



(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)



1-0054009

(51)^{2021.01} A61K 8/98; A61K 35/20; A61P 17/02; (13) B
A61Q 7/00; A61Q 19/02; A61Q 19/08;
A61Q 5/02; A23L 33/10; A61Q 19/00

(21) 1-2022-04071

(22) 27/11/2020

(86) PCT/KR2020/017151 27/11/2020

(87) WO 2021/107706 03/06/2021

(30) 10-2019-0156058 28/11/2019 KR

(45) 25/11/2025 452

(43) 26/09/2022 414A

(73) EXOGENIQUE CO., LTD. (KR)

132 Dokseodang-ro, Yongsan-gu, Seoul, 04420, Republic of Korea

(72) KIM, Sun Hwa (KR); YANG, Yoosoo (KR); KIM, Hyo Suk (KR); KWAK, Gi-Jung (KR); JANG, Ye Ji (KR).

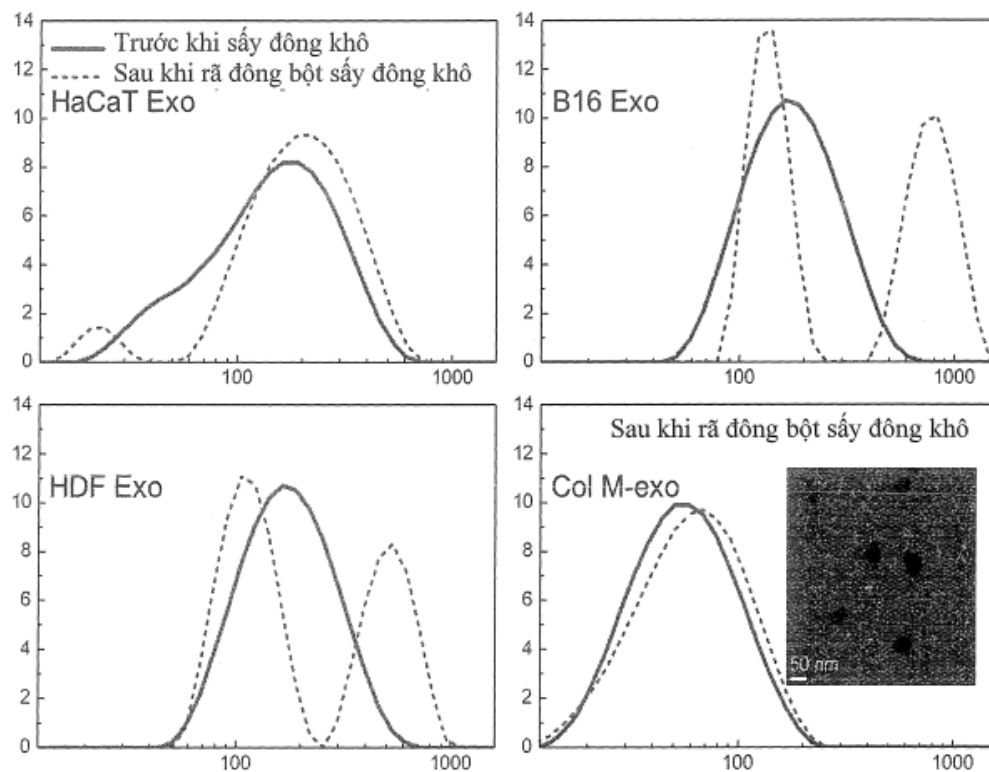
(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) CHẾ PHẨM MỸ PHẨM CHỨA EXOSOME TỪ SỮA NON

(21) 1-2022-04071

(57) Sáng chế đề cập đến cách sử dụng mới của exomes sữa, và cụ thể hơn là đề xuất các sử dụng khác nhau của các exosome sữa, chẳng hạn như trong mỹ phẩm chức năng, thực phẩm chức năng cho sức khỏe với các chức năng khác nhau như cải thiện sức khỏe đường ruột và khả năng miễn dịch, và các dược phẩm bao gồm thuốc chữa lành vết thương, và phương pháp tách exosome từ sữa hoặc sữa dê.

FIG.7A



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến cách sử dụng mới của các exosome (chất tiết tế bào gốc) sữa, và cụ thể hơn là đề cập đến những cách sử dụng khác nhau của các exosome sữa trong chế phẩm mỹ phẩm chức năng, thực phẩm chức năng cho sức khỏe, dược phẩm, và các sản phẩm tương tự, và phương pháp tách exosome từ sữa bò hoặc sữa dê.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Exosome là những túi có kích thước từ vài chục đến hàng trăm nanomet (nm), được cấu tạo từ các lớp phospholipit kép giống với cấu trúc của màng sinh chất. Các exosome chứa các tiểu thể vận chuyển (cargo) exosome gồm protein, axit nucleic (mARN, miARN, v.v.) và tương tự, và trong các tiểu thể vận chuyển exosome này bao gồm một loạt các yếu tố tín hiệu, và các yếu tố tín hiệu này được biết đến là đặc trưng cho các loại tế bào và được điều chỉnh khác nhau tùy theo môi trường của tế bào tiết. Biết rằng exosome là chất trung gian truyền tín hiệu gian bào do tế bào tiết ra, và các tín hiệu tế bào khác nhau được truyền qua các exosome điều chỉnh các trạng thái tế bào bao gồm kích hoạt, tăng trưởng, di chuyển, biệt hóa, biệt hóa ngược, gây chết tế bào và hoại tử của các tế bào đích. Biết rằng các exosome chứa các vật liệu di truyền cụ thể và các yếu tố hoạt tính sinh học theo bản chất và trạng thái của tế bào ban đầu của chúng.

Vì các exosome về cơ bản có nguồn gốc từ các tế bào, chúng tương hợp sinh học, không giống như các hạt nano khác, và nhờ khả năng mang hoặc đánh dấu thuốc hoặc thành phần hoạt tính sinh học bên trong hoặc trên bề mặt, đã có nỗ lực liên tục để sử dụng exosome làm chất mang thuốc hoặc nguyên liệu thô cho mỹ phẩm hoặc thuốc.

Về vấn đề này, patent Hàn Quốc số KR2039302 đã bộc lộ chế phẩm mỹ phẩm để tăng cường và cải thiện chức năng hàng rào bảo vệ da của lớp sừng bao gồm các exosome có nguồn gốc từ tế bào gốc làm thành phần hoạt tính; patent Hàn Quốc số KR1662405 đã bộc lộ chế phẩm dược phẩm để điều trị các bệnh mạch máu não bao gồm các exosome có nguồn gốc từ tế bào gốc làm thành phần hoạt tính; patent Hàn Quốc số KR1894229 đã bộc lộ chế phẩm bao gồm các exosome có nguồn gốc từ dịch nuôi cấy tế bào gốc nhưng hươu làm thành phần hoạt tính, để ngăn ngừa hoặc điều trị rụng tóc, mọc tóc hoặc thúc đẩy sự phát triển của tóc; và công bố đơn quốc tế số WO2016039356A1 đã bộc lộ

chất chống viêm bao gồm các exosome có nguồn gốc từ sữa làm thành phần hoạt tính.

Tuy nhiên, đối với các exosome có nguồn gốc từ sữa, ngoài việc sử dụng chúng làm chất chống viêm được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO2016039356A1, và việc sử dụng làm chất mang thuốc được bộc lộ bởi Munagala *et al.* (Cancer Lett., 371 (1): 48-61, 2016), có rất ít thông tin về các công dụng khác của exosome có nguồn gốc từ sữa.

Trong khi đó, da bao gồm lớp biểu bì là biểu mô vảy phân tầng, lớp hạ bì bao gồm các mô liên kết dày đặc, và lớp mô dưới da bao gồm các mô liên kết lỏng lẻo. Lớp biểu bì nằm ở lớp ngoài cùng của da, tạo thành lớp màng bảo vệ chống thấm nước bao phủ bề mặt cơ thể, và bao gồm các lớp tế bào biểu mô vảy và lớp nền bên dưới. Lớp biểu bì không chứa mạch máu, và chỉ có một số ít dây thần kinh liên quan đến hệ thần kinh trung ương. Các loại tế bào chính cấu thành lớp biểu bì bao gồm tế bào sừng, tế bào hắc tố, tế bào Langerhans và tế bào Merkel. Lớp hạ bì là lớp da bên dưới lớp biểu bì được cấu tạo bởi các mô liên kết, có tác dụng đệm bảo vệ cơ thể khỏi áp lực và sức căng. Lớp hạ bì được kết nối chặt chẽ với lớp biểu bì thông qua lớp nền, nhờ đó nâng đỡ lớp biểu bì và cung cấp chất dinh dưỡng, đồng thời chứa một số đầu dây thần kinh cảm nhận xúc giác và nhiệt.

Da dần bị tổn thương do tuổi tác hoặc tia cực tím (tia UV), chất ô nhiễm bên ngoài và sự căng thẳng, và khi chức năng bảo vệ da khỏi các yếu tố đó giảm, khả năng bảo vệ và tăng sinh tế bào cũng giảm theo. Trong trường hợp này, cơ thể chúng ta bắt đầu quá trình tái tạo da cho vùng da bị tổn thương. Tái tạo da là bất kỳ phản ứng nào của mô chống lại tổn thương và là quá trình sinh học phức tạp, bao gồm điều hòa hóa học, biệt hóa và sao chép tế bào, tổng hợp protein nền, hình thành mạch và phục hồi vết thương, như là chuỗi các quá trình phục hồi mô (Steed, D. L. *et al.*, Clin. Plast. Surg. 25: 397, 1998).

Khi da bị tổn thương, quá trình tăng sinh tế bào diễn ra sau các phản ứng viêm, kéo dài từ 2 ngày đến 3 tuần sau khi da bị tổn thương. Trong giai đoạn này, các nguyên bào sợi lắng đọng collagen, lấp đầy vùng da bị tổn thương, tạo ra sự tăng sinh của các nguyên bào sợi, đồng thời diễn ra quá trình tái tạo các tế bào mới và các thành phần mô kẽ trong vùng bị tổn thương. Quá trình tăng sinh này, còn được gọi là quá trình tạo hạt, kéo dài từ 2 ngày đến 3 tuần sau khi hình thành vết thương. Ở lớp da non của các tế bào

mới, hoạt động của các tế bào da cao, sao cho các nguyên bào sợi ở lớp hạ bì hoạt động tích cực trong quá trình tổng hợp và chuyển hóa collagen, điều này rất quan trọng đối với sự săn chắc của da và ức chế sự hình thành nếp nhăn. Ngoài ra, quá trình tổng hợp các GAG (glucosamino-glycan), là glycoprotein có chứa axit hyaluronic cần thiết cho quá trình dưỡng ẩm da, cũng hoạt động tích cực, do đó mang lại độ săn chắc, độ ẩm và độ đàn hồi cho da. Ngoài ra, trong lớp biểu bì, các tế bào lớp nền tích cực tăng sinh và thực hiện quá trình sản xuất cân bằng các protein kết dính như laminin, integrin và desmosome giúp tăng cường kết nối giữa các tế bào da, do đó tăng cường các mô tế bào và giữ cho da khỏe mạnh.

Tuy nhiên, vì khả năng tái tạo da giảm dần theo tuổi tác, khi da bị tổn thương bởi tia cực tím, chất ô nhiễm hoặc sự căng thẳng, quá trình tái tạo da diễn ra không hoàn toàn. Do đó, da mất đi độ săn chắc, hình thành các nếp nhăn, trải qua các quá trình đổi màu và tăng sắc tố như đồi mồi, vết thâm, tàn nhang và đốm đen, đồng thời mất khả năng giữ nước.

Vì vậy, để giữ cho làn da săn chắc, ẩm và khỏe mạnh, việc phục hồi khả năng tái tạo da bị suy giảm theo tuổi tác có thể là quan trọng nhất. Các giải pháp đã được bộc lộ liên quan đến chế phẩm mỹ phẩm chức năng cho các mục đích tái tạo da như vậy bao gồm: patent Hàn Quốc số KR1888258 đã đề xuất chế phẩm tái tạo da bao gồm tinh dầu chiết xuất từ hoa Daisy fleabane làm thành phần hoạt tính; patent Hàn Quốc số KR1422690 đã đề xuất chế phẩm tái tạo da bao gồm các chất tiết dịch nuôi cấy của tế bào định hướng tạo mạch có nguồn gốc từ tế bào gốc phôi; và patent Hàn Quốc số KR1663912 đã đề xuất chế phẩm mỹ phẩm làm trắng da, giảm nếp nhăn da hoặc tái tạo da bao gồm các exosome có nguồn gốc từ tế bào gốc có nguồn gốc từ mỡ người làm thành phần hoạt tính.

Tuy nhiên, các patent nêu trên có các vấn đề như chi phí sản xuất quá cao, và độ ổn định và an toàn *in vivo* chưa được kiểm chứng.

Trong khi đó, miễn dịch là phản ứng tự bảo vệ để phân biệt theo cách sinh lý các vật chất lạ ngoại sinh và nội sinh trong cơ thể, đồng thời đào thải và chuyển hóa chúng. Miễn dịch có thể được phân loại thành miễn dịch bẩm sinh là miễn dịch ban đầu, và miễn dịch thu được là miễn dịch thích ứng. Trong miễn dịch ban đầu, các hoạt động của đại thực bào và tế bào tiêu diệt tự nhiên (tế bào NK) bảo vệ vật chủ bằng cách ngăn chặn

các vật chất lạ (mầm bệnh), và tại đây, các đại thực bào sản xuất và giải phóng dấu hiệu hoạt động TNF- α , đồng thời nhấn chìm các vật chất lạ, và các tế bào NK sản xuất và giải phóng chất đánh dấu hoạt động, perforin để tiêu diệt các tế bào nhiễm mầm bệnh. Sau đó, các tế bào lympho T gây độc tế bào, tế bào lympho T hỗ trợ và tế bào lympho B liên quan đến khả năng miễn dịch thu được sẽ được kích hoạt để tiêu diệt các tế bào bị nhiễm bệnh hoặc tạo ra kháng thể để bảo vệ vật chủ. Tế bào lympho T gây độc tế bào, cũng giống như tế bào NK, sản xuất và giải phóng lượng lớn perforin để tiêu diệt tế bào nhiễm mầm bệnh, và tế bào lympho B sản sinh kháng thể, phụ thuộc vào hoặc độc lập với tế bào lympho T hỗ trợ, để bảo vệ vật chủ. Các xytokin gây viêm như IL-6, IL-8, và TNF- α , là những chất làm trung gian miễn dịch và được biết là có liên quan đặc biệt đến khả năng miễn dịch ban đầu. Hơn nữa, vì khả năng miễn dịch bẩm sinh đóng vai trò cực kỳ quan trọng làm cơ chế bảo vệ chống lại tế bào ung thư, các sản phẩm trị liệu tế bào sử dụng việc kích hoạt miễn dịch bẩm sinh, chẳng hạn như tế bào NK và tế bào T làm cơ chế hoạt động đã thu hút được nhiều sự chú ý hơn trong những năm gần đây.

Thông thường, trong trường hợp suy giảm miễn dịch, khả năng chống nhiễm trùng bị tổn hại và bệnh nhân bị thiếu hụt kháng thể không thể chống lại nhiễm trùng do vi khuẩn, và khả năng thực bào của bạch cầu trung tính cũng bị ảnh hưởng. Hơn nữa, trong trường hợp như vậy, sự kích hoạt của hệ thống bổ thể cũng bị tổn hại, không tạo ra các yếu tố di chuyển bạch cầu và các loại tương tự, dẫn đến làm tăng tỷ lệ viêm và gây ra virus huyết, lan đến hệ thần kinh trung ương và các vị trí khác. Hơn nữa, trong trường hợp bệnh nhân ung thư, không chỉ tế bào ung thư mà các tế bào bình thường cũng bị ảnh hưởng trong quá trình hóa trị hoặc xạ trị, do đó gây ra tác dụng phụ làm giảm mạnh khả năng miễn dịch của bệnh nhân.

Trong hoàn cảnh này, cần phải phát triển chất tăng cường miễn dịch có khả năng tăng cường miễn dịch, hoặc thực phẩm chức năng cho sức khỏe giúp tăng cường miễn dịch để phòng ngừa hoặc điều trị ung thư hoặc các bệnh truyền nhiễm.

Trong khi đó, theo số liệu thanh toán chi phí khám bệnh, chữa bệnh bảo hiểm y tế do Viện nghiên cứu chính sách bảo hiểm y tế thuộc Tổng công ty bảo hiểm y tế quốc gia khảo sát từ năm 2001 đến năm 2008, số bệnh nhân thực sự điều trị ‘rụng tóc’ năm 2001 là 103.000 người, năm 2005 là 142.000 người và năm 2008 là 165.000, tăng 60% trong 7 năm qua. Theo độ tuổi, số bệnh nhân trong độ tuổi từ 20 đến 40 tuổi là 114.000 bệnh nhân, chiếm 69,5% tổng số bệnh nhân và số bệnh nhân từ 10 tuổi trở xuống là

22.000 bệnh nhân hoặc nhiều hơn. Tính đến năm 2008, trong số những bệnh nhân được điều trị thực sự, 84.000 là nam giới và 80.000 là nữ giới, cho thấy rằng nam giới nhiều hơn một chút so với nữ giới, và tính đến năm 2008, các loại “rụng tóc” cụ thể của những bệnh nhân thực sự được điều trị theo bảo hiểm y tế tự nhiên bao gồm rụng tóc từng mảng (130.000), rụng tóc từng đám (2.000), rụng tóc nội tiết tố nam (9.000), và rụng tóc không sọc khác (8.000). Trong khi đó, theo số liệu của Diễn đàn Nghiên cứu mỹ phẩm và tóc Quốc tế vào tháng 6 năm 2003, có 250 triệu bệnh nhân rụng tóc, và tỷ lệ rụng tóc ở độ tuổi từ 24 đến 50 là 30 đến 65%. Tính đến năm 2008, có khoảng 300 triệu người bị rụng tóc ở Trung Quốc, và 30% dân số nam ở độ tuổi 30 và 50% dân số nam ở độ tuổi 50 có dấu hiệu rụng tóc, và số lượng bệnh nhân rụng tóc tăng từ 10-15% mỗi năm. Theo số liệu khảo sát của các doanh nghiệp bán tóc giả và thực hiện phẫu thuật cấy tóc năm 2007 tại Nhật Bản, tỷ lệ rụng tóc ở dân số Nhật Bản là 26,5%, và số bệnh nhân bị rụng tóc ước tính khoảng 12,93 triệu người.

Hiện nay, các chế phẩm để điều trị rụng tóc chủ yếu được phân loại thành thuốc, dược mỹ phẩm và mỹ phẩm. Các loại thuốc kê đơn chỉ có thể được mua khi có đơn của bác sĩ bao gồm ‘Propecia’ do Merck phát triển và đưa ra thị trường tại Hoa Kỳ. Finasterit là thành phần chính của Propecia đã được Cơ quan Quản lý Dược và thực phẩm Hoa Kỳ (US FDA) chấp thuận là loại thuốc điều trị rụng tóc vào tháng 12/1997. Finasterit là loại thuốc ức chế 5-alpha-reductaza, chuyển đổi testosterone thành dihydrotestosterone (DHT), và đóng vai trò trong phát triển lông tơ thành tóc dày và dài. Mặc dù hiệu quả trong việc giảm rụng tóc trong thời gian ngắn, Finasterit đi kèm với các tác dụng phụ như rối loạn cương dương, suy giảm chức năng tình dục và ngực to ở nam giới. Thuốc không kê đơn đã được công nhận về độ an toàn và hiệu quả, do đó có thể mua mà không cần đơn của bác sĩ bao gồm Minoxidil. Minoxidil đã được FDA chấp thuận vào tháng 12/1997 là loại thuốc điều trị rụng tóc tại chỗ đầu tiên. Mặc dù thuốc này có tác dụng thúc đẩy mọc tóc bằng cách cải thiện lưu thông máu và mở các kênh kali, nhưng nó có thể gây ra các phản ứng tại chỗ như ngứa và phát ban, đồng thời có thể khiến nhịp tim nhanh và các hiện tượng tương tự.

Trong số các sản phẩm đã được Cơ quan Quản lý thực phẩm và dược phẩm Hàn Quốc chấp thuận về chức năng ngăn ngừa rụng tóc và mọc tóc, các sản phẩm dược mỹ phẩm có thể được bán tại siêu thị hoặc cửa hàng tiện lợi theo thông báo công khai của Bộ trưởng Bộ Y tế và Phúc lợi bao gồm ‘Hair Power Competent’ của CJ Lion và ‘Hair

Tonic' của Moracle, "Mo & More' của LG Household & Health Care, và như mỹ phẩm, dầu gội đầu hoặc các sản phẩm được sử dụng cho da đầu hoặc tóc để duy trì hoặc tăng cường sức khỏe của da và tóc đã được bán.

