A9), alpha-1-antitrypsin (Human SERPIN-A1) và Zonulin được đo trong các phân chiết nước phân bởi ELISA theo các hướng dẫn của nhà sản xuất (Calprotectin và alpa1-antitrypsin: các hệ thống R&D, zonulin : Alere).

Trong nghiên cứu này, chế phẩm dinh dưỡng theo sáng chế làm giảm các triệu chứng tiêu chảy sau khi thử thách ETEC như được chứng minh bởi tần suất thấp hơn của phân, phân lỏng, điểm triệu chứng đường dạ dày ruột, và sự cải thiện của rào cản

đường ruột như được chứng minh bởi việc giảm của các đánh dấu chức năng rào cản trong các phần chiết nước phân và bởi tỷ lệ lactoza/rhamnoza trong nước tiểu.

Ví dụ 3: Việc tạo chế phẩm công thức cho trẻ sơ sinh và sữa cho sự lớn lên

Trong bảng 3, ví dụ của công thức cho trẻ sơ sinh và sữa cho sự lớn lên được thể hiện. Liều lượng dùng của công thức cho trẻ sơ sinh là khoảng 13 g / 100 mL, liều lượng dùng của sữa cho sự lớn lên là 15 g / 100 mL

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng các lượng chính xác của tất cả các thành phần có thể được điều chỉnh cho các nhóm tuổi khác nhau hoặc để đạt các yêu cầu quy định.

Bảng 3 Chế phẩm công thức cho trẻ sơ sinh và công thức cho sự lớn lên

Thành phần		Công thức cho trẻ sơ sinh	Sữa cho sự lớn lên
Sữa Ceramic MicroFiltered (CMF) (dạng lỏng)	kg chất rắn/100 kg	3-4	14-18
Chất cô protein huyết thanh sữa	kg chất rắn/100 kg	14-16	17-21
Kem	kg chất rắn/100 kg	14-16	9-12
Lactoza	kg/100 kg	40-44	33-35
Hỗn hợp chất béo thực vật	kg/100 kg	12-15	8-12
Dầu/các chất khoáng /các vitamin	kg/100 kg	2-4	1-3
Các galacto-oligosacarit	kg/100 kg	4-5	4-6
Các nucleotit, các nguyên tố vi lượng	kg/100 kg	1,1-1,9	0,5-2
Chất cô protein nước sữa	kg/100 kg	1,5-5	2-4

Lactoferin	kg/100 kg	0,1-0,5	0,1-0,5
HMO	kg/100 kg	0,1-0,5	0,1-0,6
Tổng IG	kg/100 kg	0,05 – 0,5	0,05 – 0,5
IG hoạt tính	Kg/100 kg	0,02 – 0,4	0,02 – 0,4

Cần hiểu rằng công thức cho công thức dành cho trẻ sơ sinh cũng có thể được sử dụng cho công thức tiếp nối. Công thức cho trẻ sơ sinh hoặc công thức tiếp nối có thể được tạo dạng bột sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực cung cấp chế phẩm không được tiến hành các nhiệt độ trên 80°C.

Trong một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm như được định rõ trong Bảng 3. Trong một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm như được định rõ trong Bảng 3 trong đó các galacto-oligosacarit đã được thay thế với một hoặc nhiều các oligosacarit không tiêu hóa được khác.

Tài liệu tham khảo

- Bach Knudsen KE, Lærke HN, Hedemann MS, Nielsen TS, Ingerslev AK, Gundelund Nielsen DS, Theil PK, Purup S, Hald S, Schioldan AG, Marco ML, Gregersen S, Hermansen K13. Impact of Diet-Modulated Butyrate Production on Intestinal Barrier Function and Inflammation. *Nutrients*. 2018 Oct 13;10(10). pii: E1499. doi: 10.3390/nu10101499.
- Bischoff, S. C. (2011). "Gut health": a new objective in medicine? *BMC Medicine*, 9(1), 24. <http://doi.org/10.1186/1741-7015-9-24>
- Bischoff, S. C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J.-D., Serino, M., ... Wells, J. (2014). Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*, 14(1), 189. <http://doi.org/10.1186/s12876-014-0189-7>
- Bovee-Oudenhoven IM, Lettink-Wissink ML, Van Doesburg W, Witteman BJ, Van Der Meer R. Diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* infection of humans is inhibited by dietary calcium. *Gastroenterology* 2003;125:469–76.
- D'Souza et al: Differing roles of short chain fatty acids and GPR43 agonism in the regulation of intestinal barrier function and immune responses. Publication/Journal: PLOS One Publication date:2017 Volume/Issue: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180190> Pages: 1-22
- den Hartog G, Jacobino S, Bont L, Cox L, Ulfman LH, Leusen JHW, van Neerven RJJ. Specificity and Effector Functions of Human RSV-Specific IgG from Bovine Milk. *PLoS One* (2014) 9:e112047. doi:10.1371/journal.pone.0112047
- Hall, K. E., Proctor, D. D., Fisher, L., & Rose, S. (2005). American Gastroenterological Association future trends committee report: Effects of aging of the population on gastroenterology practice, education, and research. *Gastroenterology*, 129(4), 1305–1338. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.06.013>
- Heaton KW, Ghosh S, Braddon FE. How bad are the symptoms and bowel dysfunction of patients with the irritable bowel syndrome? A prospective, controlled study with emphasis on stool form. *Gut* 1991;32:73–9.

Li et al Exogenous stimuli Maintain Intraepithelial Lymphocytes via aryl Hydrocarbon Receptor Activation Publication/Journal: Cell Publication date: 2011 Volume/Issue: 147 Pages: 629-640.

Godden S, McMartin S, Feirtag J, Stabel J, Bey R, Goyal S, Metzger L, Fetrow J, Wells S, Chester-Jones H. Heat-treatment of bovine colostrum. II: effects of heating duration on pathogen viability and immunoglobulin G. *J Dairy Sci.* 2006 Sep;89(9):3476-83.

Li SQ, Zhang HQ, Balasubramaniam VM, Lee YZ, Bomser JA, Schwartz SJ, Dunne CP. Comparison of effects of high-pressure processing and heat treatment on immunoactivity of bovine milk immunoglobulin G in enriched soymilk under equivalent microbial inactivation levels. *J Agric Food Chem.* 2006 Feb 8;54(3):739-46.

Man, A. L., Gicheva, N., & Nicoletti, C. (2014). The impact of ageing on the intestinal epithelial barrier and immune system. *Cellular Immunology*, 289(1-2), 112–118. <http://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.04.001>

Natividad JM, Agus A, Planchais J, Lamas B, Jarry AC, Martin R, Michel ML, Chong-Nguyen C, Roussel R, Straube M, Jegou S, McQuitty C, Le Gall M, da Costa G, Lecornet E, Michaudel C, Modoux M, Glodt J, Bridonneau C, Sovran B, Dupraz L, Bado A, Richard ML, Langella P, Hansel B, Launay JM, Xavier RJ, Duboc H, Sokol H. Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome. *Cell Metab.* 2018 Nov 6;28(5):737-749.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2018.07.001.

Ohnuki H. and Otani H. Antigen - binding and protein G - binding abilities of immunoglobulin G in hyperimmunized cow's milk treated under various conditions 2005. 76: 283-290

Ouwehand AC, Ten Bruggencate SJ, Schonewille AJ, Alhoniemi E, Forssten SD, Bovee-Oudenhoven IM. Lactobacillus acidophilus supplementation in human subjects and their resistance to enterotoxigenic Escherichia coli infection. *Br J Nutr* 2014;111:465–73.