Chu kỳ rụng tóc của con người phần lớn được chia thành giai đoạn phát triển (anagen), giai đoạn chuyển tiếp (catagen) và giai đoạn ngừng phát triển (telogen). Giai đoạn anagen là giai đoạn trong đó các tế bào nhú hạ bì của nang lông đang hoạt động, các tế bào đang phân chia nhanh chóng, và tóc phát triển với tốc độ nhanh. Thời gian của giai đoạn anagen, mặc dù nó khác nhau trên loại tóc, nhưng khoảng 3-6 năm đối với tóc trên đầu. Tóc anagen chiếm 80 đến 90% tổng số tóc, và những người đang bị rụng tóc có xu hướng có chu kỳ tóc với giai đoạn anagen ngắn lại và giai đoạn telogen kéo dài, làm giảm phần tóc anagen trong tổng số tóc. Giai đoạn catagen là giai đoạn trong đó giai đoạn anagen của các đầu tóc và quá trình tạo tóc dần dần chậm lại, với sự phân chia và tăng trưởng của tế bào cuối cùng kết thúc. Giai đoạn catagen kéo dài khoảng 1-1,5 tháng, và khoảng 1% tổng số tóc thuộc giai đoạn này. Giai đoạn telogen là giai đoạn cuối của quá trình phát triển, trong đó các nang lông và nhú hạ bì hoàn toàn tách rời nhau, các nang lông bị teo đi và các nang lông di chuyển lên trên làm cho tóc rụng. Giai đoạn telogen kéo dài khoảng 3-4 tháng, và 4-14% tổng số tóc thuộc giai đoạn này. Khi giai đoạn telogen kết thúc và nhú hạ bì hoạt động trở lại, nhú hạ bì của tóc mới được hình thành, và tóc trong giai đoạn telogen sẽ bị đẩy ra ngoài và ra khỏi da đầu hoàn toàn.

Vì các chất hoặc chế phẩm trị rụng tóc thông thường cho mọc tóc chưa được kiểm chứng đầy đủ về hiệu quả của chúng, hoặc đi kèm với các tác dụng phụ khác nhau, nên cần phải phát triển chất trị rụng tóc hoặc chất mọc tóc an toàn và hiệu quả hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất giải pháp để giải quyết các vấn đề đã đề cập ở trên, và mục đích của sáng chế là đề xuất cách sử dụng mới các exosome có nguồn gốc từ sữa hiệu quả hơn và rẻ tiền hơn trong các loại mỹ phẩm khác nhau, chẳng hạn như chế phẩm mỹ phẩm chức năng tái tạo da, thực phẩm và thuốc. Tuy nhiên, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn ở mục đích nêu trên.

Theo khía cạnh của sáng chế đề xuất chế phẩm mỹ phẩm tái tạo da bao gồm các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê làm thành phần hoạt tính.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chế phẩm mỹ phẩm giảm nếp nhăn bao

gồm các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê làm thành phần hoạt tính.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chế phẩm mỹ phẩm làm trắng da bao gồm các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê làm thành phần hoạt tính.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất sản phẩm mỹ phẩm chức năng dành cho tóc để làm giảm và ngăn ngừa rụng tóc bao gồm các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê làm thành phần hoạt tính.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất thực phẩm chức năng cho sức khỏe bao gồm các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê làm thành phần hoạt tính.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất dược phẩm điều trị vết thương bao gồm các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê làm thành phần hoạt tính.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất dược phẩm điều trị rụng tóc hoặc mọc tóc hoặc thúc đẩy sự phát triển của tóc bao gồm các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê làm thành phần hoạt tính.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp đẩy nhanh tái tạo vùng da bị tổn thương của đối tượng, phương pháp này bao gồm sử dụng lượng hiệu quả điều trị của exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê lên vùng da bị tổn thương của đối tượng.

Theo khía cạnh của sáng chế đề xuất phương pháp tăng cường khả năng miễn dịch của đối tượng, phương pháp bao gồm việc sử dụng lượng hiệu quả điều trị của exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê cho đối tượng.

Theo khía cạnh của sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị rụng tóc của đối tượng, phương pháp này bao gồm sử dụng lượng hiệu quả điều trị của exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê cho đối tượng.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm nếp nhăn trên da của đối tượng, phương pháp này bao gồm sử dụng lượng hiệu quả điều trị của exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê cho đối tượng.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp làm trắng da của đối tượng, phương pháp này bao gồm việc sử dụng lượng hiệu quả điều trị của exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê cho đối tượng.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng các exosome được tách ra

từ sữa hoặc sữa dê để điều chế chất làm lành vết thương.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê trong việc điều chế sản phẩm mỹ phẩm làm giảm nếp nhăn trên da.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê trong việc điều chế mỹ phẩm làm trắng da.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê để điều chế chất ngăn ngừa và điều trị rụng tóc.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê để điều chế chất mọc tóc.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê cho chế phẩm để tăng cường khả năng miễn dịch.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp tách các exosome từ sữa hoặc sữa dê, phương pháp bao gồm: bước ly tâm thứ nhất để loại bỏ chất béo và tế bào khỏi sữa hoặc sữa dê bằng cách ly tâm; bước lọc dùng bộ lọc để lọc sữa hoặc sữa dê đã ly tâm với màng lọc có kích thước mắt lưới từ 20 đến 60 μm , để loại bỏ thêm chất béo và tế bào khỏi sữa; bước pha loãng để pha loãng sữa hoặc sữa dê đã lọc bằng cách thêm vào đó lượng nước cất tương đương; bước kết tủa đẳng điện bằng cách thêm axit vào sữa hoặc sữa dê đã pha loãng để điều chỉnh độ pH từ 4 đến 5, nhờ đó kết tủa casein trong sữa hoặc sữa dê; bước ly tâm thứ hai để ly tâm bỏ sung sữa hoặc sữa dê, trong đó casein đã được kết tủa, và thu lấy phần nổi phía trên của chúng; và bước lọc để lọc phần nổi phía trên thu được bằng màng lọc 0,2 μm .

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chế phẩm mỹ phẩm tái tạo da theo ví dụ của sáng chế không chỉ có hiệu quả tái tạo da cao hơn đáng kể so với các exosome thông thường được phân lập từ môi trường nuôi cấy tế bào, mà còn có chi phí sản xuất thấp, năng suất cao đáng kể, và độ ổn định nguyên liệu cao, do đó, có thể được sản xuất cực kỳ kinh tế. Tuy nhiên, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn bởi các hiệu quả nêu trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là lưu đồ thể hiện quy trình tách các exosome từ sữa hoặc sữa non theo ví dụ của sáng chế;

Fig.2 là biểu đồ thể hiện sản lượng của các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm và sữa non được tách ra theo ví dụ của sáng chế, và các exosome được phân lập từ các tế bào HEK293 làm nhóm đối chứng;

Fig.3 là các hình ảnh thể hiện kết quả phân tích Westen blot đối với các dấu hiệu bề mặt exosome của các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm và sữa non được tách ra theo ví dụ của sáng chế, và các exosome được phân lập từ các tế bào HEK293 làm nhóm đối chứng;

Fig.4 là các biểu đồ (A và C) thể hiện kết quả phân tích tán xạ ánh sáng động về các kích thước hạt của các exosome (A và B) có nguồn gốc từ sữa được tách ra theo ví dụ của sáng chế, các exosome (C và D) được phân lập từ các tế bào HEK293 làm nhóm đối chứng, và các hình ảnh (B và D) của các exosome được chụp bằng kính hiển vi điện tử truyền qua;

Fig.5 là các hình ảnh được chụp bởi kính hiển vi điện tử truyền qua về hình dạng của các exosome có nguồn gốc từ sữa được tách ra theo ví dụ của sáng chế (trên cùng) và các exosome có nguồn gốc từ các tế bào HEK293 làm nhóm đối chứng (dưới cùng) trước và sau hai chu kỳ đông lạnh/rã đông, các ô vuông màu đỏ trong các hình ảnh đại diện cho các vùng được mở rộng ở bên phải;

Fig.6 là các đồ thị thể hiện kết quả phân tích tán xạ ánh sáng động về sự phân bố kích thước hạt của các exosome có nguồn gốc từ sữa được tách ra theo ví dụ của sáng chế (A) và các exosome có nguồn gốc từ HEK293 làm nhóm đối chứng (B) trước và sau hai chu kỳ đông lạnh/rã đông;

Fig.7a là các đồ thị thể hiện kết quả phân tích tán xạ ánh sáng động về sự phân bố kích thước hạt của các exosome được phân lập các tế bào HEK293, là nhóm đối chứng (trên cùng), và các exosome có nguồn gốc từ sữa được tách theo ví dụ của sáng chế trước khi bảo quản lạnh và sau khi rã đông, Fig.7b là các hình ảnh của các exosome trước khi bảo quản lạnh (trên cùng) và sau khi rã đông, được chụp bằng kính hiển vi điện tử truyền qua, và Fig.7c là các hình ảnh thể hiện kết quả của phương pháp nhuộm màu miễn dịch thể hiện mức độ biểu hiện của collagen loại I trong nguyên bào sợi da người được xử lý bằng các exosome sữa non theo ví dụ của sáng chế trước khi bảo quản lạnh (giữa) và sau khi rã đông (bên phải), hình bên trái (nước muối) thể hiện cho nhóm đối chứng chỉ được xử lý bằng nước muối mà không xử lý bằng exosome;

Fig.8 là đồ thị thể hiện kết quả xác định kích thước trung bình của các hạt của exosome sữa non (Col M-exo) theo phương án của sáng chế và các exosome đối chứng khác nhau (HaCat Exo, B16 Exo và HDF Exo) sau khi lặp lại quá trình đông lạnh/rã đông 5 lần liên tiếp;

Fig.9 là hình ảnh hiển vi huỳnh quang (bên phải) thể hiện các exosome có nguồn gốc từ sữa được tách ra theo ví dụ của sáng chế, khi được sử dụng, được hấp thụ vào các nguyên bào sợi da người, hình ảnh bên trái là của nhóm được điều trị bằng PBS, làm nhóm đối chứng, màu xanh thể hiện tín hiệu huỳnh quang của DAPI đối với phản thuốc nhuộm màu hạt nhân;

Fig.10 là các biểu đồ thể hiện kết quả phân tích mức độ chết của nguyên bào sợi da người được xử lý bằng các exosome sữa non theo phương án của sáng chế lần lượt ở nồng độ là 0,1 mg/ml và 0,3 mg/ml;

Fig.11a thể hiện loạt các hình ảnh hiển vi huỳnh quang cho thấy kết quả phân tích, được thực hiện bằng cách chụp ảnh cường độ huỳnh quang bằng DCF-DA, biểu hiện huỳnh quang bằng cách phản ứng với các loại oxy phản ứng, về mức độ hình thành các loại oxy phản ứng trong nguyên bào sợi da người bị tổn thương bởi bức xạ cực tím, sau khi điều trị bằng các exosome chiết xuất từ sữa thương phẩm (Comm M-exo) và exosome sữa non (Col M-exo) theo ví dụ của sáng chế; Fig.11b là biểu đồ thể hiện cường độ huỳnh quang tương đối đã định lượng được xác định trên Fig.11a;

Fig.12a là biểu đồ về tỷ lệ tăng sinh tế bào trong tế bào sừng của người (HaCaT), được đo sau khi được điều trị lần lượt bằng các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm và sữa non được tách ra theo ví dụ của sáng chế; Fig.12b là các biểu đồ thể hiện tốc độ tăng sinh tế bào trong nguyên bào sợi da người (HDF), được đo sau khi được điều trị lần lượt bằng các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm và sữa non được tách ra theo ví dụ của sáng chế; nhóm đối chứng thể hiện mức độ tăng sinh của các tế bào chỉ được điều trị bằng dung dịch đệm PBS, và tỷ lệ tăng sinh thể hiện tỷ lệ phần trăm tương đối khi tốc độ tăng trưởng của nhóm đối chứng được đặt thành 100%;

Fig.13 là các hình ảnh (A và C) thể hiện mức độ di chuyển của tế bào được quan sát sau khi sử dụng các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm và sữa non được tách ra theo ví dụ của sáng chế đối với các tế bào sừng gây ra trầy xước ở người (HaCaT, A) và các nguyên bào sợi da người (HDF, B), và các đồ thị (B và D) thể hiện mức độ di

chuyển của tế bào được định lượng từ kết quả của A và C;

Fig.14 là (a) các hình ảnh được chụp bởi kính hiển vi, cho thấy mức độ hình thành ống trong tế bào nội mô của chuột (SVEC4-10) trong nuôi cấy ba chiều trong Matrigel, sau khi được điều trị bằng các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm (Comm M-exo) và các exosome sữa non (Col M-exo) theo ví dụ của sáng chế, và các biểu đồ thể hiện (b) số lượng các điểm nhánh quan sát được trong (a), và (c) chiều dài của các ống được hình thành;

Fig.15a là các hình ảnh được chụp bằng hình ảnh huỳnh quang *in vivo* toàn cơ thể, cho thấy sự phân bố *in vivo* của các exosome sữa non theo ví dụ của sáng chế, được dán nhãn bằng vật liệu huỳnh quang (Flamma 675) và được tiêm dưới da; Fig.15b là hình ảnh được chụp bởi hệ thống hình ảnh *in vivo*, thể hiện sự phân bố huỳnh quang trong các cơ quan sau khi giết chết động vật thí nghiệm vào ngày thứ hai của quá trình tiêm exosome và lấy các cơ quan chính; và Fig.15c là đồ thị của kết quả định lượng của Fig.15b;

Fig.16 là biểu đồ (trên cùng) thể hiện mức độ lành vết thương được ghi lại theo thời gian sau khi sử dụng các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm (Comm M-exo) và exosome sữa non (Col M-exo) theo ví dụ của sáng chế vào vị trí vết thương của con chuột mô hình vết thương và các hình ảnh được chụp trực tiếp vị trí vết thương; đối với nhóm đối chứng, nhóm chỉ sử dụng nước muối sinh lý (Saline) và các exosome thu được từ huyết thanh (Serum Exo) được sử dụng, và nhóm các exosome sữa non được chia thành nhóm sử dụng vào các ngày 1, 4 và 7 (Col M-exo) và nhóm sử dụng vào các ngày 4, 7 và 10 (Col M-exo-D4);

Fig.17 là các hình ảnh thể hiện kết quả của xét nghiệm hóa mô miễn dịch sử dụng kháng thể kháng elastin được thực hiện trên phần mô được cắt ra từ vị trí vết thương sau khi giết chết động vật thí nghiệm trên Fig.16;

Fig.18a là các hình ảnh hiển vi huỳnh quang thể hiện mức độ biểu hiện của protein collagen loại 1 được phân tích bằng xét nghiệm huỳnh quang miễn dịch, trong nguyên bào sợi da người (HDF) sau khi điều trị bằng các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm (Com M-exo) và các exosome sữa non (Col M-exo) theo ví dụ của sáng chế. Fig.18b là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện của metalloproteinaza-2 nền (MMP-2) được phân tích bằng Westen blot, trong nguyên bào sợi da người (HDF) sau khi điều trị

bằng các exosomes chiết xuất từ sữa thương mại (Com M-exo) và các exosome sữa non (Col M-exo) theo ví dụ của sáng chế; các nhóm đối chứng là nhóm được điều trị bằng nước muối (Saline) và nhóm được điều trị bằng exosome có nguồn gốc HDF;

Fig.19 là (a) các hình ảnh về sắc tố melanin được chiết xuất 24 giờ sau khi điều trị, từ các tế bào u ác tính được điều trị hoặc không được điều trị bằng bức xạ cực tím, được điều trị với các nồng độ khác nhau của các exosome sữa non (Col M-exo) theo ví dụ của sáng chế, (b) biểu đồ thể hiện kết quả đo lượng sắc tố melanin trên mỗi 10^6 tế bào, và (c) biểu đồ thể hiện kết quả so sánh hàm lượng melanin giữa các nhóm được điều trị bằng các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm (Comm M-exo) và các exosome sữa non (Col M-exo) theo ví dụ của sáng chế, và các nhóm đối chứng (Saline, điều trị bằng exosome có nguồn gốc từ B16 (B16 Exo));

Fig.20 là (a) hình ảnh thể hiện mức độ biểu hiện của các cytokin khác nhau, được phân tích bằng xét nghiệm lai phân tử (dot blot) 24 giờ sau khi điều trị, trong các đại thực bào có nguồn gốc từ tủy xương (bone marrow-derived macrophage: BMDM) được điều trị bằng các exosome có nguồn gốc từ sữa thương mại (Comm M-exo) và các exosome sữa non (Col M-exo) theo ví dụ của sáng chế, và (b) biểu đồ thể hiện kết quả định lượng của nó;

Fig.21 thể hiện (a) kết quả của xét nghiệm lai phân tử so sánh mức độ biểu hiện của các yếu tố tăng trưởng khác nhau liên quan đến quá trình tái tạo mô và hình thành mạch trong nguyên bào sợi NIH-3T3 được điều trị bằng các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm (Comm M-exo) và các exosome sữa non (Col M-exo), và (b) biểu đồ thể hiện kết quả được định lượng của xét nghiệm lai phân tử; và

Fig.22A là các hình ảnh hiển vi huỳnh quang thể hiện kết quả của việc quan sát mô hình hấp thụ ngoại bào của các exosome ở các thời gian điều trị khác nhau trong các tế bào nhú hạ bì của người được điều trị bằng các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm (Comm M-exo) theo ví dụ của sáng chế; Fig.22B là biểu đồ (bên trái) thể hiện kết quả phân tích ảnh hưởng của các exosome sữa non đến sự gia tăng của các tế bào nhú hạ bì ở các nồng độ xử lý exosome từ sữa non khác nhau ở các tế bào nhú hạ bì của người được xử lý bằng exosome sữa non theo ví dụ của sáng chế, và biểu đồ (bên phải) thể hiện kết quả phân tích sự khác biệt về mức độ tăng sinh của tế bào nhú hạ bì ở người có và không điều trị bằng chất gây rụng tóc; và Fig.22C là các hình ảnh thể hiện kết quả

của việc quan sát mức độ phát triển của tóc theo thời gian sau khi sử dụng thông qua con đường thẩm thấu qua da đối với động vật thử nghiệm được cạo lông, các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm (Comm M-exo) theo ví dụ của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các thuật ngữ được sử dụng trong đây được định nghĩa như sau.

Thuật ngữ “exosome” được sử dụng trong đây đề cập đến túi kích cỡ nanomet (nm) có nguồn gốc từ tế bào có thể có trong tất cả các loại chất lỏng sinh học bao gồm máu, nước tiểu, và môi trường nuôi cấy tế bào. Kích thước của các exosome được biết là từ 30 nm đến 100 nm và được tiết ra từ tế bào từ sự hợp nhất của các thể đa túi (multivesicular body) với màng sinh chất, hoặc tiết trực tiếp qua màng sinh chất. Các exosome được biết là đóng vai trò quan trọng trong các quá trình khác nhau như đông máu, truyền tín hiệu gian bào và điều chỉnh các chất chuyển hóa. Trong ngữ cảnh này, thuật ngữ “các exosome sữa” được sử dụng trong đây đề cập đến các exosome có nguồn gốc từ sữa của động vật có vú, chẳng hạn như sữa thương phẩm và sữa non. Tương tự, thuật ngữ “các exosome sữa non” đề cập đến các exosome sữa có nguồn gốc từ sữa được sản sinh bởi người mẹ ngay sau khi sinh con.

Thuật ngữ “sữa” như được sử dụng trong đây chủ yếu đề cập đến sữa bò, nhưng còn bao gồm sữa từ các động vật có vú khác, chẳng hạn như ngựa, cừu, dê sữa (dê), và lạc đà, vì tương đương về chức năng. Xem xét khả năng thu mua, chi phí và những yếu tố tương tự, sữa bò thương phẩm được ưu tiên nhất, và “sữa dê” thương phẩm được sản sinh từ dê sữa (dê) có thể là thay thế tuyệt vời. Cụ thể, sữa dê có thành phần gần giống sữa mẹ nên dễ tiêu hóa, có giá trị dinh dưỡng cao nên được công nhận là sữa cao cấp. Sữa ngựa (sữa ngựa), mặc dù không phổ biến, được sử dụng như loại sữa thay thế bởi các bộ lạc du mục ở Trung Á. Trong khi đó, “sữa non” là dạng sữa được sản xuất trong giai đoạn cuối của thai kỳ và vài ngày sau khi sinh. Không giống sữa thông thường, sữa non chứa nhiều chất dinh dưỡng và kháng thể cần thiết cho sự tồn tại và phát triển, và so với sữa thông thường, có chứa nhiều hơn các chất chống oxy hóa như lactoferin và hemopexin, và do đó, đôi khi được ưu tiên hơn trong việc cải thiện sức khỏe và các khía cạnh dinh dưỡng.

Thuật ngữ “sữa thô” được sử dụng trong đây đề cập đến sữa được lấy từ trang trại mà chưa trải qua bất kỳ quá trình chế biến cụ thể nào như tiệt trùng, và thuật ngữ “sữa

thương phẩm” được sử dụng trong đây đề cập đến sữa được đóng gói dưới dạng bán sẵn trên thị trường thông qua quá trình khử trùng và quá trình đồng hóa.

Thuật ngữ “tái tạo da” được sử dụng trong đây đề cập đến quá trình của chu kỳ tái tạo da, hoặc quá trình trong trường hợp vết thương, các tế bào được hình thành ở lớp nền, nhờ đó phục hồi da. Các tế bào biểu bì hình thành ở lớp nền dần dần được đẩy lên các lớp trên và đến lớp sừng. Quá trình này được gọi là chu kỳ tái tạo da hay còn gọi là quá trình sừng hóa da. Thông thường, quá trình sừng hóa da được cho là mất trung bình 28 ngày, bao gồm khoảng thời gian 14 ngày trong đó các tế bào được hình thành ở lớp nền và di chuyển lên trên, và khoảng thời gian 14 ngày nữa trong đó các tế bào còn lại trên lớp sừng chết và rụng đi. Vì quá trình tái tạo và bong tróc diễn ra lâu hơn theo tuổi tác, chu kỳ sừng hóa da có thể mất đến 42 ngày, và biết rằng chu kỳ sừng hóa da thường kéo dài hơn sau tuổi 30. Vì lý do này, da trở nên xỉn màu và sần sùi theo tuổi tác, nghĩa là da bắt đầu lão hóa.

Theo khía cạnh của sáng chế đề xuất chế phẩm mỹ phẩm tái tạo da bao gồm các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê làm thành phần hoạt tính.

Trong thành phần mỹ phẩm tái tạo da, sữa hoặc sữa dê có thể là sữa thô, sữa thương phẩm hoặc sữa dê, hoặc sữa non.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chế phẩm mỹ phẩm giảm nếp nhăn bao gồm các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê làm thành phần hoạt tính.

Trong thành phần mỹ phẩm giảm nếp nhăn, sữa hoặc sữa dê có thể là sữa thô, sữa thương phẩm hoặc sữa dê, hoặc sữa non.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chế phẩm mỹ phẩm làm trắng da bao gồm các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê làm thành phần hoạt tính.

Trong thành phần mỹ phẩm làm trắng da, sữa hoặc sữa dê có thể là sữa thô, sữa thương phẩm hoặc sữa dê, hoặc sữa non.

Chế phẩm mỹ phẩm theo một khía cạnh của sáng chế có thể được sử dụng trong các sản phẩm khác nhau, chẳng hạn như sản phẩm mỹ phẩm chức năng, chế phẩm làm sạch, dầu gội đầu, và các loại tương tự. Ví dụ về các sản phẩm mà chế phẩm theo sáng chế có thể được bổ sung vào bao gồm nhiều loại sản phẩm mỹ phẩm khác nhau như nước cân bằng, nước dưỡng ẩm, kem dưỡng, tinh chất, dung dịch dinh dưỡng, dung dịch

mỹ phẩm, và mặt nạ dưỡng da, và còn bao gồm xà phòng, dầu gội, sản phẩm xả tóc, chế phẩm làm sạch, sữa tắm toàn thân, sữa rửa mặt, sản phẩm điều trị tóc và dung dịch làm đẹp.

Chế phẩm mỹ phẩm theo sáng chế có thể còn bao gồm thành phần chức năng bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm vitamin tan trong nước, vitamin tan trong chất béo, peptit polyme, polysacarit, sphingolipit và chiết xuất tảo.

Vitamin tan trong nước có thể là bất kỳ loại vitamin nào có thể được pha trộn trong mỹ phẩm, nhưng tốt nhất có thể là vitamin B1, vitamin B2, vitamin B6, pyridoxin, pyridoxin hydrochlorua, vitamin B12, axit pantothenic, axit nicotinic, nicotinamit, axit folic, vitamin C, vitamin H, và các loại tương tự, và muối của các thành phần nêu trên (thiamin hydrochlorua, natri ascorbat, v.v.) hoặc các dẫn xuất của chúng (natri ascorbic axit-2-phosphat, magie ascorbic axit-2-phosphat, v.v.) còn bao gồm trong vitamin tan trong nước có thể sử dụng được trong sáng chế. Vitamin tan trong nước có thể được thu được bằng các phương pháp đã biết như phương pháp biến nạp vi sinh vật, phương pháp tổng hợp hóa học, phương pháp enzym hoặc phương pháp tinh chế từ nuôi cấy vi sinh vật, v.v..

Vitamin tan trong chất béo có thể là bất kỳ loại vitamin nào có thể được pha trộn trong mỹ phẩm, nhưng có thể tốt hơn là vitamin A, caroten, vitamin D2, vitamin D3, vitamin E (dl- α -tocopherol, d- α -tocopherol, d - α -tocopherol), v.v. và các dẫn xuất của các thành phần nêu trên (ascorbin palmitat, ascorbin stearat, ascorbin dipalmitat, axetat dl- α -tocopherol, axit nicotinic dl- α -tocopherol, vitamin E, rượu DL-pantothenyl, rượu D-pantothenyl, ete etyl pantothenyl, v.v.) còn bao gồm trong vitamin tan trong dầu có thể sử dụng được trong sáng chế.

Vitamin tan trong chất béo có thể thu được từ việc nuôi cấy vi sinh vật bằng các phương pháp đã biết như phương pháp biến nạp vi sinh vật, phương pháp tổng hợp hóa học, phương pháp enzym hoặc phương pháp tinh chế.

Peptit polyme có thể là bất kỳ peptit polyme nào có thể được pha trộn trong mỹ phẩm, nhưng có thể tốt hơn là collagen, collagen thủy phân, gelatin, elastin, elastin thủy phân, keratin, và các loại tương tự. Peptit polyme có thể thu được từ môi trường nuôi cấy vi sinh vật bằng các phương pháp đã biết như phương pháp tổng hợp hóa học, phương pháp enzym, hoặc phương pháp tinh chế, hoặc cách khác, có thể được tinh chế

từ các sản phẩm tự nhiên như da lợn, da gia súc, v.v. và fibroin của tơ tằm, và được sử dụng.

Polysacarit có thể là bất kỳ polysacarit nào có thể được pha trộn trong mỹ phẩm, nhưng có thể tốt hơn là hydroxyetyl xenluloza, gồm xanthan, natri hyaluronat, chondroitin sulfat, hoặc muối của chúng (muối natri, v.v.). Ví dụ, chondroitin sulfat hoặc muối của chúng, v.v. có thể được tinh chế từ động vật có vú hoặc cá đã biết và được sử dụng.

Sphingolipit có thể là bất kỳ sphingolipit nào có thể được pha trộn trong mỹ phẩm, nhưng tốt hơn có thể là ceramit, phytosphingosin, glycosphingolipit, và các loại tương tự. Sphingolipit có thể được tinh chế bằng phương pháp đã biết từ động vật có vú, cá, động vật có vỏ, nấm men hoặc thực vật, v.v. hoặc có thể thu được bằng phương pháp tổng hợp hóa học.

Chiết xuất tảo có thể là bất kỳ chiết xuất tảo nào có thể được pha trộn trong mỹ phẩm, nhưng có thể tốt hơn là chiết xuất tảo nâu, chiết xuất tảo đỏ, chiết xuất tảo lục, và các loại tương tự, và carrageenan, axit alginic, natri alginat, kali alginat, v.v. được tinh chế từ các chất chiết xuất tảo nêu trên còn bao gồm trong chiết xuất tảo được sử dụng trong sáng chế. Chiết xuất tảo có thể thu được từ tảo thông qua quá trình tinh chế bằng phương pháp đã biết.

Trong nguyên liệu mỹ phẩm theo sáng chế, các thành phần khác thường được pha trộn trong nguyên liệu mỹ phẩm có thể được trộn cùng với các thành phần thiết yếu nêu trên.

Các thành phần khác có thể được thêm vào bao gồm thành phần dầu và chất béo, chất giữ ẩm, chất làm mềm, chất hoạt động bề mặt, chất màu hữu cơ và vô cơ, các hạt hữu cơ, chất hấp thụ tia cực tím, chất bảo quản, chất khử trùng, chất chống oxy hóa, chiết xuất thực vật, chất điều chỉnh độ pH, cồn, chất màu, hương thơm, chất thúc đẩy tuần hoàn máu, chất làm lạnh, chất giảm tiết mồ hôi, nước tinh khiết, và các chất tương tự.

Thành phần dầu và chất béo có thể bao gồm dầu và chất béo gốc este, dầu và chất béo gốc hydrocacbon, dầu và chất béo gốc silicon, dầu và chất béo gốc flo, dầu và mỡ động vật, dầu và chất béo thực vật, và các chất tương tự. Dầu và chất béo gốc este có thể bao gồm các este như glyxeryl tri2-etylhexanoat, xetyl 2-etylhexanoat, isopropyl

myristat, butyl myristat, isopropyl palmitat, etyl stearat, octyl palmitat, isoxetyl isostearat, butyl stearat, etyl linoleat, isopropyl linoleat, etyl oleat, isoxetyl myristat, isostearyl myristat, isostearyl palmitat, octyldodecyl myristat, isoxetyl isostearat, dietyl sebacat, diisopropyl adipat, isoalkyl neopentanoat, tri(capryl, capric axit) glyxeryl, tri 2-ethylhexanoat trimetylolpropan, trimetylolpropan triisostearat, tetra 2-ethylhexanoat pentaerythritol, xetyl caprylate, decyl laurat, hexyl laurat, decyl myristat, myristyl myristat, xetyl myristat, stearyl stearat, decyl oleat, xetyl ricinoleat, isostearyl laurat, isotridecyl myristat, isoxetyl palmitat, octyl stearat, isoxetyl stearat, isodecyl oleat, octyldodecyl oleat, octyldodecyl linoleat, isopropyl isostearat, cetostearyl 2-ethylhexanoat, stearyl 2-ethylhexanoat, hexyl isostearat, etylen glycol dioctanoat, etylen glycol dioleat, propylen glycol dicapric axit, di(capryl capric axit) propylen glycol, propylene glycol dicaprylat, neopentyl glycol dicaprylat, neopentyl glycol dioctanoat, glyxeryl tricaprylat, glyxeryl triundecanoat, glyxeryl triisopalmitat, glyxeryl triisostearat, octyldodecyl neopentanoat, isostearyl octanoat, octyl isononanoat, hexyldecyl neodecanoat, octyldodecyl neodecanoat, isoxetyl isostearat, isostearyl isostearat, octyldecyl isostearat, polyglycerol oleic axit este, polyglycerol isostearic axit este, triisoxetyl xitrat, triisoalkyl xitrat, triisooctyl xitrat, lauryl lactat, myristyl lactat, xetyl lactat, octyldecyl lactat, trietyl xitrat, axetyl trietyl xitrat, axetyl tributyl xitrat, trioctyl xitrat, diisostearyl malat, 2-ethylhexyl hydroxystearat, di2-ethylhexyl suxinat, diisobutyl adipat, diisopropyl sebacat, dioctyl sebacat, cholesteryl stearat, cholesteryl isostearat, cholesteryl hydroxystearat, cholesteryl oleat, dihydrocholesteryl oleat, phytosteryl isostearat, phytosteryl oleat, isoxetyl 12-stealoyl hydroxystearat, stearyl 12-stearoyl hydroxystearat, isostearyl 12-stearoylhydroxystearat, và các chất tương tự.

Dầu và chất béo gốc hydrocacbon có thể bao gồm dầu và chất béo gốc hydrocacbon, chẳng hạn như squalen, parafin lỏng, oligome á-olefin, isoparafin, xeresin, parafin, isoparafin lỏng, polybuten, sáp vi tinh thể, petrolatum, và các chất tương tự.

Dầu và chất béo gốc silicon có thể bao gồm polymethylsilicon, methylphenylsilicon, methylxyclopolysiloxan, octamethylpolysiloxan, decamethylpolysiloxan, dodecamethylxyclosiloxan, dimethylsiloxan/methylxetyloxysiloxan copolyme, dầu silicon alkyl hóa, dầu amino silicon biến tính và các chất tương tự.

Dầu và chất béo gốc flo có thể bao gồm perflopolyete và các chất tương tự.

Dầu và mỡ động vật hoặc thực vật có thể bao gồm dầu và mỡ động thực vật như dầu bơ, dầu hạnh nhân, dầu ô liu, dầu hạt mè, dầu cám gạo, dầu nghệ tây, dầu đậu nành, dầu ngô, dầu hạt cải, dầu hạt mơ, dầu hạt cọ, dầu cọ, dầu thầu dầu, dầu hướng dương, dầu hạt nho, dầu hạt bông, dầu hạt kukui, dầu mầm lúa mạch, dầu mầm gạo, bơ hạt mỡ, dầu hoa anh thảo, dầu hạt macca, dầu hạt meadowfoam, dầu lòng đỏ trứng, mỡ động vật, dầu ngựa, dầu chồn, dầu cá tráp cam, dầu jojoba, sáp nền, sáp carnauba, lanolin lỏng và dầu thầu dầu hydro hóa.

Chất giữ ẩm có thể bao gồm chất giữ ẩm trọng lượng phân tử thấp hòa tan trong nước, chất giữ ẩm phân tử hòa tan trong chất béo, polyme hòa tan trong nước, polyme hòa tan trong chất béo, và các chất tương tự.

Chất giữ ẩm trọng lượng phân tử thấp hòa tan trong nước có thể bao gồm serin, glutamin, sorbitol, manitol, natri pyrrolidon carboxyl hóa, glyxerin, propylen glycol, 1,3-butylen glycol, etylen glycol, polyetylen glycol (mức độ trùng hợp $n=2$ trở lên), polypropylen glycol (mức độ trùng hợp $n=2$ trở lên), polyglyxerin (mức độ trùng hợp $n=2$ trở lên), axit lactic, lactat, và các chất tương tự.

Chất giữ ẩm trọng lượng phân tử thấp hòa tan trong chất béo có thể bao gồm cholesterol, cholesterol este và các chất tương tự.

Polyme hòa tan trong nước có thể bao gồm polyme cacboxyvinyl, polyaspartat, tragacan, gồm xanthan, metylxenluloza, hydroxymetylxenluloza, hydroxyetylxenluloza, hydroxypropylxenluloza, carboxymetylxenluloza, chitin hòa tan trong nước, chitosan, dextrin, và các chất tương tự. Polyme hòa tan trong chất béo có thể bao gồm chất đồng trùng hợp polyvinylpyrrolidon/eicosen, chất đồng trùng hợp polyvinylpyrrolidon/hexadexen, nitroxenluloza, este axit béo dextrin, silicon trọng lượng phân tử cao, và các chất tương tự.

Chất làm mềm có thể bao gồm este cholesteryl axit axyl glutamic chuỗi dài, cholesteryl hydroxystearat, axit 12-hydroxystearic, axit stearic, axit nhựa thông, este cholesteryl của axit béo lanolin, và các chất tương tự.

Chất hoạt động bề mặt có thể bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion, chất hoạt động bề mặt anion, chất hoạt động bề mặt cation, chất hoạt động bề mặt lưỡng tính và các chất tương tự.

Chất hoạt động bề mặt không ion có thể bao gồm monostearat glyxerin tự nhũ hóa, este axit béo propylen glycol, este axit béo glyxerin, este axit béo polyglyxerin, este axit béo sorbitan, este axit béo sorbitan POE (polyoxyetylen), este axit béo sorbit POE, este axit béo glyxerin POE, ete alkyl POE, este axit béo POE, dầu thầu dầu đã hydro hóa POE, dầu thầu dầu POE, đồng trùng hợp POE/POP (polyoxyetylen/polyoxypropylen), ete alkyl POE/POP, silicon được biến tính bằng polyete, alkanolamit axit lauric, oxit alkyl amin, phospholipit đậu nành hydro hóa, và các chất tương tự.

Chất hoạt động bề mặt anion có thể bao gồm xà phòng axit béo, á-axyl sulfonat, alkyl sulfonat, alkyl allyl sulfonat, alkyl naphtalen sulfonat, alkyl sulfat, POE alkyl ete sulfat, alkyl amit sulfat, alkyl phosphat, POE alkyl phosphat, alkyl amit phosphat, muối alkyloyl alkyl taurin, muối axit amin N-axyl, muối POE alkyl ete carboxylat, muối axit alkyl sulfosuxinic, natri alkyl sulfoaxetat, muối peptit collagen thủy phân axyl hóa, este perfloroalkyl phosphat, và các chất tương tự.

Chất hoạt động bề mặt cation có thể bao gồm alkyl trimetyl amoni clorua, stearyl trimetyl amoni clorua, stearyl trimetyl amoni bromua, cetostearyl trimetyl amoni clorua, distearyl đimetyl amoni clorua, stearyl đimetyl benzyl amoni clorua, behenyl trimetyl amoni bromua, benzalkoni chlorua, dietyl amino etyl amit stearat, đimetyl amino propyl amit stearat, dẫn xuất lanolin, muối amoni bậc bốn, và các chất tương tự.

Chất hoạt động bề mặt lưỡng tính có thể bao gồm loại carboxybetain, loại amitbetain, loại sulfobetain, loại hydroxysulfobetain, loại amidesulfobetain, loại phosphobetain, loại aminocarboxylat, loại dẫn xuất imidazolin, loại amidamin, và các chất tương tự.

Các chất màu hữu cơ và vô cơ có thể bao gồm các chất màu vô cơ như axit silixic, anhydrit silixic, magie silicat, đá tan, serixit, mica, cao lanh, Bengala, đất sét, bentonit, mica trắng titan, bismut oxyclorua, zirconium oxit, magie oxit, kẽm oxit, titan oxit, nhôm oxit, canxi sulfat, bari sulfat, magie sulfat, canxi cacbonat, magie cacbonat, sắt oxit, xanh ultramarin, crom oxit, crom hydroxit, calamin, cacbon đen và phức hợp của chúng; và các chất màu hữu cơ như polyamit, polyeste, polypropylen, polystyren, polyuretan, nhựa vinyl, nhựa ure, nhựa phenol, nhựa huỳnh quang, nhựa silicon, nhựa acrylic, nhựa melamin, nhựa epoxy, nhựa polycarbonat, chất đồng trùng hợp divinylbenzen-styren, bột tơ tằm, xenluloza, chất màu vàng CI, chất màu cam CI, và các

chất tương tự; và chất màu tổng hợp của chất màu vô cơ và chất màu hữu cơ, và các chất tương tự.

Các hạt hữu cơ có thể bao gồm xà phòng kim loại như canxi stearat; muối kim loại alkyl phosphat như natri xetylat, kẽm laurylat, và canxi laurylat; muối kim loại đa hóa trị axit amin axyl như N-lauroyl- α -alanin canxi, N-lauroyl- α -alanin kẽm, và N-lauroylglycine canxi; muối kim loại đa hóa trị axit amidesulfonic như L-lauroyl-aurin canxi và N-palmitoyl-aurin canxi; các axit amin gốc N-axyl như N-lauroyl-L-lysin, N-lauroyl-L-lysin, N-lauroyl-L-arginin, và axit béo thịt bò N-lauroyl-L-arginin; N-axyl polypeptit như N-lauroylglycylglyxin; axit béo α -amino như axit α -aminocaprylic và axit α -aminolauric; và polyetylen, polypropylen, nylon, polymetyl metacrylat, polystyren, đồng trùng hợp divinylbenzen-styren, etylen tetraflorit, và các chất tương tự.

Chất hấp thụ tia cực tím có thể bao gồm axit para-aminobenzoic, etyl para-aminobenzoat, amyl para-aminobenzoat, octyl para-aminobenzoat, etylen glycol salixylat, phenyl salixylat, octyl salixylat, benzyl salixylat, butylphenyl salixylat, homomentyl salixylat, benzyl salixylat, 2-etoxyetyl para-metoxixinamat, octyl para-metoxixinamat, mono-2-etylhexan glyxeryl đipara-metoxixinamat, glyxeryl, isopropyl para-metoxixinamat, hỗn hợp este axit diisopropyl-diisopropyl xinamic, axit urocanic, etyl urokanat, hydroxy metoxy benzophenon, axit hydroxy metoxy benzophenon sulfonic và muối của chúng, dihydroxy metoxy benzophenon, natri dihydroxy metoxy benzophenon disulfonat, dihydroxy benzophenon, tetrahydroxy benzophenon, 4-tert-butyl-4'-metoxydibenzoylmetan, 2,4,6-trianilino-p- (carbo-2'-etylhexyl-1'-oxy)-1,3,5-triazin, 2- (2-hydroxy-5-metylphenyl) benzotriazol, và các chất tương tự.

Chất khử trùng có thể bao gồm hinokitiol, triclosan, triclohydroxy diphenyl ete, clohexidin gluconat, phenoxyetanol, resorcin, isopropyl metylphenol, azulen, axit salixylic, kẽm pyrrithion, benzalkonium clorit, photosensitizer số 301, natri mononitro guaiacol, axit undexylenic, và các chất tương tự.

Chất chống oxy hóa có thể bao gồm butylhydroxyanisol, propyl gallat, axit elisorbic và các chất tương tự.

Chất điều chỉnh độ pH có thể bao gồm axit xitric, natri xitrat, axit malic, natri malat, axit fumaric, natri fumarat, axit suxinic, natri suxinat, natri hydroxit, natri

monohydrogen phosphat, và các chất tương tự.

Rượu có thể bao gồm loại rượu cao hơn như rượu xetyl.

Ngoài ra, các thành phần có thể được thêm vào không bị giới hạn ở trên. Ngoài ra, bất kỳ thành phần nào trong số các thành phần nêu trên có thể được thêm vào trong phạm vi mà không ảnh hưởng xấu đến mục đích và hiệu quả của sáng chế, nhưng có thể được thêm vào với lượng tốt hơn là bằng 0,01-5 phần trọng lượng, tốt hơn nữa là 0,01-3 phần trọng lượng, so với tổng trọng lượng.

Nguyên liệu mỹ phẩm theo sáng chế có thể ở dạng dung dịch, nhũ tương, hỗn hợp nhót và dạng tương tự.

Các ví dụ về dạng của nguyên liệu mỹ phẩm có thể bao gồm nhưng không bị giới hạn ở nhũ tương, kem, nước mỹ phẩm, mặt nạ dưỡng da, kem nền trang điểm, nước dưỡng ẩm, dung dịch làm đẹp, nguyên liệu mỹ phẩm tóc, xà phòng, và các loại tương tự.

Các ví dụ cụ thể về nguyên liệu mỹ phẩm theo sáng chế có thể bao gồm kem làm sạch da mặt, bột làm sạch da mặt, kem làm sạch, sữa làm sạch, kem dưỡng da làm sạch, kem mát-xa, kem làm mát, kem dưỡng ẩm, nhũ tương, nước mỹ phẩm, mặt nạ, kem dùng sau khi cạo râu, kem chống nắng, dầu phoi nắng, xà phòng, dầu gội toàn thân, dầu gội đầu, dầu xả, kem ủ tóc, dầu xả dưỡng tóc, nguyên liệu mọc tóc, kem dưỡng tóc, dung dịch dưỡng tóc, nước dưỡng ẩm giữ nếp tóc, keo xịt tóc, cầu tóc, màu xả, màu phun, dung dịch tạo sóng vĩnh viễn, bột nén, bột lỏng, phấn mắt, kem dưỡng da tay, son môi, và các loại tương tự.