Playford RJ, Floyd DN, Macdonald CE, Calnan DP, Adenekan RO, Johnson W, Goodlad R a, Marchbank T. Bovine colostrum is a health food supplement which prevents NSAID induced gut damage. *Gut* (1999) 44:653–8

Svedlund J, Sjodin I, Dotevall G. GSRS—a clinical rating scale for gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease. *Dig Dis Sci* 1988;33:129–34.

Ten Bruggencate SJ, Girard SA, Floris-Vollenbroek EG, Bhardwaj R, Tompkins TA. The effect of a multi-strain probiotic on the resistance toward *Escherichia coli* challenge in a randomized, placebo-controlled, double-blind intervention study. *Eur J Clin Nutr* 2015;69(3):385–91.

Ten Bruggencate SJ, Frederiksen PD, Pedersen SM, Floris-Vollenbroek EG, Lucas-van de Bos E, van Hoffen E, and Wejse PL Resistance to Diarrheagenic *Escherichia coli* in Healthy Adults in a Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Study.. *J Nutr* 2016;146:249–55.)

Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(11), 799–809. <http://doi.org/10.1038/nri2653>

Valentini, L., Ramminger, S., Haas, V., Postrach, E., Werich, M., Fischer, A., ... Schulzke, J.-D. (2014). Small intestinal permeability in older adults. *Physiological Reports*, 2(4), e00281. <http://doi.org/10.14814/phy2.281>

Wang, J., Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., ... Wang, J. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 490(7418), 55–60. <http://doi.org/10.1038/nature11450>

Zhang, X., Shen, D., Fang, Z., Jie, Z., Qiu, X., Zhang, C., ... Ji, L. (2013). Human Gut Microbiota Changes Reveal the Progression of Glucose Intolerance. *PLoS ONE*, 8(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0071108>.

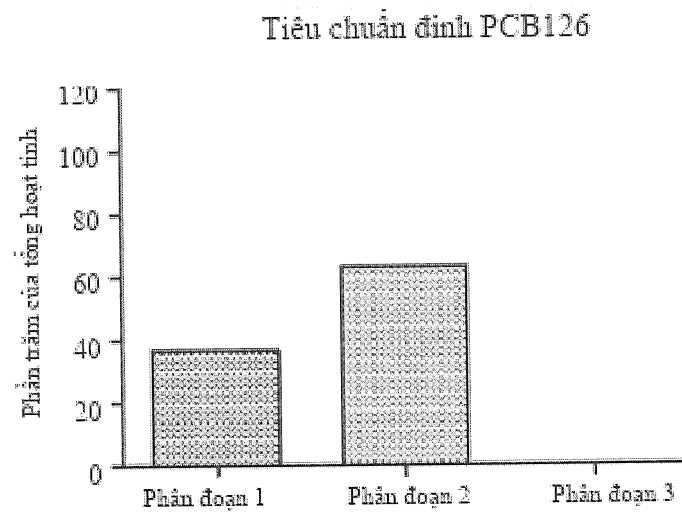
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm dinh dưỡng tổng hợp bao gồm:
 - i. chất béo sữa động vật nhai lại, trong đó chất béo sữa này có khả năng hoạt hóa thụ thể aryl hydrocarbon (AhR) trong thử nghiệm hoạt tính AhR như được xác định trong Ví dụ 1; và
 - ii. globulin miễn dịch động vật nhai lại với lượng là giữa 115 μ g và 50 mg mỗi gam chế phẩm khô;khác biệt ở chỗ ít nhất 30% globulin miễn dịch động vật nhai lại không bị biến tính;
và trong đó lượng chất béo sữa là giữa 10 và 60 g chất béo mỗi 100 gam công thức, trong đó lượng chất béo động vật nhai lại là giữa 5 và 90% theo khối lượng như được xác định cho tổng lượng chất béo, và trong đó chất béo sữa động vật nhai lại không bị tiếp xúc với độ pH < 5,0.
2. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm 1, trong đó chất béo sữa động vật nhai lại không bị tiếp xúc với nhiệt độ trên 80°C.
3. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chất béo sữa động vật nhai lại là chất béo sữa bò và chất béo được lựa chọn từ nhóm bao gồm sữa nguyên phần, kem, và chất béo sữa khan (AMF); tốt hơn là trong đó loài bò là bò cái.
4. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm là trong trạng thái khô bao gồm ít nhất 70% theo khối lượng chất khô, tốt hơn là ít nhất 80% theo khối lượng chất khô, tốt hơn nữa là ít nhất 90% theo khối lượng chất khô, tốt nhất là ít nhất 92% theo khối lượng chất khô.
5. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó globulin miễn dịch được lựa chọn từ một hoặc nhiều trong nhóm bao gồm IgG, IgA, IgM, sIgA, tốt hơn là trong đó globulin miễn dịch là IgG.
6. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó hoạt tính sinh học của globulin miễn dịch được xác định trong thử nghiệm ELISA mà phân biệt giữa globulin miễn dịch nguyên bản và bị biến tính.