Chế phẩm mỹ phẩm theo sáng chế có thể thu được bằng cách điều chế các thành phần được chọn từ nhóm bao gồm vitamin tan trong nước, vitamin tan trong chất béo, peptit polyme, polysacarit, các sphingolipit và chiết xuất tảo, (các thành phần khác có thể được bổ sung khi cần thiết, ngoài các thành phần nêu trên) ngoài các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê, làm thành phần hoạt tính của sáng chế, theo phương pháp đã biết, ví dụ, phương pháp được bộc lộ trong [Hướng dẫn phát triển chế phẩm điều chế ứng dụng qua da] do Matsumoto Michio biên tập, Ấn bản 1 (xuất bản năm 1985 bởi Seishi Shoin), và các loại tương tự.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất sản phẩm mỹ phẩm chức năng dành cho

tóc để làm giảm và ngăn ngừa rụng tóc bao gồm các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê làm thành phần hoạt tính.

Sản phẩm mỹ phẩm chức năng dành cho tóc để làm giảm và ngăn ngừa rụng tóc theo một khía cạnh của sáng chế có thể là công thức dầu gội, hoặc có thể là công thức tại chỗ như thuốc mỡ, kem, và gel để bôi da đầu.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất thực phẩm chức năng cho sức khỏe bao gồm các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê làm thành phần hoạt tính.

Các chức năng liên quan đến sức khỏe của thực phẩm chức năng cho sức khỏe có thể là nhưng không bị giới hạn ở làm giảm quá mẫn da, cải thiện chức năng miễn dịch, cải thiện sức khỏe đường ruột, cải thiện sức khỏe làn da, điều chỉnh lượng đường trong máu, chức năng chống oxy hóa, hoặc cải thiện sức khỏe của gan.

Loại thực phẩm chức năng cho sức khỏe theo một khía cạnh của sáng chế không bị giới hạn cụ thể. Loại thực phẩm chức năng cho sức khỏe có thể là nhưng không bị giới hạn ở bất kỳ loại nào trong nhóm bao gồm sản phẩm sữa, sản phẩm bánh kẹo, gia vị, đồ uống và rượu, đồ ăn nhẹ, kẹo, kem và món tráng miệng đông lạnh, ngũ cốc ăn sáng, thanh dinh dưỡng, sản phẩm sô cô la dạng thanh ăn nhẹ, thực phẩm đã chế biến, sản phẩm ngũ cốc và mì ống, súp, nước sốt, sản phẩm mứt kẹo, dầu và sản phẩm chất béo, đồ uống từ sữa, các sản phẩm từ đậu nành tương tự sữa, thực phẩm đông lạnh, thực phẩm nấu chín và thay thế, sản phẩm thịt, pho mai, sữa chua, bánh mì, bánh mì cuộn, sản phẩm men, bánh ngọt, bánh quy và bánh quy giòn. Ngoài ra, tất cả các mặt hàng được coi là thực phẩm chức năng theo nghĩa chung đều được bao gồm.

Thực phẩm chức năng cho sức khỏe theo một khía cạnh của sáng chế có thể được tạo công thức và sử dụng dưới dạng viên nang, viên nén, bột, huyền phù lỏng, thuốc viên, hạt, và các dạng tương tự. Các dạng như vậy được tạo ra bằng cách tạo thành thực phẩm chức năng, hoặc trộn đều với tá dược, chất kết dính, chất phân hủy, v.v. thành các hạt bằng phương pháp thích hợp và làm cho các hạt càng đều càng tốt. Ngoài ra, có thể thêm chất tạo hương, chất tạo vị, hoặc chất tương tự nếu cần. Khi thực phẩm chức năng là thực phẩm chức năng ở dạng đồ uống, thì thực phẩm chức năng có thể chứa các chất tạo hương vị khác nhau hoặc carbohydrate tự nhiên, v.v. làm thành phần bổ sung, như trường hợp của các loại đồ uống thông thường. Ví dụ về carbohydrate tự nhiên bao gồm monosacarit như glucoza và fructoza, disacarit như maltoza và sucroza, polysacarit như

dextrin và cyclodextrin, và rượu đường như xylitol, sorbitol và erythritol. Đối với chất tạo ngọt, có thể sử dụng chất làm ngọt tự nhiên như thaumatin và chiết xuất stevia, hoặc chất làm ngọt nhân tạo như sacarin và aspartam. Các nguyên liệu chức năng như chiết xuất gừng hươu, fructooligosaccharit để giúp hấp thụ canxi và nhu động ruột, mật ong hoa keo, chiết xuất hỗn hợp *Scutellaria baicalensis* là chất bảo quản tự nhiên, gồm gellan, là chất làm đặc chống lắng, và các chất tương tự, có thể được thêm vào, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó, bất kỳ nguyên liệu chức năng nào phù hợp với thực phẩm chức năng cho sức khỏe đều có thể được sử dụng một cách thích hợp.

Các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê làm thành phần hoạt tính của thực phẩm chức năng cho sức khỏe theo sáng chế, là nguyên liệu cực kỳ an toàn, trong đó nguồn sữa hoặc sữa dê, là nguyên liệu thực phẩm đã được loài người sử dụng làm nguồn thực phẩm từ lâu đời. Theo đó, các exosome có nguồn gốc từ sữa hoặc sữa non theo ví dụ của sáng chế có thể được sử dụng làm nguyên liệu nguồn an toàn và cực kỳ hiệu quả cho các chức năng sức khỏe khác nhau.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất được phẩm dùng để điều trị vết thương bao gồm các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê làm thành phần hoạt tính.

Trong dược phẩm, sữa hoặc sữa dê có thể là sữa thô, sữa thương phẩm hoặc sữa dê, hoặc sữa non.

Trong dược phẩm theo sáng chế, thành phần hoạt tính có thể được bao gồm với lượng từ 0,1 đến 100 phần trọng lượng so với tổng trọng lượng của chế phẩm.

Chế phẩm của sáng chế có thể còn bao gồm chất mang, tá dược, và chất pha loãng thích hợp thường được sử dụng để bào chế dược phẩm. Ngoài ra, trong việc bào chế dược phẩm, có thể sử dụng các chất phụ gia rắn hoặc lỏng để bào chế. Các chất phụ gia để tạo công thức có thể là chất hữu cơ và vô cơ bất kỳ.

Ví dụ về tá dược có thể bao gồm lactoza, sucroza, sacaroza, glucoza, tinh bột ngô, tinh bột, bột đá tan, sorbit, xenluloza tinh thể, dextrin, cao lanh, canxi cacbonat, silicon đioxit, và các loại tương tự. Ví dụ về chất kết dính có thể bao gồm rượu polyvinyl, polyvinyl ete, etyl xenluloza, metyl xenluloza, cao su Arabia, tragacan, gelatin, shellac, hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl metyl xenluloza, canxi xitrat, dextrin, pectin, và các loại tương tự. Ví dụ về chất bôi trơn có thể bao gồm magie stearat, bột đá tan, polyetylen glycol, silicat, dầu thực vật hydro hóa, và các loại tương tự. Có thể sử dụng

bất kỳ chất tạo màu nào thường được phép sử dụng trong thuốc. Viên nén và hạt của dược phẩm có thể được phủ một cách thích hợp bằng lớp phủ đường, lớp phủ gelatin, và các loại tương tự, nếu cần. Ngoài ra, chất bảo quản, chất chống oxy hóa, và các chất tương tự có thể được thêm vào nếu cần.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế theo bất kỳ công thức nào thường được sản xuất trong ngành công nghiệp tương ứng (ví dụ, tài liệu [Remington's Pharmaceutical Science, ấn bản mới; Mack Publishing Company, Easton PA), và dạng công thức không bị hạn chế cụ thể, nhưng có thể tốt hơn là chất dùng tại chỗ. Chất dùng tại chỗ theo sáng chế có thể bao gồm các dạng thông thường của chất dùng tại chỗ chẳng hạn như chế phẩm dạng tấm, chất dùng tại chỗ dạng lỏng, chế phẩm dạng xịt, chế phẩm dạng nước dưỡng ẩm, chế phẩm dạng kem, chế phẩm dạng phết, chế phẩm dạng bột, chế phẩm dạng miếng thấm, chế phẩm dạng xịt, chế phẩm dạng gel bao gồm hydrogel, chế phẩm dạng dán, chế phẩm dạng thuốc lót, chế phẩm dạng thuốc mỡ, bình xịt, chế phẩm dạng huyền phù, chế phẩm dùng qua da, và các loại tương tự. Các công thức như vậy được mô tả trong tài liệu [Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 1804218042 (Chương 87: Blaug, Seymour), là công thức được biết đến phổ biến trong tất cả các lĩnh vực dược phẩm và hóa học.

Theo ví dụ của sáng chế, chế phẩm có thể được áp dụng trực tiếp lên vết thương. Tức là, chế phẩm có thể được phân phối trên vị trí vết thương. Chế phẩm dạng tấm, khi được áp dụng lên vết thương, dùng để băng vết thương một cách thích hợp để bảo vệ vết thương và ngăn ngừa việc giảm hiệu quả điều trị của thành phần hoạt tính. Có thể sử dụng bất kỳ loại băng gạc nào được bán trên thị trường hoặc được biết đến rộng rãi. Ví dụ về băng gạc bán sẵn trên thị trường có thể bao gồm Compeel, Duoderm, Tagaderm và Opsite.

Khi dược phẩm theo sáng chế được tạo ra dưới dạng chất dùng tại chỗ, chất mang dược dụng, mặc dù nó thay đổi tùy thuộc vào công thức của dược phẩm, có thể bao gồm các hydrocarbon chẳng hạn như petrolatum, parafin lỏng và hydrocarbon dạng gel (đã biết như Plastibase); dầu động vật và thực vật chẳng hạn như axit triglycerit béo chuỗi trung bình, mỡ lợn, mỡ cứng và mỡ ca cao; rượu axit béo cao hơn, axit béo và este của chúng chẳng hạn như xetanol, rượu stearyl, axit stearic, và isopropyl palmitat; bazơ tan trong nước như macrogol (polyetylen glycol), 1,3-butylen glycol, glyxerol, gelatin,

sucroza, và rượu đường; các chất nhũ hóa, chẳng hạn như este axit béo glyxerol, polyoxylstearat, và dầu thầu dầu đã hydro hóa polyoxyetylen; chất kết dính chẳng hạn như este axit acrylic và natri alginat; chất đẩy như khí hóa lỏng và cacbon đioxit; và các chất bảo quản như este axit paraoxybenzoic, và chất dùng tại chỗ theo sáng chế có thể được sản xuất theo phương pháp đã biết, sử dụng bất kỳ thành phần nào nêu trên. Ngoài các thành phần đã đề cập ở trên, chất ổn định, chất tạo mùi thơm, chất tạo màu, chất điều chỉnh độ pH, chất pha loãng, chất hoạt động bề mặt, chất bảo quản, chất chống oxy hóa, và các chất tương tự, có thể còn được pha trộn thêm vào nếu cần. Chất dùng tại chỗ theo sáng chế có thể được sử dụng bằng cách áp dụng lên vết thương tại chỗ theo phương pháp đã biết.

Ngoài ra, chất dùng tại chỗ theo sáng chế có thể được sử dụng để kết dính trên tấm đỡ dạng rắn, chẳng hạn như lớp vỏ tách lớp băng vết thương của loại băng thông thường. Theo ví dụ của sáng chế, tấm đỡ dạng rắn trước tiên được phủ lớp chất kết dính để tăng độ gắn kết của môi trường lỏng vào tấm đỡ dạng rắn. Ví dụ về chất kết dính có thể bao gồm polyacrylat và xyanoacrylat.

Loại công thức này được bán rộng rãi trên thị trường, ví dụ bao gồm: băng có lớp vỏ tách lớp băng vết thương không dính ở dạng màng phim nhựa đục lỗ (Smith & Nephew Ltd.), BAND-AID ở dạng dải mỏng, miếng dán, miếng chấm đốt, và dải nhựa của Johnson & Johnson; Băng quấn Curity CURAD (Curity CURAD, Ouchless) của Colgate-Palmolive Co. (Kendall); và dải đàn hồi STIK-TITE của American WhiteCross Laboratories, Inc., và các loại tương tự.

Theo ví dụ của sáng chế, dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng chất dùng tại chỗ dạng lỏng bằng cách trộn các exosome có nguồn gốc từ sữa hoặc sữa dê theo ví dụ của sáng chế với nước muối theo tỷ lệ thể tích nhất định. Theo ví dụ của sáng chế, dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng thuốc mỡ bằng cách trộn các exosome có nguồn gốc từ sữa hoặc sữa dê theo ví dụ của sáng chế với chất nền thuốc mỡ hòa tan trong nước và thêm nước muối vào đó.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp đẩy nhanh tái tạo vùng da bị thương của đối tượng, phương pháp bao gồm áp dụng lượng hiệu quả điều trị của exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê lên vùng da bị thương của đối tượng.

Trong phương pháp này, sữa hoặc sữa dê có thể là sữa thô, sữa thương phẩm hoặc

sữa dê, hoặc sữa non.

Lượng hiệu quả điều trị có thể thay đổi tùy thuộc vào loại vết thương của bệnh nhân, vị trí áp dụng, tần suất điều trị, thời gian điều trị, công thức, tình trạng của bệnh nhân, loại chất hỗ trợ, và các yếu tố tương tự. Lượng sử dụng không bị giới hạn cụ thể, nhưng liều có hiệu quả hàng ngày của dược phẩm theo sáng chế có thể là, khi môi trường nuôi cấy tế bào được áp dụng lên vết thương, từ 1 đến 50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$, tốt nhất là 5 đến 20 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$.

Liều dùng trong 1 ngày có thể được dùng một lần mỗi ngày, hoặc có thể được phân chia trong hai hoặc ba lần mỗi ngày với khoảng thời gian thích hợp, hoặc có thể được dùng cách quãng vài ngày một lần.

Bước sử dụng có thể được thực hiện bằng cách uống, tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp hoặc dùng trong mũi, nhưng tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da được ưu tiên hơn và nếu được bào chế dưới công thức loại sử dụng ngoài da thích hợp, cũng có thể sử dụng trực tiếp lên vị trí vết thương.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp nâng cao khả năng miễn dịch của đối tượng, phương pháp bao gồm việc sử dụng lượng hiệu quả điều trị của exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê cho đối tượng.

Trong phương pháp này, sữa hoặc sữa dê có thể là sữa thô, sữa thương phẩm hoặc sữa dê, hoặc sữa non.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị rụng tóc của đối tượng, phương pháp bao gồm sử dụng lượng hiệu quả điều trị của exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê cho đối tượng.

Trong phương pháp này, sữa hoặc sữa dê có thể là sữa thô, sữa thương phẩm hoặc sữa dê, hoặc sữa non.

Bước sử dụng có thể được thực hiện bằng cách uống, tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp hoặc dùng trong mũi, nhưng tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da được ưu tiên hơn, và nếu được bào chế dưới công thức loại sử dụng ngoài da thích hợp, cũng có thể sử dụng trực tiếp lên vị trí vết thương.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm nếp nhăn trên da của đối tượng, phương pháp bao gồm sử dụng lượng hiệu quả điều trị của exosome

được tách ra từ sữa hoặc sữa dê cho đối tượng.

Trong phương pháp này, sữa hoặc sữa dê có thể là sữa thô, sữa thương phẩm hoặc sữa dê, hoặc sữa non.

Bước sử dụng có thể được thực hiện bằng cách uống, tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp hoặc dùng trong mũi, nhưng tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da được ưu tiên hơn và nếu được bào chế dưới dạng công thức loại sử dụng ngoài da thích hợp, cũng có thể sử dụng trực tiếp lên vị trí vết thương.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp làm trắng da của đối tượng, phương pháp bao gồm sử dụng lượng hiệu quả điều trị của exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê cho đối tượng.

Trong phương pháp này, sữa hoặc sữa dê có thể là sữa thô, sữa thương phẩm hoặc sữa dê, hoặc sữa non.

Bước sử dụng có thể được thực hiện bằng cách uống, tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp hoặc dùng trong mũi, nhưng tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da được ưu tiên hơn, và nếu được bào chế dưới dạng công thức loại sử dụng ngoài da thích hợp, cũng có thể sử dụng trực tiếp lên vị trí vết thương.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê để điều chế chất làm lành vết thương.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê để điều chế mỹ phẩm giảm nếp nhăn.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê để điều chế mỹ phẩm làm trắng da.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê để điều chế chất ngăn ngừa và điều trị rụng tóc.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê để điều chế chất mọc tóc thúc đẩy phát triển tóc.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất việc sử dụng các exosome được tách ra từ sữa hoặc sữa dê để điều chế chế phẩm để tăng cường khả năng miễn dịch.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp tách các exosome từ sữa

hoặc sữa dê, phương pháp bao gồm: bước ly tâm thứ nhất để loại bỏ chất béo và tế bào khỏi sữa hoặc sữa dê bằng cách ly tâm; bước lọc dùng bộ lọc để lọc sữa hoặc sữa dê đã ly tâm với màng lọc có kích thước mắt lưới từ 20 đến 60 μm , để loại bỏ thêm chất béo và tế bào khỏi sữa; bước pha loãng để pha loãng sữa hoặc sữa dê đã lọc bằng cách thêm vào đó lượng nước cất tương đương; bước kết tủa đẳng điện bằng cách thêm axit vào sữa hoặc sữa dê đã pha loãng để điều chỉnh độ pH từ 4 đến 5, nhờ đó kết tủa casein trong sữa hoặc sữa dê; bước ly tâm thứ hai để ly tâm bổ sung sữa hoặc sữa dê có casein đã được kết tủa, và thu lấy phần nổi phía trên của chúng; và bước lọc để lọc phần nổi phía trên thu được bằng màng lọc 0,2 μm .

Trong phương pháp trên, bước ly tâm thứ nhất có thể được thực hiện trong điều kiện nhiệt độ 4°C ở lực ly tâm 4.000 đến 6.000 x g trong 20 đến 40 phút, và tốt hơn là, có thể được thực hiện trong điều kiện nhiệt độ 4°C ở lực ly tâm 4.000 đến 5.000 x g trong 30 phút.

Trong phương pháp trên, màng lọc có thể là màng lọc có kích thước mắt lưới từ 30 đến 50 μm , tốt hơn có thể là màng lọc có kích thước mắt lưới từ 35 đến 45 μm , và tốt nhất có thể là màng lọc có kích thước mắt lưới là 40 μm .

Trong phương pháp trên, axit có thể là axit clohydric, axit nitric, axit axetic, hoặc axit sulfuric, tốt hơn có thể là axit clohydric, và tốt nhất có thể là axit clohydric 6N.

Trong phương pháp trên, bước ly tâm thứ hai có thể được thực hiện ở nhiệt độ phòng ở lực ly tâm 4.000 đến 6.000 x g trong 15 đến 30 phút, tốt hơn là có thể tiến hành ở nhiệt độ phòng ở lực ly tâm 4.500 đến 5.500 x g trong 15 đến 25 phút, và tốt nhất là có thể tiến hành ở nhiệt độ phòng ở lực ly tâm 5.000 x g trong 20 phút.

Biết rằng các exosome có rất nhiều trong sữa. Hơn nữa, vì sữa có thể đóng vai trò như nền tảng sản xuất exosome có khả năng tạo ra exosome với số lượng lớn với chi phí thấp hơn so với tế bào gốc, nên quy trình sản xuất exosome số lượng lớn từ sữa hoặc sữa non đã được thiết lập (tham chiếu trên Fig.1a). Hơn nữa, thông qua quy trình được thiết lập ở trên, có thể khẳng định rằng khi tách các exosome từ sữa, lượng exosome lớn hơn đáng kể được tách ra so với khi phân lập từ các tế bào HEK293 (tham chiếu trên Fig.2a), và cụ thể, thấy rằng khi sử dụng sữa non làm nguyên liệu thô, các exosome được sản xuất với năng suất cực cao từ 0,45 đến 1,5 mg/ml khi được chuyển đổi thành hàm lượng protein. Có thể thấy rằng đây là giá trị tăng đến 100 lần hoặc cao hơn, khi so sánh

với năng suất của các tế bào HEK293 (tham chiếu trên Fig.2). Hơn nữa, các tác giả sáng chế, trong nỗ lực nhằm tăng năng suất sản xuất exosome từ sữa, đã phát triển quy trình đơn giản hơn mà không sử dụng lọc qua máy siêu lọc (tham chiếu trên Fig.1b), và cũng khẳng định rằng việc sử dụng quy trình cải tiến như vậy để tách các exosome từ sữa có khả năng đạt được hiệu suất tăng đáng kể từ 400 đến 1.000 lần hoặc cao hơn, so với kỹ thuật siêu lọc thông thường (tham chiếu trên Fig.2b). Trong khi đó, để khẳng định xem các exosome được điều chế theo phương pháp trên có phải là các exosome bình thường hay không, sự biểu hiện của các dấu hiệu exosome CD8, CD63, CD81 và TSG 101 đã được phân tích bằng phương pháp Westen blot, và sự phân bố kích thước hạt của các exosome được phân tích bằng phân tích tán xạ động. Kết quả là, như có thể thấy trên Fig.3, các dấu hiệu exosome được xác định là bình thường, mặc dù hơi thấp hơn so với các exosome có nguồn gốc từ HEK293 đóng vai trò là đối chứng, và như có thể thấy trên Fig.4, nhận thấy rằng các exosome có nguồn gốc từ sữa là các hạt có kích thước nano có đường kính hạt trung bình là 68,05 nm và phân bố kích thước hạt từ 30 đến 100 nm. Đây là sự phân bố kích thước tương tự như phân bố của các exosome đối chứng, và từ kết quả này, có thể khẳng định rằng các exome có thể được tách ra bình thường từ sữa.

Các tác giả sáng chế đã thực hiện phân tích độ ổn định để nghiên cứu công dụng của các exosome được phân lập từ môi trường nuôi cấy tế bào làm nguyên liệu thô cho mỹ phẩm. Cụ thể, các exosome phân lập từ tế bào HEK293, là dòng tế bào người thường được sử dụng để sản xuất các exome tái tổ hợp, được sấy đông khô và rã đông hai lần, và hình dạng của chúng được kiểm tra bằng phân tích tán xạ động và kính hiển vi điện tử truyền qua (tham chiếu trên Fig.3 và Fig.4). Kết quả là, nhận thấy rằng các exosome có nguồn gốc từ tế bào HEK293, khi được sấy đông khô và rã đông lần thứ hai, không có khả năng giữ lại hình dạng ban đầu của chúng do sự kết tụ. Theo đó, có thể khẳng định rằng các exosome có nguồn gốc từ dòng tế bào nói chung được sử dụng ở dạng nguyên liệu thô được sấy đông khô, và là nguyên liệu thô không phù hợp cho các thành phần trong chế phẩm mỹ phẩm được dự định bảo quản sau này ở nhiệt độ phòng.

Trong tình huống này, các tác giả sáng chế đã thực hiện phân tích so sánh giữa độ ổn định của các exosome được tách ra từ sữa và các exosome có nguồn gốc từ các tế bào khác. Cụ thể, phân tích kích thước hạt bằng cách tán xạ ánh sáng động được thực hiện giữa các exosome có nguồn gốc từ sữa non theo ví dụ của sáng chế và các exosome

có nguồn gốc từ các tế bào khác (HaCat Exo, B16 Exo, và HDF Exo) trước và sau khi bảo quản lạnh. Nhận thấy rằng, không giống như các exosome đối chứng, các exosome có nguồn gốc từ sữa vẫn giữ nguyên hình dạng của chúng mặc dù được sấy đông khô và rã đông (tham chiếu trên Fig.7a và Fig.7b), và các exosome sữa non trước và sau khi đông lạnh được sử dụng cho các nguyên bào sợi da người, và kết quả là, có thể khẳng định rằng khả năng tạo ra biểu hiện collagen loại I vẫn còn nguyên vẹn. Điều này cho thấy hoạt tính sinh học của các exosome sữa theo ví dụ của sáng chế vẫn còn nguyên vẹn mặc dù đã qua xử lý bảo quản đông lạnh.

Hơn nữa, trong khi các exosome sữa theo ví dụ của sáng chế được phát hiện là vẫn duy trì kích thước của chúng mặc dù được đông lạnh và rã đông lặp đi lặp lại, nhận thấy rằng các exosome có nguồn gốc từ tế bào khác tăng kích thước hạt khi số lần chu kỳ đông lạnh-rã đông tăng lên, và do đó làm phát sinh sự kết hợp hoặc hợp nhất, thể hiện hình dạng bên ngoài không ổn định (tham chiếu trên Fig.8).

Hơn nữa, để khẳng định xem các exosome được tách ra từ sữa có thể được phân phối thành công đến các tế bào da hay không, các tác giả sáng chế đã xử lý các nguyên bào sợi da người (HDF) bằng các exosome có nguồn gốc từ sữa được đánh dấu huỳnh quang và xác định vị trí của các exosome bằng kính hiển vi huỳnh quang (tham chiếu trên Fig.9). Kết quả cho thấy rằng các exosome có nguồn gốc từ sữa theo sáng chế đã được chuyển tiếp tốt vào tế bào chất của nguyên bào sợi ở da.

Trong khi đó, để khẳng định xem các exosome sữa theo ví dụ của sáng chế có khả năng gây độc tế bào hay không, các tác giả sáng chế đã sử dụng các exosome sữa cho các nguyên bào sợi da người ở nồng độ cao 0,1 mg/ml và 0,3 mg/ml, và kết quả cho thấy quá trình gây chết tế bào không xảy ra (tham chiếu trên Fig.10).

Ngoài ra, để khẳng định xem exosome sữa theo ví dụ của sáng chế có hoạt động ức chế chống lại tổn thương tế bào oxy hóa do tia cực tím gây ra hay không, sau khi gây ra tổn thương cho các nguyên bào sợi da người bởi ánh sáng cực tím, các exosome sữa non theo ví dụ của sáng chế đã được sử dụng để khẳng định sự hình thành của các loại oxy phản ứng. Kết quả cho thấy rằng không giống như các exosome đối chứng có nguồn gốc từ các tế bào khác, các exosome sữa non theo ví dụ của sáng chế đã ức chế đáng kể sự hình thành các loại oxy phản ứng do tia cực tím gây ra (tham chiếu trên Fig.11a và Fig.11b).

Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu xem các exosome có nguồn gốc từ sữa được tách theo ví dụ của sáng chế có khả năng tái tạo da hay không. Để đạt được mục đích này, tế bào sừng HaCaT của người và nguyên bào sợi da người (HDF) đã được xử lý bằng các exosome có nguồn gốc từ sữa thương mại và sữa non để kiểm tra mức độ tăng sinh tế bào (tham chiếu trên Fig.6). Kết quả cho thấy rằng các exosome có nguồn gốc từ sữa theo sáng chế có tác dụng tăng sinh tế bào vượt trội so với nhóm đối chứng (được xử lý bằng PBS). Cụ thể, nhận thấy rằng các exosome có nguồn gốc từ sữa non thậm chí còn có khả năng tăng sinh tế bào cao hơn các exosome có nguồn gốc từ sữa thương mại. Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu ảnh hưởng đến khả năng di chuyển của tế bào, đây là một trong những thước đo khả năng tái tạo tế bào (tham chiếu trên Fig.13). Kết quả cho thấy rằng khi sử dụng các exosome có nguồn gốc từ sữa theo sáng chế, đã làm tăng sự di chuyển của tế bào trong nguyên bào sợi da người (HDF) cũng như trong tế bào sừng HaCaT của người, so với đối chứng, và đặc biệt là các exosome có nguồn gốc từ sữa non biểu hiện khả năng di chuyển tế bào cao đáng kể.

Hơn nữa, để xác định các công dụng khác nhau của exosome sữa theo ví dụ của sáng chế, các tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu sau: có hoặc không có sự hình thành ống khi được điều trị trong tế bào nội mô mạch máu (tham chiếu trên Fig.14); phân tích mô hình phân phối *in vivo* theo thời gian khi sử dụng *in vivo* (tham chiếu trên Fig.15a đến Fig.15c); so sánh khả năng chữa lành vết thương khi sử dụng cho vết thương nhân tạo được gây ra trên động vật mô hình vết thương thực tế (tham chiếu trên Fig.16); phân tích biểu hiện elastin khi được điều trị vị trí vết thương (tham chiếu trên Fig.17); tác dụng giảm nếp nhăn trên da thông qua gây ra biểu hiện collagen loại I và ức chế biểu hiện MMP-2 khi được điều trị trong nguyên bào sợi da người (tham chiếu trên Fig.18a và Fig.18b); tác dụng làm trắng da thông qua ức chế tổng hợp melanin trong tế bào hắc tố (tham chiếu trên Fig.19); và tác dụng điều trị chứng rụng tóc, thông qua khả năng gây ra sự biểu hiện của các xytokin gắn với hoạt hóa miễn dịch khi được điều trị trong các đại thực bào có nguồn gốc từ tủy xương (BMDM) (tham chiếu trên Fig.20), khả năng gây ra sự biểu hiện của các yếu tố tăng trưởng liên quan đến viêm nhiễm khi được xử lý trong nguyên bào sợi (tham chiếu trên Fig.21), hấp thu vào các tế bào nhú hạ bì của người (tham chiếu trên Fig.22a), khả năng tăng sinh trên các tế bào nhú hạ bì của người trong tình trạng bình thường và tình trạng gây rụng tóc (tham chiếu trên Fig.22b), và phân tích về sự thúc đẩy mọc tóc và mọc lông trong thí nghiệm trên động vật (tham

chiều trên Fig.22c). Kết quả là, có thể khẳng định rằng các exosome sữa theo ví dụ của sáng chế là chất thể hiện các hoạt động sinh học khác nhau như chữa lành vết thương, giảm nếp nhăn, tác dụng làm trắng, tác dụng tăng cường miễn dịch, tác dụng ngăn ngừa rụng tóc, và các tác dụng tương tự.

Từ kết quả này, các tác giả sáng chế đã có thể khẳng định rằng các exosome có nguồn gốc từ sữa theo ví dụ của sáng chế có thể được sử dụng rất hiệu quả cho nhiều mục đích, bao gồm tái tạo da và chữa lành vết thương, và còn trong sản xuất mỹ phẩm chức năng như làm trắng và giảm nếp nhăn, điều trị rụng tóc và tăng cường miễn dịch.

Các ví dụ của sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ và ví dụ thử nghiệm. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ và ví dụ thử nghiệm được mô tả dưới đây, mà có thể được thực hiện dưới nhiều hình thức khác nhau, và các ví dụ và ví dụ thử nghiệm sau đây được cung cấp để làm cho phần mô tả của sáng chế trở nên hoàn chỉnh và để cung cấp thông tin đầy đủ cho những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế.

Ví dụ so sánh: phân lập các exosome từ các tế bào HEK293

Để phân lập các exosome từ các tế bào HEK293, các tế bào HEK293T (6×10^6) được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy glucoza cao được bổ sung 10% FBS và 1% kháng sinh (môi trường Eagle's cải tiến của Dulbecco, DMEM, 4.500 mg/L glucoza), được duy trì ở 37°C, điều kiện 5% CO₂, và khi quan sát thấy sự hợp lưu 80-90% trên đĩa nuôi cấy 15 cm, và để phân lập các exosome, chất lỏng nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào thu được bằng phương pháp ly tâm vi sai. Phương pháp cụ thể như sau.

Trước tiên, để loại bỏ mảnh vụn tế bào và các thành phần tế bào khác khỏi môi trường nuôi cấy có chứa các exosome, quá trình ly tâm được thực hiện tuần tự ở lực ly tâm 300 x g trong 10 phút, 2.000 x g trong 10 phút và 10.000 x g trong 30 phút, và sau khi lọc môi trường nuôi cấy bằng màng lọc 0,22 μ m, siêu ly tâm được thực hiện ở tốc độ 36.900 vòng/phút trong 2 giờ. Các exosome thu được sau đó được đưa vào PBS có chứa chất ức chế proteaza (Roche).

Ví dụ 1: Tách các exosome từ sữa thương phẩm

Các tác giả sáng chế đã tách các exosome từ sữa thương phẩm bằng phương pháp

sau.

Trước tiên, sữa thương phẩm được ly tâm ở lực ly tâm 3.000 x g trong 30 phút, và sau đó tiếp tục được ly tâm siêu tốc ở lực ly tâm 12.000 x g trong 1 giờ, ở 35.000 x g trong 1 giờ, và sau đó ở 70.000 x g trong 3 giờ. Tiếp theo, sản phẩm thu được được lọc lần thứ nhất bằng màng lọc 0,8 μm , và lọc lần thứ hai bằng màng lọc 0,45 μm , và sau đó là lọc lần thứ ba bằng màng lọc 0,2 μm . Dịch lọc được quay siêu ly tâm ở lực ly tâm 100.000 x g trong 1 giờ, và các viên nhỏ được thu thập và lơ lửng trong PBS có chứa chất ức chế proteaza (Roche) (như thể hiện trên Fig.1). Đối với các exosome được tách ra từ sữa ở trên, nồng độ protein của các exosome đã tách được đo bằng cách sử dụng bộ phân tích protein BCA (Bio-Rad) như được mô tả cho các ví dụ so sánh ở trên.

Ví dụ 2: Tách các exosome sữa non

Các tác giả sữa non bằng phương pháp tương tự như được mô tả trong ví dụ 1 bên trên, ngoại trừ sữa non (được lấy từ Trang trại Lee Sung Young Chang-buk ở 20, Bongsangwandong 1-ro, Gyeseon-myeon, Changnyeong-gun, Gyeongsangnam-do) được sử dụng thay cho sữa thương phẩm.

Ví dụ 3: Cải tiến quy trình tách exosome

Phương pháp được sử dụng trong các ví dụ 1 và ví dụ 2 yêu cầu siêu ly tâm và thực hiện ly tâm tuần tự nhiều lần, và do đó có một nhược điểm là tốn nhiều thời gian. Trong hoàn cảnh này, các tác giả sáng chế đã tìm cách phát triển phương pháp tách exosome đơn giản và hiệu quả hơn.

Cụ thể, để đạt được điều này, các tác giả sáng chế đã đưa ra phương pháp tách exosome mới thông qua các sửa đổi đối với phương pháp tách exosome từ sữa đã được bộc lộ trước đây (Yamauchi *et al.*, Drug Dev. Ind. Pharm. 45 (3): 359-364, 2019). Phương pháp được bộc lộ bởi Yamauchi *et al.*, ở trên, sử dụng các quy trình thực hiện ly tâm sữa thô ở lực ly tâm 2.000 x g ở 4°C trong 20 phút để loại bỏ chất béo và các tế bào (ly tâm sơ cấp), thực hiện pha loãng bằng cách thêm lượng nước cất tương đương (pha loãng bằng nước cất), thực hiện chuẩn độ đến độ pH 4,6 bằng cách thêm HCl 6N, nhờ đó loại bỏ casein thông qua kết tủa đẳng điện (kết tủa đẳng điện), thực hiện ly tâm ở lực ly tâm 5.000 x g ở nhiệt độ phòng trong 20 phút (ly tâm thứ hai), và thực hiện lọc tuần tự, sử dụng các màng lọc 1,0 μm , 0,45 μm và 0,2 μm (lọc tuần tự). Các tác giả sáng chế đã thực hiện các sửa đổi cho phương pháp trên để thực hiện quá trình ly tâm thứ nhất ở

lực ly tâm 5.000 x g ở 4°C trong 30 phút, thực hiện quy trình loại bỏ thêm chất béo và tế bào bằng cách lọc sơ bộ với màng lọc 40 µm (Falcon®, Corning, Hoa Kỳ) trước khi pha loãng bằng nước cất, và sau lần ly tâm thứ hai, sử dụng quy trình lọc một lần bằng cách sử dụng màng lọc 0,2 µm thay vì thực hiện các lần lọc tuần tự.

Ví dụ thử nghiệm 1: Phân tích năng suất tách exosome

Sản lượng của các exosome có nguồn gốc từ HEK293 được tách ra theo ví dụ so sánh ở trên, và các exosome được lần lượt từ sữa thương phẩm và sữa non theo các ví dụ 1 và ví dụ 2 của sáng chế được phân tích bằng cách sử dụng bộ xét nghiệm protein BCA (Bio-Rad).

Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.2a, có thể thấy rằng các exosome được phân lập từ các tế bào HEK293 thể hiện năng suất cực kỳ thấp, trong khi theo ví dụ 1 của sáng chế, năng suất tách của các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm là 0,05 mg/ml, cao hơn khoảng 5 lần so với hiệu suất phân lập các exosome có nguồn gốc HEK293 là 0,01 mg/ml. Cụ thể, trường hợp sữa non cho thấy năng suất ít nhất là 0,45 mg/ml dựa trên các protein, cao đáng kể ngay cả khi so sánh với sữa thương phẩm.

Trong khi đó, kết quả của việc tách các exosome từ sữa bằng phương pháp của ví dụ 3, như được thể hiện trên Fig.2b, có thể khẳng định rằng sử dụng phương pháp tách exosome không qua máy siêu lọc theo ví dụ của sáng chế dẫn đến năng suất cao hơn đáng kể so với khi sử dụng phương pháp siêu lọc. Cụ thể, các exosome sữa non cho năng suất gấp 1.000 lần trở lên so với phương pháp siêu lọc. Kết quả này chỉ ra rằng phương pháp tách exosome từ sữa theo ví dụ của sáng chế là phương pháp được mong đợi cao về mặt năng suất.

Ví dụ thử nghiệm 2: Nhận dạng các dấu hiệu exosome

Để khẳng định xem các exosome được tách ra từ sữa thương phẩm và sữa non có giữ lại các đặc tính nguyên vẹn của exosome hay không, các tác giả sáng chế đã thực hiện phân tích Western blot bằng cách sử dụng các kháng thể cụ thể trên các dấu hiệu exosome, CD9, CD63, CD81 và TSG 101.

Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.3, các dấu hiệu đặc trưng cho exosome được xác định là bình thường trong các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm hoặc sữa non theo ví dụ của sáng chế.

Ví dụ thử nghiệm 3: Đặc điểm về kích thước và hình dạng của các exosome

Sau đó, các tác giả sáng chế đã phân tích kích thước hạt của các exosome được tách ra theo ví dụ của sáng chế bằng cách sử dụng thiết bị phân tích tán xạ ánh sáng động (DLS) (Malvern zetasizer nano ZS, Vương quốc Anh), và chụp ảnh các exosome được tạo ra bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (tham chiếu trên Fig.4). Kết quả là, như thể hiện trên Fig.4, nhận thấy rằng các exosome có nguồn gốc từ sữa được điều chế theo ví dụ của sáng chế có kích thước với phổ hẹp đáng kể khoảng 68,05 nm, tương tự như các exosome đối chứng, và về hình dạng cũng không khác biệt đáng kể so với các exosome đối chứng.

Ví dụ thử nghiệm 4: Phân tích độ ổn định đông lạnh/rã đông

Dự định sử dụng các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm và sữa non được lần lượt được tách trong ví dụ 1 và ví dụ 2 làm nguyên liệu thô cho mỹ phẩm, các tác giả sáng chế đã đánh giá độ ổn định bảo quản, cụ thể là độ ổn định đông lạnh-rã đông.

Để đạt được điều này, các exosome đối chứng và exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm được tách trong ví dụ 1 được đông lạnh ở -85°C và rã đông ở nhiệt độ phòng, và các exosome rã đông được chụp ảnh bằng kính hiển vi điện tử truyền qua, và sau đó các exosome đã rã đông lại được đông lạnh ở -85°C và rã đông ở nhiệt độ phòng lần thứ hai, và được chụp ảnh bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (tham chiếu trên Fig.5), và sự phân bố kích thước hạt được phân tích thông qua tán xạ ánh sáng động (tham chiếu trên Fig.6).

Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.5, nhận thấy rằng trong khi các exosome đối chứng mất hình dạng ban đầu do sự kết tụ giữa các exosome đã xảy ra khi rã đông sau khi đông lạnh lần thứ nhất, các exosome có nguồn gốc từ sữa được tách ra theo ví dụ của sáng chế vẫn giữ nguyên hình dạng ban đầu của chúng ngay cả khi đông lạnh/rã đông lần thứ hai.

Hơn nữa, để khẳng định xem sự khác biệt trên có thể là do loại tế bào của các exosome đối chứng hay không, các tác giả sáng chế đã thực hiện phân tích so sánh với phạm vi đối chứng rộng hơn. Cụ thể, để đạt được điều này, các tác giả sáng chế đã đo lường, sử dụng sự tán xạ ánh sáng động, kích thước của các hạt exosome sữa non được điều chế trong ví dụ 2, và các exosome chiết xuất từ tế bào sừng của người (HaCaT), tế bào u ác tính của chuột (B16) và nguyên bào sợi da người (HDF) trước và sau khi sấy

đông khô (tham chiếu trên Fig.7a). Kết quả là, như thể hiện trên Fig.7a, nhận thấy rằng, mặc dù có sự thay đổi về kích thước hạt trong các exosome có nguồn gốc từ ba loại tế bào trước và sau khi sấy đông khô, các exosome sữa non theo ví dụ của sáng chế cho thấy ít thay đổi về kích thước hạt. Ngoài ra, hình dạng của các exosome sữa non theo ví dụ của sáng chế trước và sau khi sấy đông khô đã được xác định bằng kính hiển vi điện tử truyền qua, và như có thể thấy trên Fig.7b, không có sự thay đổi đáng kể về hình dạng trước và sau khi sấy đông khô. Từ đây, có thể thấy rằng các exosome sữa non có độ ổn định cấu trúc tuyệt vời trong quá trình sấy đông khô. Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã xử lý các nguyên bào sợi da người bằng các exosome sữa non theo ví dụ của sáng chế trước và sau khi sấy đông khô ở nồng độ 0,1 mg/ml, và sau 24 giờ, xác định mức độ biểu hiện của protein collagen loại 1 thông qua nhuộm bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang và bằng kính hiển vi huỳnh quang (tham chiếu trên Fig.7c). Như được thể hiện trên Fig.7c, thấy rằng khả năng tổng hợp collagen được duy trì ở mức độ nhất định ngay cả khi rã đông sau khi đông khô, cho thấy rằng các exosome sữa non cũng có sự ổn định về chức năng trong quá trình sấy đông khô.