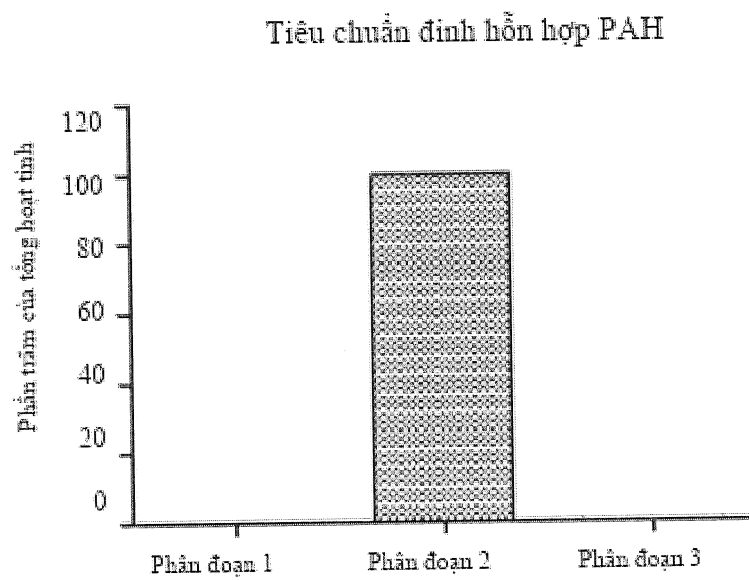
7. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chất béo sữa hoạt hóa thụ thể aryl hydrocarbon trong thử nghiệm Calux.
8. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm này còn bao gồm một hoặc nhiều oligosacarit được lựa chọn từ nhóm bao gồm các oligosacarit sữa mẹ (HMO) và các oligosacarit không tiêu hóa được; tốt hơn là trong đó lượng HMO là giữa 0,01 và 5,0 gam mỗi 100 gam chế phẩm và/hoặc trong đó lượng oligosacarit không tiêu hóa được là giữa 0,1 và 25 gam mỗi 100 gam chế phẩm khô.
9. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm này còn bao gồm lợi khuẩn.
10. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm này còn bao gồm lactoferin, tốt hơn là lactoferin bò.
11. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm này bao gồm:
 - i. giữa 10 và 60 g chất béo mỗi 100 gam công thức, trong đó lượng chất béo từ động vật nhai lại là giữa 5 và 90% theo khối lượng như được xác định với tổng lượng của chất béo;
 - ii. giữa 115 μg và 50 mg globulin miễn dịch động vật nhai lại mỗi gam chế phẩm (khối lượng khô);
 - iii. giữa 10^6 và 10^9 cfu lợi khuẩn mỗi gam sản phẩm khô;
 - iv. giữa 0,1 và 25 gam oligosacarit không tiêu hóa được mỗi 100 gam công thức (khối lượng khô);
 - v. giữa 0,01 và 5,0 gam HMO mỗi 100 gam sản phẩm khô;
 - vi. giữa 0,1 và 20 mg lactoferin mỗi gam sản phẩm khô.
12. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm là hỗn hợp trộn sơ bộ thành phần, tốt hơn là hỗn hợp trộn sơ bộ dinh dưỡng đầu đời.

13. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm được lựa chọn từ một hoặc nhiều trong nhóm bao gồm công thức cho trẻ sơ sinh, công thức nối tiếp và công thức cho trẻ nhỏ.
14. Chế phẩm dinh dưỡng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó chế phẩm là công thức cho trẻ sinh non hoặc công thức cho người trưởng thành hoặc người lớn tuổi.

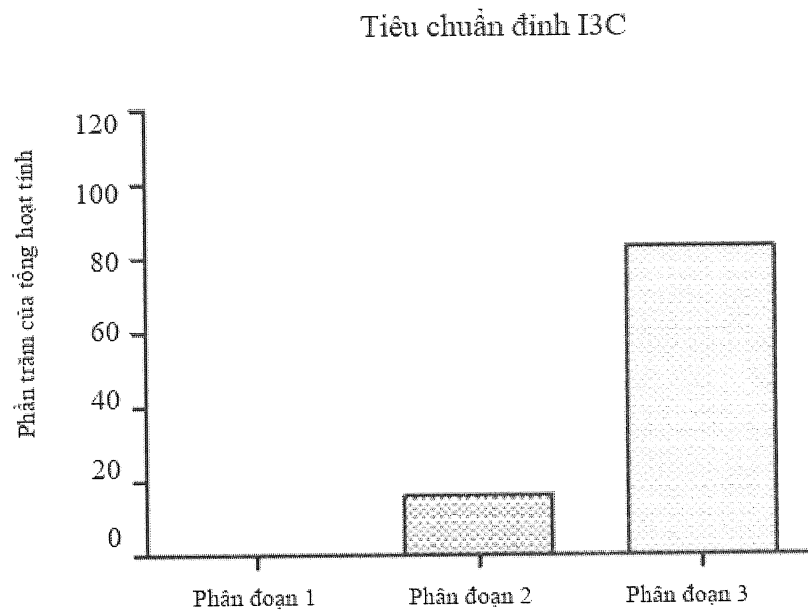
Hình 1 A



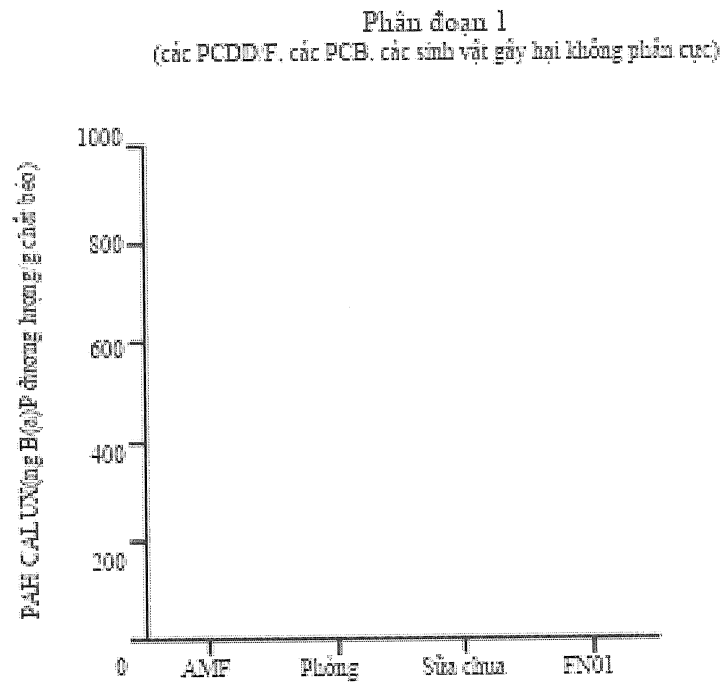
Hình 1 B



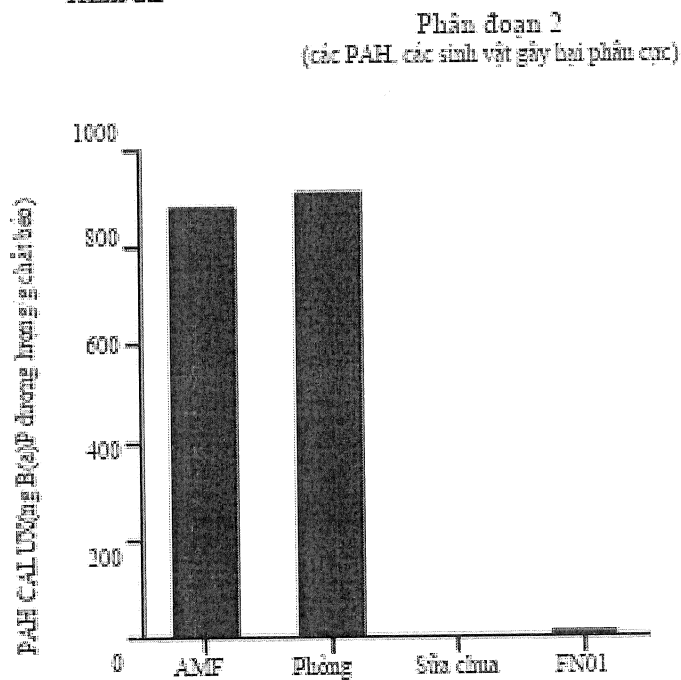
Hình 1 C



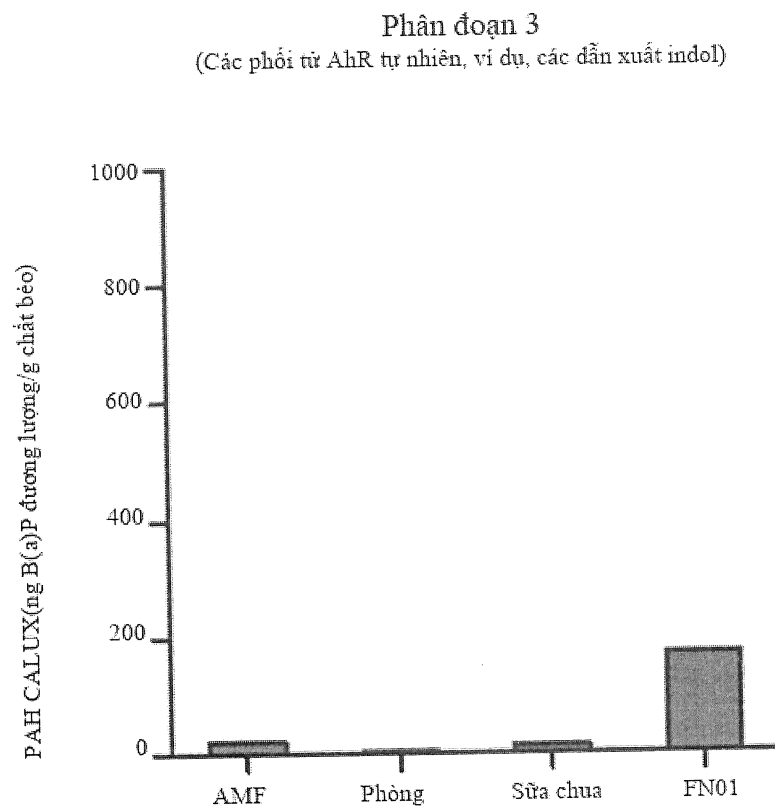
Hình 2A



Hình 2B



Hình 2C



Hình 3