Hơn nữa, để khẳng định độ ổn định cấu trúc đông lạnh-rã đông của các exosome sữa, các tác giả sáng chế đã so sánh kích thước hạt thông qua các chu kỳ đông lạnh-rã đông (tham chiếu trên Fig.8). Bằng cách sử dụng phân tích tán xạ ánh sáng động, kích thước hạt của các exosome có nguồn gốc từ sữa non, và các exosome có nguồn gốc từ tế bào sừng của người (HaCat), tế bào u ác tính của chuột (B16) và nguyên bào sợi da người (HDF) được đo với số lượng chu kỳ đông lạnh-rã đông tăng dần. Nhận thấy rằng các exosome tế bào tăng kích thước hạt khi số lượng chu kỳ đông lạnh-rã đông tăng lên, trong khi các exosome sữa non cho thấy ít thay đổi về kích thước hạt sau đến 5 chu kỳ đông lạnh-rã đông. Từ đây, có thể thấy rằng các exosome sữa non có độ ổn định cấu trúc tuyệt vời trong quá trình đông lạnh-rã đông.

Ví dụ thử nghiệm 5: Đánh giá khả năng phân phối vào tế bào da

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu xem các exosome có nguồn gốc từ sữa được tách ra theo ví dụ của sáng chế có được đưa vào tế bào da thành công hay không.

Cụ thể, sau khi nhuộm màng sinh chất của các exosome có nguồn gốc từ sữa được tách ra theo ví dụ của sáng chế với thuốc nhuộm huỳnh quang đỏ NHS-Cy5.5, các exosome được sử dụng cho các tế bào nguyên bào sợi da người HDF, và sau 30 phút,

tín hiệu huỳnh quang được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang đồng tiêu cự. DAPI được sử dụng cho phản thuốc nhuộm màu hạt nhân (tham chiếu trên Fig.9).

Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.9, nhận thấy rằng các exosome có nguồn gốc từ sữa theo ví dụ của sáng chế được hấp thụ tốt vào tế bào chất của nguyên bào sợi da.

Ví dụ thử nghiệm 6: Đánh giá độc tính tế bào

Các tác giả sáng chế đã tìm cách đánh giá độc tính tế bào của các exosome sữa non bằng cách tính toán tỷ lệ hoại tử/gây chết trong HDF, nguyên bào sợi da người, được điều trị bằng các exosome sữa non. 24 giờ sau khi sử dụng exosome sữa non ở các nồng độ 0 mg/ml, 0,1 mg/ml và 0,3 mg/ml, các nguyên bào sợi HDF của da người được nhuộm bằng propidium iodua (PI), nhuộm ADN của các tế bào hoại tử và hiển thị huỳnh quang, và với Annexin V/FITC, phản ứng với phosphatidyliserin trong tế bào chết và hiển thị huỳnh quang, và được phân tích bằng máy đếm tế bào dòng chảy. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.10, nhận thấy rằng các exosome sữa non không có độc tính tế bào lên đến nồng độ 0,3 mg/ml, dựa trên tỷ lệ tế bào hoại tử hoặc chết quan sát được so với đối chứng. Điều này cho thấy rằng các exosome sữa non theo ví dụ của sáng chế là các chất an toàn.

Ví dụ thử nghiệm 7: Phân tích tác dụng chống oxy hóa trong các tế bào bị tổn thương bởi tia cực tím

Các tác giả sáng chế đã tìm cách xác nhận tác dụng chống oxy hóa của các exosome sữa thông qua việc giảm các loại oxy phản ứng xảy ra khi các exosomes sữa non được sử dụng cho tế bào sừng của người HaCaT, bị tổn thương do chiếu tia cực tím. 24 giờ sau khi điều trị HaCaT bằng các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm và các exosome có nguồn gốc từ sữa non ở nồng độ 0,05 mg/ml, bức xạ cực tím gây ra hư hại cho các tế bào. Sau 6 giờ, sử dụng DCF-DA, phản ứng với các loại oxy phản ứng và hiển thị huỳnh quang, mức độ oxy phản ứng tạo ra trong tế bào được phân tích thông qua kính hiển vi huỳnh quang. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.11a và Fig.11b, cả exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm và các exosomes sữa non đều cho thấy hiệu quả chống oxy hóa đáng kể trong các tế bào bị tổn thương bởi tia cực tím, và khẳng định rằng hoạt tính chống oxy hóa vượt trội hơn so với các exosome có nguồn gốc từ tế bào gốc.

Ví dụ thử nghiệm 8: Đánh giá hiệu quả tái tạo tế bào da và chữa lành vết thương

Sau đó, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu xem các exosome có nguồn gốc từ sữa được tách ra theo ví dụ của sáng chế có khả năng tái tạo tế bào da hay không.

Ví dụ thử nghiệm 8-1: Đánh giá khả năng tăng sinh tế bào da

Cụ thể, tế bào sừng HaCaT của người là loại tế bào da, và HDF được sử dụng trong ví dụ thử nghiệm 5 ở trên đã được gây mầm ở nồng độ 1×10^4 tế bào trên mỗi giếng, và được điều trị bằng các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm hoặc exosomes có nguồn gốc từ sữa non ở 0,2 mg/ml, và sau 48 giờ, các tế bào được đếm để đo mức độ tăng sinh tế bào. Đối chứng chỉ được điều trị bằng lượng nước muối tương đương (tham chiếu trên các Fig.12a và Fig.12b).

Như được thể hiện trên Fig.12a và Fig.12b, kết quả cho thấy rằng các exosome có nguồn gốc từ sữa theo ví dụ của sáng chế đã tăng đáng kể về khả năng tăng sinh ở cả các tế bào da so với đối chứng. Cụ thể, nhận thấy rằng các exosome có nguồn gốc từ sữa non cho thấy khả năng tăng sinh tế bào da tuyệt vời hơn so với các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm.

Ví dụ thử nghiệm 8-2: Đánh giá sự di chuyển của tế bào da

Trong quá trình tái tạo da, sự di chuyển của các tế bào da được biết đến là đóng vai trò quan trọng nhất. Do đó, các tác giả sáng chế đã thực hiện thử nghiệm vết thương xước để xác định ảnh hưởng của các exosome có nguồn gốc từ sữa được tách ra theo ví dụ của sáng chế đối với sự di chuyển của tế bào.

Cụ thể, tế bào sừng của người HaCaT và HDF được nuôi cấy cho đến khi đạt được 80% hợp lưu trong đĩa 100 mm tại thời điểm nuôi cấy thứ cấp lần thứ 7. Tâm giếng trong đĩa 24 giếng được đánh dấu và thêm dung dịch gelatin 0,1%. Đĩa được ủ ở 37°C trong 2 giờ và tráng bằng DPBS một lần, để chuẩn bị đĩa 24 giếng tráng gelatin. Các tế bào được phân lập bằng cách sử dụng 0,25% trypsin-EDTA và được gây mầm trong đĩa tráng với nồng độ 9×10^4 tế bào trên mỗi giếng. Các tế bào được nuôi cấy ở 37°C qua đêm, sau đó tạo vết xước trên tế bào bằng cách sử dụng đầu pipet 200 μL , và các giếng được rửa hai lần bằng DPBS để loại bỏ các mảnh vụn. Sau đó, 1 mL môi trường chứa 0,5% FBS được thêm vào mỗi giếng, và hình ảnh được chụp bằng kính hiển vi (Leica, Wetzlar, Đức) để đo thời gian xước 0 giờ. Tiếp theo, ngoại trừ các nhóm sau [đối chứng

dương tính (10% FBS DMEM 1 mL, đối chứng âm tính (0,5% FBS DMEM 1 mL), EGF (10 ng/mL, EGF 0,5% FBS DMEM 1 mL)], 800 μ L môi trường chứa 0,5% FBS được thay thế trong mỗi giếng. Các exosome được phân lập tương ứng trong ví dụ 1 và ví dụ 2 được đặt trong tấm chèn nuôi cấy tế bào màng, và 200 μ L môi trường có chứa 1% FBS trong DMEM được thêm vào tấm chèn. Sau khi nuôi cấy tế bào ở 37°C trong 8 giờ, các phân bị trầy xước đã được chụp ảnh. Chiều rộng vết xước được đo bằng phần mềm Image-Pro Plus (Media Cybernetics, USA) và được tính toán theo Công thức 1 bên dưới.

Phương trình 1

Vùng vết thương tương đối = $\{(A_0 - A_t)/A_0\}$ /Giá trị kết quả của đối chứng âm

(Trong phương trình, A_0 là vùng vết thương ban đầu và A_t là vùng vết thương sau 48 giờ.)

Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.13, các exosome có nguồn gốc từ sữa theo ví dụ của sáng chế đã làm tăng sự di chuyển của các tế bào da so với các nhóm đối chứng. Cụ thể, phát hiện ra rằng các exosome có nguồn gốc từ sữa non làm tăng đáng kể sự di chuyển của các tế bào da so với các exosome có nguồn gốc từ sữa. Tuy nhiên, vì sữa thương phẩm có thể có lợi thế hơn về nguồn cung cấp nguyên liệu và chi phí, những phát hiện này không làm giảm lợi ích của các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm làm nguyên liệu cho mỹ phẩm chức năng.

Ví dụ thử nghiệm 8-3: Phân tích tốc độ hình thành ống bởi các tế bào nội mô mạch máu

Các tác giả sáng chế đã xử lý các tế bào nội mô có nguồn gốc từ chuột (SVEC4-10) bằng các exosome có nguồn gốc từ sữa non, sữa thương phẩm và từ huyết thanh ở nồng độ 200 μ g/ml, và so sánh mức độ hình thành mạch giữa mỗi nhóm.

Trước tiên, để cho phép sự hình thành ống trong các tế bào nội mô, Matrigel (Corning # 356237) đóng vai trò là chất nền ngoại bào đã được nhỏ giọt vào một đĩa 96 giếng với 50 μ L và được để cứng ở 37°C trong khoảng 30 phút. Sau đó, các tế bào được xử lý bằng exosome được gắn vào đó và được nuôi cấy trong khoảng 8 giờ. Tại đây, mức độ hình thành ống được quan sát và so sánh bằng cách sử dụng hình ảnh kính hiển vi (DIC), các điểm nhánh mà ba hoặc nhiều ống gặp nhau, và chiều dài ống được số hóa và thể hiện dưới dạng đồ thị (tham chiếu trên Fig.14).

Theo kết quả của phép đo, như có thể thấy trên Fig.14, các nhóm được điều trị bằng exosome có nguồn gốc từ sữa, chẳng hạn như sữa thương phẩm và sữa non, cho thấy mức độ hình thành ống cao hơn so với nhóm đối chứng không được điều trị, và nhóm exosome có nguồn gốc từ huyết thanh cho thấy kết quả không khác biệt đáng kể và tương tự so với nhóm đối chứng. Từ đây, có thể khẳng định rằng các exosome có nguồn gốc từ sữa theo ví dụ của sáng chế đẩy nhanh quá trình hình thành mạch máu và do đó, có thể được sử dụng một cách thuận lợi để chữa lành vết thương.

Ví dụ thử nghiệm 8-4: Khẳng định sự phân bố *in vivo* của các exosome sữa thông qua hình ảnh *in vivo*

Các tác giả sáng chế đã phân tích sự phân bố *in vivo* của các exosome sữa non được sử dụng thông qua hình ảnh *in vivo* (IVIS) của chuột.

Các exosome sữa non được điều chỉnh đến nồng độ 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bằng cách sử dụng dung dịch đệm PBS và 1 μl este Flamma 675 NHS (BioActs # PWS1515) được thêm vào mỗi 100 μl exosome và được dán nhãn ở 4°C qua đêm. Sau đó, các nguyên liệu nhuộm không dính vào exosome được loại bỏ bằng cách thực hiện ngất không khí hai lần mỗi giờ. 100 μg exosome trên một con chuột được tiêm dưới da vào đùi trên bên trái của con chuột, và hình ảnh *in vivo* được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống hình ảnh *in vivo* IVIS® (PerkinElmer, Hoa Kỳ) vào cùng một thời điểm mỗi ngày trong 7 ngày kể từ ngày tiêm (tham chiếu trên Fig.15a). Tại đây, vào ngày thứ hai, năm cơ quan và mô da đã được lấy ra và mức độ phân bố của các exosome sữa non cho từng cơ quan được xác định (tham chiếu trên các Fig.15b và Fig.15c). Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.15a, thấy rằng hầu hết các exosome sữa non ra khỏi cơ thể sau 3 ngày, và mất khoảng 7 ngày để ra khỏi cơ thể hoàn toàn. Kết quả của việc mổ lấy nội tạng, như thể hiện trên các Fig.15b và Fig.15c, cường độ huỳnh quang cao nhất được phát hiện ở da, tiếp theo là gan, phổi và thận theo thứ tự. Từ kết quả này, cũng có thể khẳng định rằng exosome sữa non sau khi lưu lại trong cơ thể sẽ được đào thải khỏi cơ thể qua thận.

Ví dụ thử nghiệm 8-5: Phân tích hiệu quả sử dụng động vật mô hình vết thương

Các tác giả sáng chế đã tiến hành mô hình hóa động vật bị thương để khẳng định tác dụng tái tạo mô da thực tế của các exosome có nguồn gốc từ sữa.

Làm động vật, những con chuột đực Balb/c 7 tuần tuổi được sử dụng và vết thương được tạo ra trên lưng bằng cách sử dụng lỗ sinh thiết da đường kính 8 mm. Các nhóm

thử nghiệm được chia thành tổng cộng 5 loại (đối chứng, huyết thanh, sữa thương phẩm, sữa non và sữa non 4 ngày), và dựa trên kết quả phân phối *in vivo* của ví dụ thử nghiệm 8-4, các exosome được sử dụng bằng cách tiêm dưới da cách nhau 3 ngày. Ngoại trừ nhóm sữa non 4 ngày, bốn nhóm còn lại được sử dụng các chất tương ứng vào ngày 1, 4 và 7, và nhóm sữa non 4 ngày được sử dụng với các exosome sữa non vào ngày 4, 7 và 10. Tại đây, nồng độ của chất được sử dụng là 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, và tổng thể tích 100 μl được sử dụng cho mỗi con vật, và sự tiến triển được quan sát trong khoảng 25 ngày (tham chiếu trên Fig.16).

Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.16, các vết thương trên da được tái tạo nhanh đáng kể ở nhóm được sử dụng các exosome sữa non và nhóm sữa non 4 ngày, và cụ thể, nhóm sữa non 4 ngày cho thấy tốc độ tái tạo nhanh hơn các nhóm khác trong khoảng thời gian từ ngày 4 đến ngày 10. Tiếp theo nhóm được điều trị bằng sữa non, da được tái tạo theo thứ tự của nhóm được điều trị bằng các exosome sữa thương phẩm, nhóm đối chứng được điều trị bằng PBS, và nhóm được điều trị bằng các exosome có nguồn gốc từ huyết thanh, và từ đây, khẳng định rằng các exosome có nguồn gốc từ sữa có tác dụng tái tạo da cao hơn so với các nhóm thử nghiệm khác.

Ví dụ thử nghiệm 8-6: Phân tích hóa mô miễn dịch

Sau các thử nghiệm mô hình vết thương trên động vật, các tác giả sáng chế đã thực hiện phương pháp hóa mô miễn dịch để phân tích mô.

Cụ thể, sau khi giết chết những con chuột vào ngày thứ 25 của thử nghiệm trên động vật, các mô vết thương được cắt bỏ và để trong dung dịch cố định qua đêm để cố định các mô. Để thấm parafin vào các mô, quá trình khử nước được thực hiện tuần tự từ xylen đến etanol 100%, 90%, 80% và 70%, sau đó nhúng với parafin để tạo khối. Sử dụng máy cắt lát mô, phần mô parafin dày 6 μm được chuẩn bị và kiểm tra theo phương pháp thử nghiệm được cung cấp bởi bộ kit DAB (Abcam # ab64264). Đầu tiên, sau khi loại bỏ thành phần parafin khỏi các mô trên các phiến kính và tạo ra phản ứng với dung dịch đệm chặn hydro peroxidaza trong 10 phút ở nhiệt độ phòng, các phiến kính được đun sôi ở 95°C trong 10 phút trong dung dịch phục hồi để phá vỡ liên kết chéo giữa các protein. Sau đó, sau khi tạo phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 10 phút với dung dịch đệm chặn protein, các phiến kính được xử lý bằng kháng thể kháng elastin chính (santacruz # sc-58756) và để phản ứng ở 4°C qua đêm. Vào ngày hôm sau, dung dịch kháng thể

kháng nguyên của dê được đánh dấu biotin và dung dịch streptavidin-peroxit được thêm vào và để phản ứng trong 10 phút ở nhiệt độ phòng, sắc ký DAB và chất nền DAB được trộn theo tỷ lệ 1:50 và đặt trên các phiến kính lát mô được xử lý bằng kháng thể, và quan sát sự thay đổi màu sắc trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng, phản xạ nhuộm được thực hiện để nhuộm hạt nhân, và các phiến kính được gắn bằng toluen.

Kết quả của việc kiểm tra các mô bằng kính hiển vi, như được thể hiện trên Fig.17, thấy rằng, so với các nhóm khác, màu nâu sẫm hơn được biểu hiện trong các mô của nhóm được điều trị bằng các exosome sữa non, cụ thể là trong số các exosome có nguồn gốc từ sữa, và điều này có thể kết luận rằng thành phần elastin là nhiều nhất được phát hiện trong các mô của nhóm cụ thể này. Ngoài ra, tác dụng tăng cường biểu hiện elastin của các exosome sữa có liên quan chặt chẽ đến tác dụng giảm nếp nhăn được mô tả dưới đây.

Ví dụ thử nghiệm 9: Phân tích hiệu quả giảm nếp nhăn

Colagen là thành phần chính của chất nền ngoại bào của lớp hạ bì, thường được tái tạo bởi các enzym hình thành colagen sau khi bị phá vỡ trong chu kỳ tái tạo da, và sự hình thành các nếp nhăn trên da là triệu chứng biểu hiện do quá trình sinh tổng hợp colagen không thành công mà không thể khôi phục chất nền ngoại bào của lớp hạ bì. Trong hoàn cảnh này, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu bằng cách đo mức độ ức chế sự biểu hiện của colagenaza, metalloproteinaza 2 (MMP-2) và tăng cường sinh tổng hợp colagen, như là biện pháp giảm nếp nhăn trên da.

Cụ thể, để đạt được điều này, các tác giả sáng chế đã gây mầm nguyên bào sợi da người (HDF) trong đĩa đáy thủy tinh 35đ (3 x 10⁵ tế bào) và được nuôi cấy trong 24 giờ trong tủ ấm 37°C và 5% CO₂. Sau đó, 24 giờ sau khi xử lý với các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm và các exosome có nguồn gốc từ sữa non được tách trong ví dụ 1 và ví dụ 2 ở nồng độ 0,1 mg/ml, tương ứng, protein colagen loại 1 được nhuộm bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang và được kiểm tra bằng phương pháp kính hiển vi huỳnh quang, và mức độ biểu hiện protein của metalloproteinaza 2 được đo bằng Westen blot. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.18a và Fig.18b, nhận thấy rằng mức độ biểu hiện của protein colagen loại 1 tăng lên và mức độ biểu hiện của protein MMP-2 giảm trong HDF được xử lý bằng các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm và các exosome sữa non, và phát hiện này, được thực hiện cùng với kết quả của ví dụ thử

thí nghiệm 8-6, cho thấy rằng các exosome của sữa có hiệu quả giảm nếp nhăn da tuyệt vời.

Ví dụ thử nghiệm 10: Phân tích hoạt tính làm trắng

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu sự ức chế tạo hắc tố, là chỉ số điển hình của hoạt tính làm trắng, để khẳng định xem các exosome có nguồn gốc từ sữa theo ví dụ của sáng chế có hoạt tính làm trắng da hay không.

Cụ thể, các tác giả sáng chế đã tìm cách khẳng định tác dụng giảm sắc tố melanin bằng cách đo lượng sắc tố melanin được tạo ra trong B16F10, tế bào u ác tính của chuột, sau khi được xử lý bằng các exosome sữa (các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm và các exosome sữa non). Với nhóm đối chứng, các exosome được phân lập từ các tế bào B16F10 đã được sử dụng. Tế bào B16F10 được xử lý bằng các exosome tương ứng ở các nồng độ 0 mg/ml, 0,002 mg/ml, 0,005 mg/ml, 0,01 mg/ml và 0,2 mg/ml, và sau 24 giờ, các tế bào được kích thích bằng bức xạ cực tím. Sau đó, sau 24 giờ, sắc tố melanin được chiết xuất từ lượng tế bào tương ứng, và sắc tố melanin chiết xuất được đo và phân tích ở bước sóng 490 nm. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.19, so với nhóm đối chứng, không có sự khác biệt đáng kể trong lượng sắc tố melanin được tạo ra lên tới nồng độ exosome sữa non ở 0,002mg/ml, trong khi đó ở các nồng độ xử lý của exosome sữa non từ 0,0005 mg/ml đến 0,02 mg/ml, tác động giảm sắc tố melanin đã được quan sát thấy. Ngoài ra, B16F10 được xử lý bằng các exosome chiết xuất từ B16F10, các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm và các exosome sữa non ở nồng độ 0,1 mg/ml để so sánh lượng sản xuất melanin sau 24 giờ (c trong Fig.19). Kết quả là, sự sụt giảm lớn nhất trong số lượng sản sinh melanin được quan sát thấy ở các tế bào được điều trị bằng các exosome sữa cả khi tế bào được kích thích bằng tia cực tím và khi không có kích thích.

Thí dụ thử nghiệm 11: Phân tích hoạt tính chức năng miễn dịch

Các tác giả sáng chế đã phân tích xytokin trong môi trường nuôi cấy tế bào sau khi xử lý BMDM (đại thực bào có nguồn gốc từ tủy xương) với 50 µg/ml exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm và các exosome sữa non.

Cụ thể, các tác giả sáng chế đã sử dụng 1 ml môi trường nuôi cấy tế bào để phân tích xytokin trong môi trường nuôi cấy tế bào, và sử dụng phương pháp thử nghiệm được cung cấp trong bộ kit xét nghiệm xytokin (ARY006). Trước tiên, màng mà các kháng thể ban đầu chống lại các xytokin khác nhau được liên kết bị chặn trong 30 phút

ở nhiệt độ phòng bằng dung dịch đệm chặn, sau đó 1 ml môi trường nuôi cấy tế bào được đưa vào màng và để phản ứng ở 4°C qua đêm. Sau đó, màng được xử lý bằng hỗn hợp kháng thể thứ cấp liên hợp với biotin và để phản ứng ở 4°C qua đêm, tiếp theo là phản ứng với HRP-streptavidin ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, và kết quả của nó được hiển thị bằng hiện tượng phát quang hóa học (Bio- Rad). Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.20, trong các nhóm được điều trị bằng sữa thương phẩm và sữa non, sự biểu hiện của CD54, CXCL1, CCL3, CCL5 và TNF- α , là những yếu tố liên quan đến sự kích hoạt tế bào T và tế bào đuôi gai và phản ứng viêm, được phát hiện là tương đối cao so với nhóm đối chứng chưa được điều trị. Kết quả này chỉ ra rằng các exosome sữa theo ví dụ của sáng chế sẽ kích hoạt khả năng miễn dịch.

Ví dụ thử nghiệm 12: Phân tích khả năng tăng cường sự biểu hiện của các yếu tố tăng trưởng

Các tác giả sáng chế đã xử lý các nguyên bào sợi NIH-3T3 bằng các exosome có nguồn gốc từ sữa và các exosome sữa non có bán trên thị trường với nồng độ tương ứng là 100 $\mu\text{g/ml}$, và sau 24 giờ, đã phân tích mức độ biểu hiện của các yếu tố tăng trưởng khác nhau từ môi trường nuôi cấy tế bào và các tế bào ly giải. Đối với thí nghiệm, 500 μg tế bào ly giải được điều chế dựa trên lượng protein tương đương, và môi trường nuôi cấy tế bào được thêm vào cho đến khi tổng thể tích của dung dịch mẫu đạt 1 ml. Phân tích mức độ biểu hiện của protein được thực hiện theo phương pháp thử nghiệm được cung cấp trong bộ kit xét nghiệm yếu tố tăng trưởng (RayBiotech # AAM-GF-3-4). Trước tiên, màng mà các kháng thể chính chống lại các yếu tố tăng trưởng được liên kết với nhau được xử lý bằng dung dịch đệm chặn ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, và 1 ml mẫu đã điều chế được thêm vào đó và được cho phép để phản ứng ở 4°C qua đêm. Vào ngày hôm sau, màng được tráng đủ và sau đó được xử lý bằng hỗn hợp kháng thể thứ cấp được đánh dấu sinh học và để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, tiếp theo là phản ứng với HRP-streptavidin ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, và kết quả của nó là hình ảnh hóa bằng phát quang hóa học (Bio-Rad). Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.21, trong các nhóm thử nghiệm được xử lý bằng các exosome được tách ra từ sữa thương phẩm và các exosome sữa non, HGF, IGF-1, PDGF-AA và VEGF-A, có liên quan đến phản ứng chống viêm và tái tạo mô hoặc hình thành mạch, được biểu hiện ở mức cao hơn so với trong nhóm đối chứng.

Ví dụ thử nghiệm 13: Phân tích sự tăng sinh của tế bào gan

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu hoạt động của các tế bào gan có nguồn gốc từ con người để đánh giá hiệu quả của các exosome có nguồn gốc từ sữa theo ví dụ của sáng chế làm nguyên liệu thô cho loại thực phẩm chức năng để cải thiện sức khỏe của gan.

Tế bào gan có nguồn gốc từ người được cấy vào đĩa 96 giếng ở nồng độ 1×10^4 tế bào trên mỗi giếng, và được nuôi cấy trong 24 giờ trong tủ ấm ở 37°C và nồng độ CO_2 là 5%. 0,2 mg/ml exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm và sữa non, đã được tách tương ứng trong ví dụ 1 và ví dụ 2, được thêm vào và nuôi cấy trong môi trường DMEM không có huyết thanh trong 24 giờ, và sự tăng sinh của tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng xét nghiệm CCK-8 (Công nghệ phân tử Dojindo, Nhật Bản). Đối chứng chỉ được xử lý bằng lượng nước muối tương đương. 10 μl dung dịch xét nghiệm CCK-8 được thêm vào mỗi giếng, và sau khi nuôi cấy trong 4 giờ, các giá trị độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm được đo và so sánh.

Ví dụ thử nghiệm 14: Phân tích tác dụng ngăn ngừa rụng tóc và kích thích sự phát triển tóc và mọc tóc

Ví dụ thử nghiệm 14-1: Phân tích sự hấp thụ exosome sữa bởi các tế bào nhú hạ bì

Đối với các exosome sữa theo ví dụ của sáng chế để có thể thể hiện tác dụng ngăn ngừa hoặc điều trị đối với chứng rụng tóc, các exosome sữa cần thể hiện hoạt động tăng sinh tế bào nhú ở da, hoạt động này sẽ được hấp thụ bởi tế bào nhú ở da, là những tế bào giúp mọc tóc, và thúc đẩy sự tăng sinh. Trong tình huống này, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu xem các exosome sữa theo ví dụ của sáng chế có được các tế bào nhú hạ bì sẵn sàng tiếp nhận trong quá trình nuôi cấy hay không.

Cụ thể, các tác giả sáng chế đã điều trị các tế bào nhú hạ bì của người trong môi trường nuôi cấy với 100 $\mu\text{g/ml}$ exosome chiết xuất từ sữa thương phẩm được đánh dấu bằng thuốc nhuộm huỳnh quang Cy5.5 trong 1 giờ, 4 giờ, 12 giờ và 24 giờ, và mức độ hấp thụ của tế bào được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang (tham chiếu trên Fig.22a). Kết quả là, như có thể thấy trên Fig.22a, xác nhận rằng các exosome sữa theo ví dụ của sáng chế được các tế bào nhú hạ bì của người dễ dàng tiếp nhận tương ứng với thời gian điều trị.

Ví dụ thử nghiệm 14-2: Phân tích sự tăng sinh tế bào nhú hạ bì

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu ảnh hưởng của các exosome có nguồn gốc từ sữa theo ví dụ của sáng chế đối với sự tăng sinh của các tế bào nhú hạ bì của người, để đánh giá tác động của việc cải thiện sức khỏe của tóc và giảm rụng tóc.

Cụ thể, để đạt được điều này, các tác giả sáng chế trước tiên xử lý các tế bào nhú hạ bì của người bằng 100 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$ và 500 $\mu\text{g/ml}$ exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm được điều chế trong ví dụ 1 trong 48 giờ, và các tế bào được đếm bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm được cung cấp trong bộ kit đếm tế bào-8 (CK04-20). 20 μl dung dịch phản ứng của bộ kit đếm tế bào được thêm vào 200 μl môi trường nuôi cấy tế bào, và được cho phép để phản ứng trong 30 phút ở điều kiện 37°C và 5% cacbon đioxit. Sau đó, các phép đo được thực hiện ở bước sóng 450 nm và được quan sát. Ngoài ra, các tế bào nhú hạ bì của người được sử dụng 100 μM chất gây rụng tóc (đihydrotestosteron, DHT) trong 24 giờ, và sau đó được xử lý với 500 $\mu\text{g/ml}$ exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm trong 48 giờ, và sau đó 20 μl dung dịch phản ứng của bộ kit đếm tế bào được thêm vào 200 μl dung dịch nuôi cấy tế bào và để phản ứng trong 30 phút ở điều kiện 37°C và 5% cacbon đioxit. Sau đó, các phép đo được thực hiện ở bước sóng 450 nm và được quan sát (tham chiếu trên Fig.22b). Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.22b, nhận thấy rằng nhóm được xử lý với 500 $\mu\text{g/ml}$ exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm đã tích cực gây ra sự tăng sinh tế bào, so với nhóm đối chứng không được xử lý. Trong khi đó, có thể thấy rằng nhóm được xử lý chỉ với chất làm giảm rụng tóc cho thấy hoạt động tăng sinh tế bào giảm so với nhóm đối chứng, nhưng hoạt động tăng sinh tế bào trở lại mức trước khi điều trị bằng DHT ở nhóm được điều trị với 500 $\mu\text{g/ml}$ exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm sau khi điều trị bằng chất gây rụng tóc. Điều này cho thấy rằng các exosome sữa theo ví dụ của sáng chế cũng có hiệu quả trong việc ngăn ngừa rụng tóc.

Ví dụ thử nghiệm 14-3: Phân tích hiệu quả thúc đẩy phát triển tóc và mọc tóc

Dựa trên kết quả của ví dụ thử nghiệm 14-2 bên trên, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu tác dụng kích thích mọc tóc và tác dụng mọc tóc bằng cách sử dụng động vật thử nghiệm để xác nhận xem các exosome sữa theo ví dụ của sáng chế có hiệu quả thúc đẩy phát triển tóc và mọc tóc cùng với việc ngăn ngừa rụng tóc hay không.

Cụ thể, các tác giả sáng chế đã cạo toàn bộ vùng lưng của chuột đực C57BL/6 7 tuần tuổi và bôi kem Veet và lau sạch phần lông còn lại bằng Kimtech (ngày 0), và từ

ngày 1, hàng ngày, 20 μ l exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm được sử dụng bằng cách tiêm trong da, trong tổng số 100 μ l (200 μ g), vào 5 vị trí ở giữa lưng (dọc theo cột sống). Sau đó, sự xuất hiện của lông được theo dõi mỗi 3-4 ngày. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.22c, thấy rằng lông phát triển với tốc độ nhanh hơn ở nhóm được sử dụng các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm theo ví dụ của sáng chế.

Do đó, có thể khẳng định rằng các exosome từ sữa theo ví dụ của sáng chế cũng có hiệu quả cao trong việc thúc đẩy sự phát triển của tóc và mọc tóc, cũng như ngăn ngừa rụng tóc.

Ví dụ điều chế 1: Nước dưỡng ẩm

Nước dưỡng ẩm chứa các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm hoặc sữa non thu được theo ví dụ của sáng chế được điều chế bằng cách trộn theo tỷ lệ thành phần được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

Tỷ lệ trộn nước dưỡng ẩm

Thành phần	Hàm lượng (đơn vị: Wt%)
Exosome có nguồn gốc từ sữa	0,5
Glyxeryl stearat SE	1,5
Rượu xetearyl	1,5
Lanolin	1,5
Polysorbat 60	1,3
Sorbitan stearat	0,5
Dầu cọ hydro hóa	4,0
Dầu khoáng	5,0
Trioctanoin	2,0
Dimeticon	0,8
Tocopherol axetat	0,5
Carboxy vinyl polyme	0,12
Glyxerin	5,0
1,3-butylen glycol	3,0
Natri hyaluronat	5,0
Trietanolamin	0,12
Uniside-U 13	0,02
Nước cất	Còn lại

Tổng	100
------	-----

Ví dụ điều chế 2: Kem dưỡng

Kem dưỡng có chứa các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm hoặc sữa non thu được theo ví dụ của sáng chế được điều chế bằng cách trộn các thành phần theo tỷ lệ được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

Tỷ lệ trộn kem dưỡng

Thành phần	Hàm lượng (đơn vị: Wt%)
Exosome có nguồn gốc từ sữa	0,5
Lipophilic glyxeryl monostearat	1,5
Rượu xetearyl	1,5
Axit stearic	1,0
Polysorbat 60	1,5
Sorbitan stearat	0,6
Isostearyl isostearat	5,0
Squalen	5,0
Dầu khoáng	35,0
Dimeticon	0,5
Hydroxyetyl xenluloza	0,12
Trietanolamin	0,7
Glyxerin	5,0
Uniside-U 13	0,02
Nước cất	Còn lại
Tổng	100

Ví dụ điều chế 3: Điều chế dầu gội để giảm rụng tóc

Dầu gội để giảm rụng tóc có chứa các exosome có nguồn gốc từ sữa non hoặc sữa thương phẩm thu được theo ví dụ của sáng chế, được điều chế bằng cách trộn các thành phần theo tỷ lệ trộn được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

Tỷ lệ trộn dầu gội để giảm rụng tóc

Thành phần	Hàm lượng (đơn vị: Wt%)
Exosome có nguồn gốc từ sữa	1,0

Natri lauret sulfat	0,7
Natri lauryl sulfat	0,7
Polyquaternium-7	1
Tơ thủy phân	0,5
Pantenol	1,0
Glyxerin	2,5
Cocamidopropyl betain	0,7
Polyquaternium-10	0,5
Etylhexylglyxerin	3,5
Đinatri EDTA	1,0
Axit citric	0,7
Butylen glycol	0,7
Phenoxyetanol	0,5
Chất tạo mùi	0,2
Nước cất	Còn lại
Tổng	100

Ví dụ điều chế 4: Điều chế thực phẩm chức năng cho sức khỏe (điều chế viên nang mềm)

Chế phẩm dạng viên nang mềm có chứa các exosome có nguồn gốc từ sữa non hoặc sữa thương phẩm thu được theo một ví dụ của sáng chế được điều chế bằng cách trộn theo tỷ lệ trộn được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây. Các thành phần trong các lượng dưới đây được trộn và đồng nhất và sau đó được cho vào viên nang mềm có trọng lượng xác định trước theo phương pháp đã biết.

Bảng 4

Điều chế viên nang mềm

Nguyên liệu	Hàm lượng (đơn vị: mg)
Các exosome có nguồn gốc từ sữa sấy đông khô	1000
Axit hyaluronic	75
Collagen peptit	75
Vitamin C	75
Vitamin B2	4
Vitamin B6	3
Tocopherol	50
Chất xơ	100

Dầu mầm lúa mạch	3.500
Sáp ong	500
Sáp	500

Có thể thấy rằng các exosome có nguồn gốc từ sữa thương phẩm và sữa non theo ví dụ của sáng chế không chỉ cho thấy năng suất cực kỳ cao so với các exosome có nguồn gốc từ các tế bào được nuôi cấy thông thường, mà còn cho thấy độ ổn định bảo quản mà các tế bào được nuôi cấy thông thường không có được, cũng như khả năng tái tạo tế bào da cực cao. Theo đó, các exosome có nguồn gốc từ sữa hoặc sữa non theo ví dụ của sáng chế có thể được sử dụng cực kỳ hiệu quả làm nguyên liệu thô cho mỹ phẩm chức năng tái tạo da. Mặc dù sáng chế được mô tả chi tiết dựa trên các ví dụ được mô tả ở trên, nhưng những ví dụ này chỉ là ví dụ minh họa, và những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật phải hiểu rằng có thể có nhiều sửa đổi khác nhau và các phương án khác tương đương từ đó. Do đó, phạm vi bảo hộ của sáng chế nên được xác định dựa trên các nguyên lý kỹ thuật của các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Chế phẩm mỹ phẩm tái tạo da theo ví dụ của sáng chế không chỉ có hiệu quả tái tạo da cao hơn đáng kể so với các exosome thông thường được phân lập từ môi trường nuôi cấy tế bào, mà còn có chi phí sản xuất thấp, hiệu suất cao đáng kể, và độ ổn định nguyên liệu cao, và do đó, có thể được sản xuất cực kỳ kinh tế. Theo đó, các exosome sữa theo ví dụ của sáng chế có thể được sử dụng để chữa lành vết thương, tăng cường chức năng miễn dịch, ngăn ngừa rụng tóc và điều chế được phẩm để mọc tóc và thúc đẩy sự phát triển của tóc, cũng như trong việc điều chế các mỹ phẩm chức năng khác nhau để giảm nếp nhăn hoặc làm trắng da.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Nước dưỡng ẩm chứa exosome từ sữa non bao gồm các thành phần dưới đây:

Thành phần	Hàm lượng (đơn vị: Wt%)
Exosome từ sữa non	0,5
Glyxeryl stearat SE	1,5
Rượu xetearyl	1,5
Lanolin	1,5
Polysorbat 60	1,3
Sorbitan stearat	0,5
Dầu cọ hydro hóa	4,0
Dầu khoáng	5,0
Trioctanoin	2,0
Dimeticon	0,8
Tocopherol axetat	0,5
Carboxy vinyl polyme	0,12
Glyxerin	5,0
1,3-butylen glycol	3,0
Natri hyaluronat	5,0
Trietanolamin	0,12
Uniside-U 13	0,02
Nước cất	Còn lại
Tổng	100

trong đó exosome từ sữa non làm thành phần hoạt tính và được tách bằng phương pháp này bao gồm bước ly tâm thứ nhất được thực hiện ở điều kiện nhiệt độ 4°C với lực ly tâm 5000 x g trong 30 phút để loại bỏ chất béo và các tế bào khỏi sữa non bằng cách ly tâm, bước lọc bằng bộ lọc để lọc sữa non đã ly tâm với màng lọc có kích thước mắt lưới 40µm để loại bỏ thêm chất béo và tế bào, bước pha loãng để pha loãng sữa non đã lọc bằng cách bổ sung lượng nước cất tương đương, bước kết tủa đẳng điện để điều chỉnh sữa non đã pha loãng đến độ pH 4,6 bằng axit HCl 6N để kết tủa casein trong sữa non đã pha loãng, bước ly tâm thứ hai được thực hiện ở nhiệt độ phòng với lực ly tâm 5000 x g trong 20 phút để loại casein đã được kết tủa và thu phần nổi phía trên, và bước lọc để lọc phần nổi thu được bằng màng lọc qua các màng lọc 0,8µm, 0,45µm và 0,2µm; và

trong đó nước dưỡng ẩm này dùng để tái tạo da, giảm nếp nhăn và làm trắng da.

2. Kem dưỡng chứa exosome từ sữa non bao gồm các thành phần dưới đây:

Thành phần	Hàm lượng (đơn vị: Wt%)
Exosome từ sữa non	0,5
Lipophilic glyxeryl monostearat	1,5
Rượu xetearyl	1,5
Axit stearic	1,0
Polysorbat 60	1,5
Sorbitan stearat	0,6
Isostearyl isostearat	5,0
Squalen	5,0
Dầu khoáng	35,0
Dimeticon	0,5
Hydroxyetyl xenluloza	0,12
Trietanolamin	0,7
Glyxerin	5,0
Uniside-U 13	0,02
Nước cất	Còn lại
Tổng	100

trong đó exosome từ sữa non làm thành phần hoạt tính và được tách bằng phương pháp này bao gồm bước ly tâm thứ nhất được thực hiện ở điều kiện nhiệt độ 4°C với lực ly tâm 5000 x g trong 30 phút để loại bỏ chất béo và các tế bào khỏi sữa non bằng cách ly tâm, bước lọc bằng bộ lọc để lọc sữa non đã ly tâm với màng lọc có kích thước mắt lưới 40µm để loại bỏ thêm chất béo và tế bào, bước pha loãng để pha loãng sữa non đã lọc bằng cách bổ sung lượng nước cất tương đương, bước kết tủa đẳng điện để điều chỉnh sữa non đã pha loãng đến độ pH 4,6 bằng axit HCl 6N để kết tủa casein trong sữa non đã pha loãng, bước ly tâm thứ hai được thực hiện ở nhiệt độ phòng với lực ly tâm 5000 x g trong 20 phút để loại casein đã được kết tủa và thu phần nổi phía trên, và bước lọc để lọc phần nổi thu được bằng màng lọc qua các màng lọc 0,8µm, 0,45µm và 0,2µm; và

trong đó kem dưỡng này dùng để tái tạo da, giảm nếp nhăn và làm trắng da.

FIG.1A

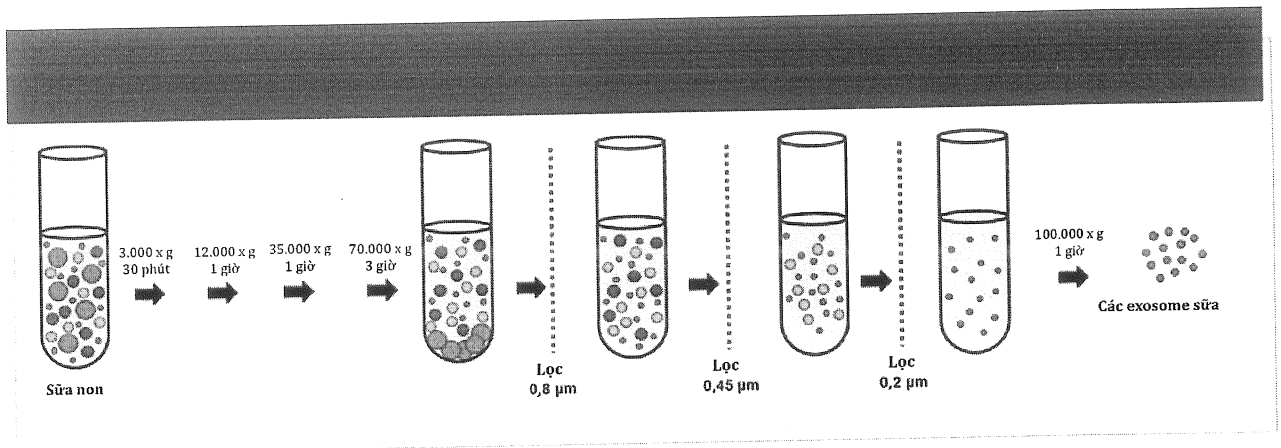


FIG.1B

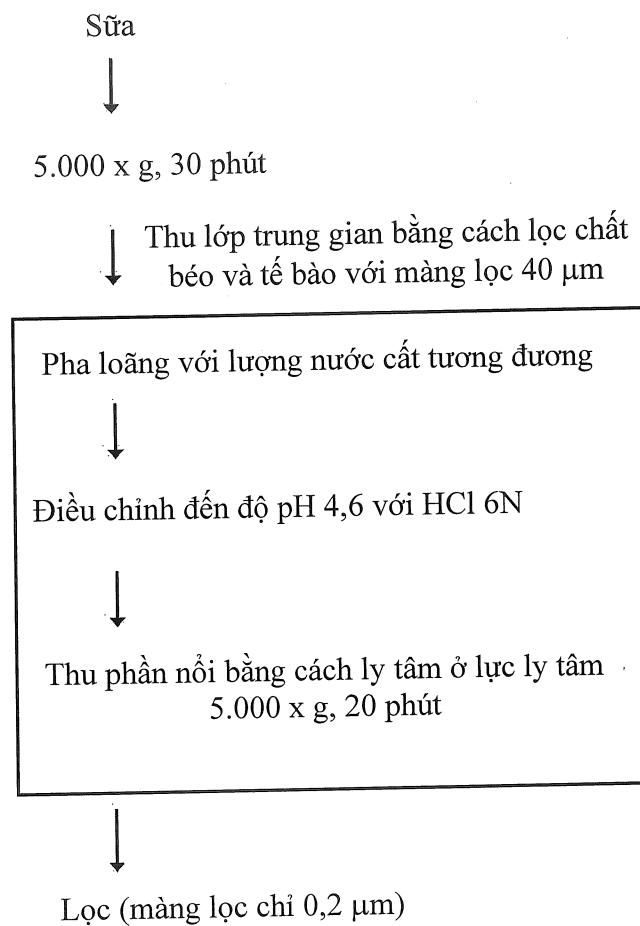


FIG.2A

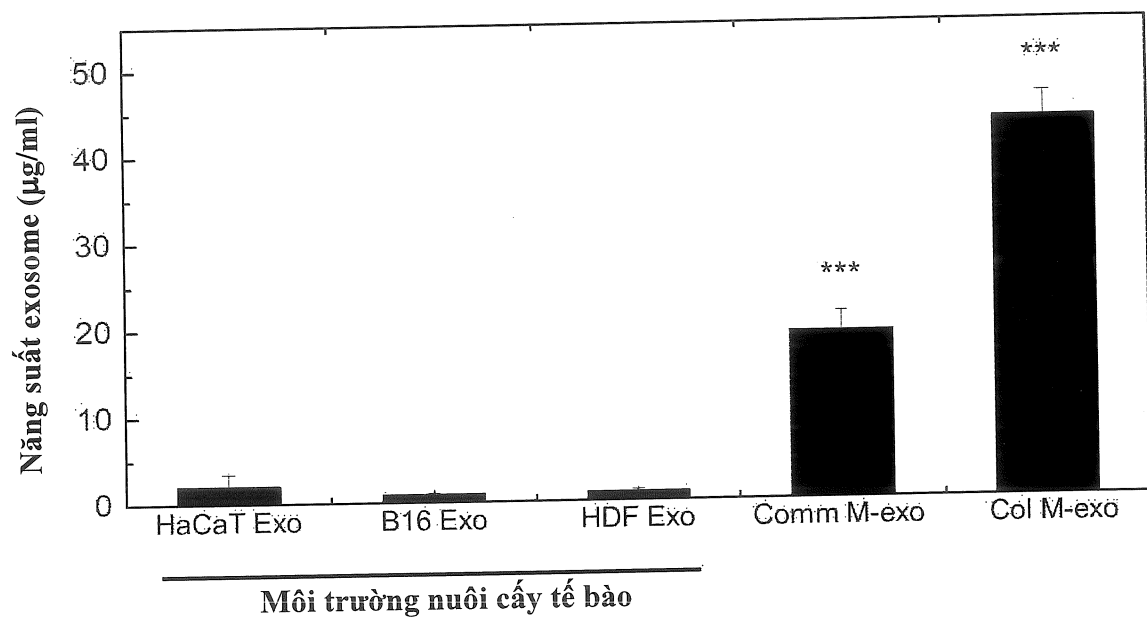


FIG.2B

So sánh năng suất bằng phương pháp chiết xuất

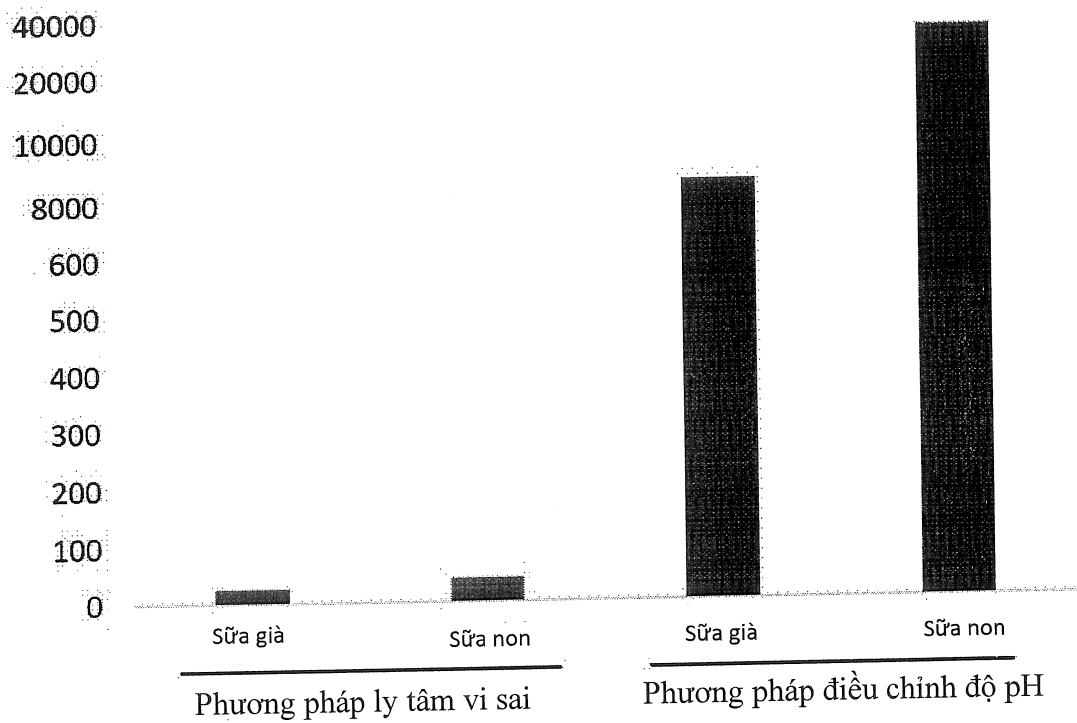


FIG.3

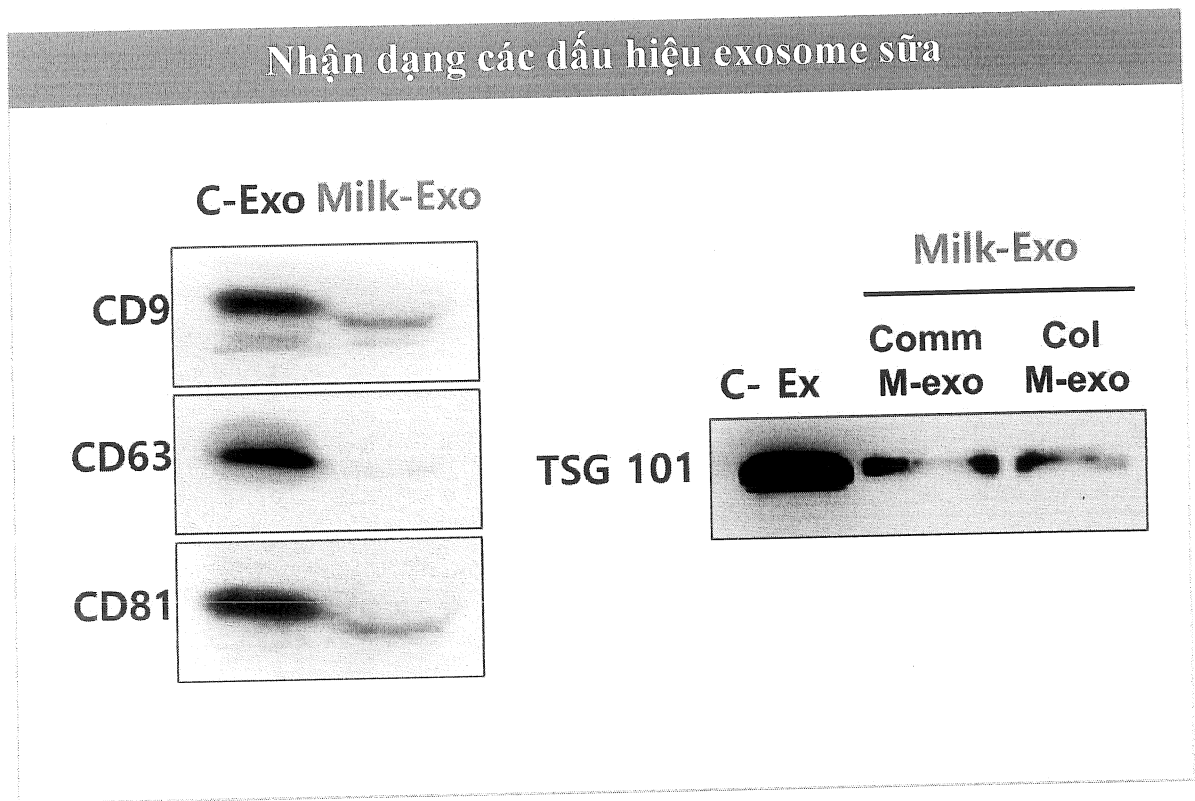


FIG.4

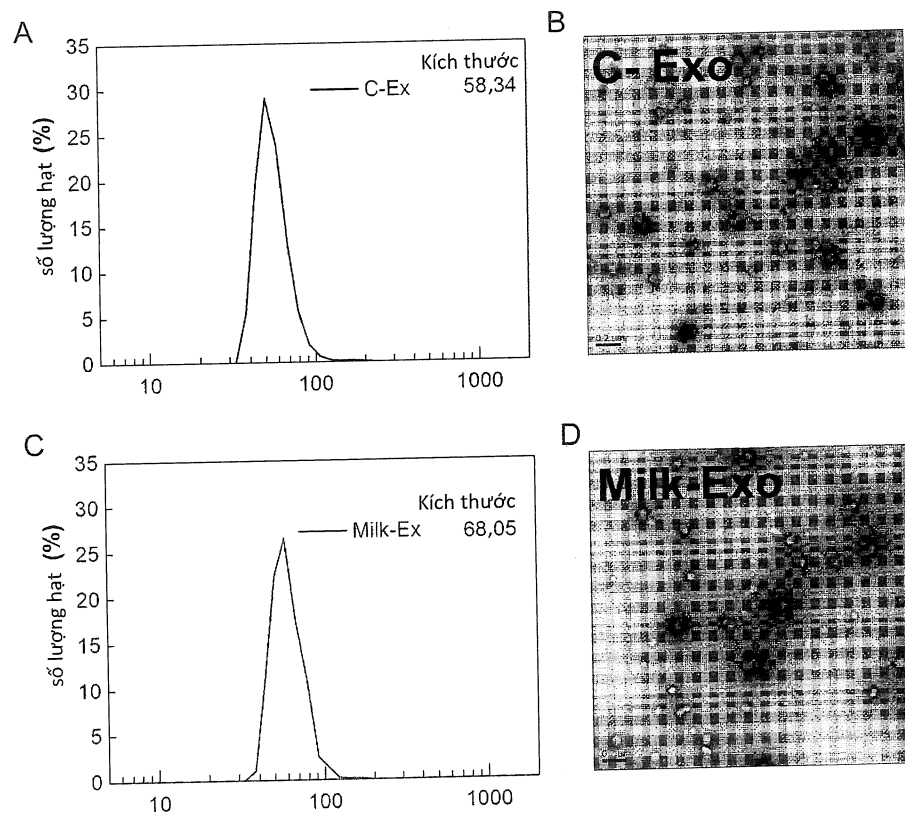
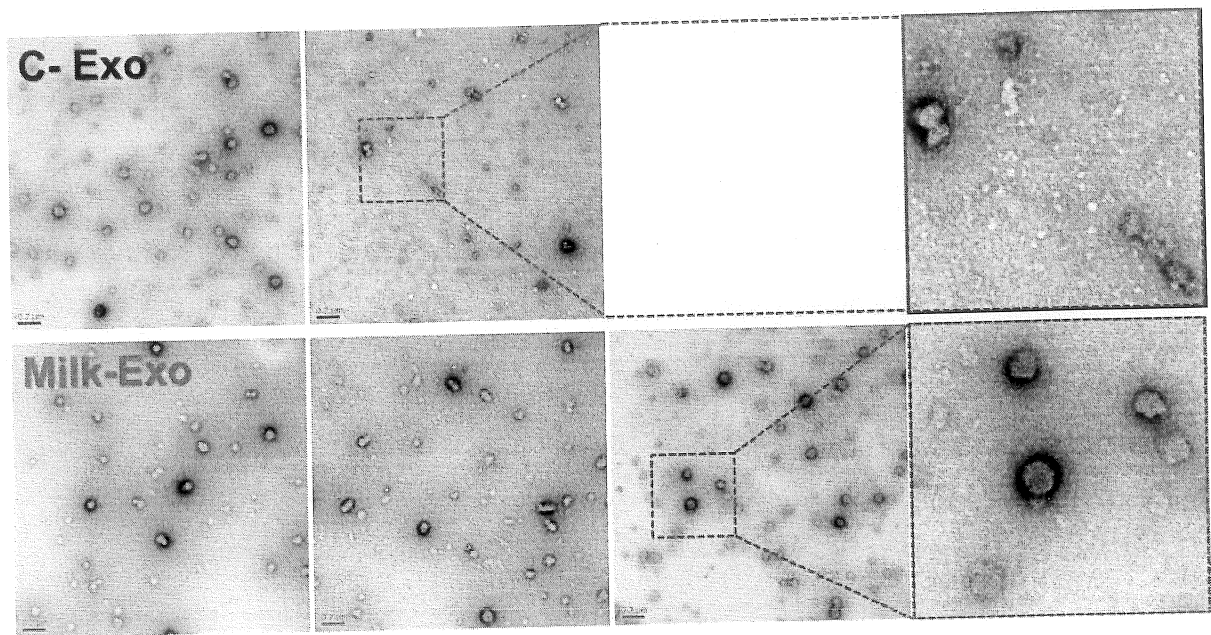


FIG.5



Điều kiện thử nghiệm: Đông lạnh ở -85°C , Rã đông ở nhiệt độ phòng

FIG.6

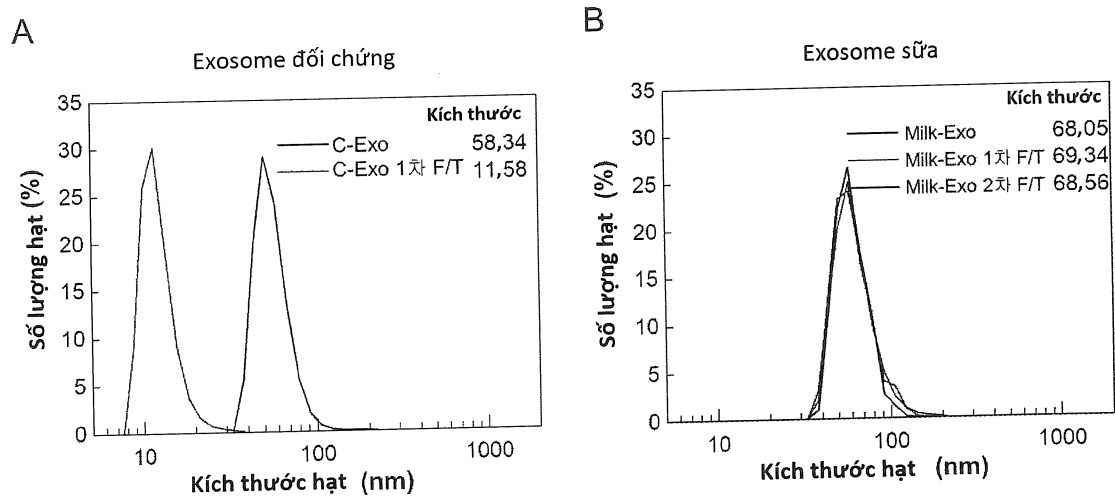


FIG.7A

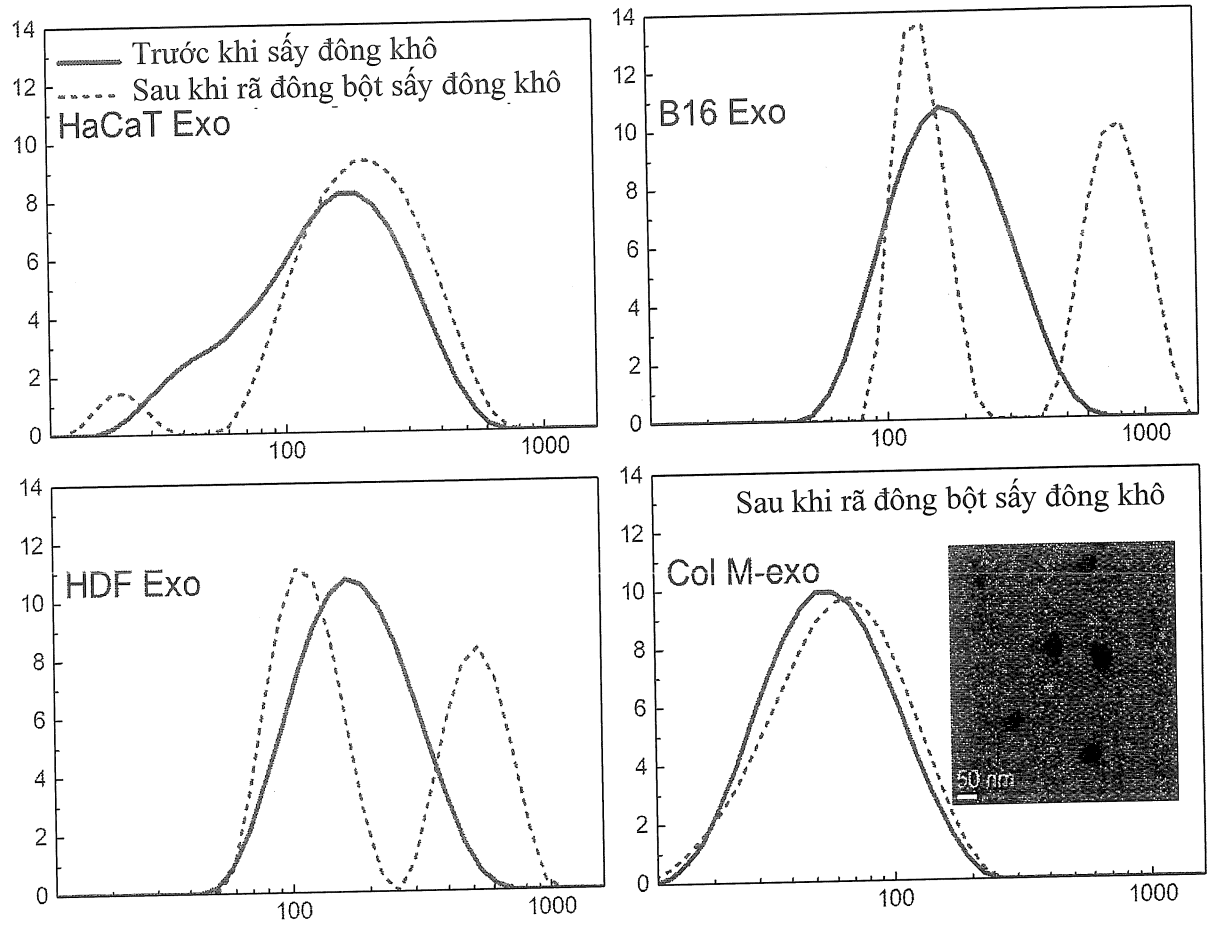


FIG.7B

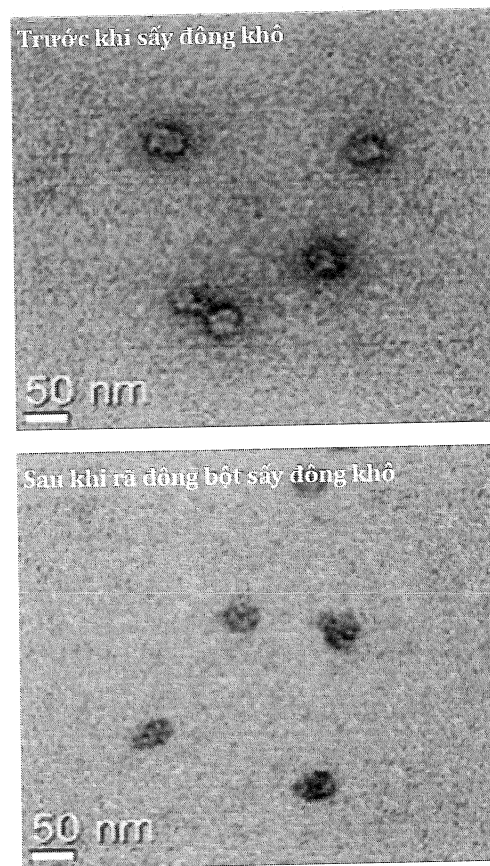
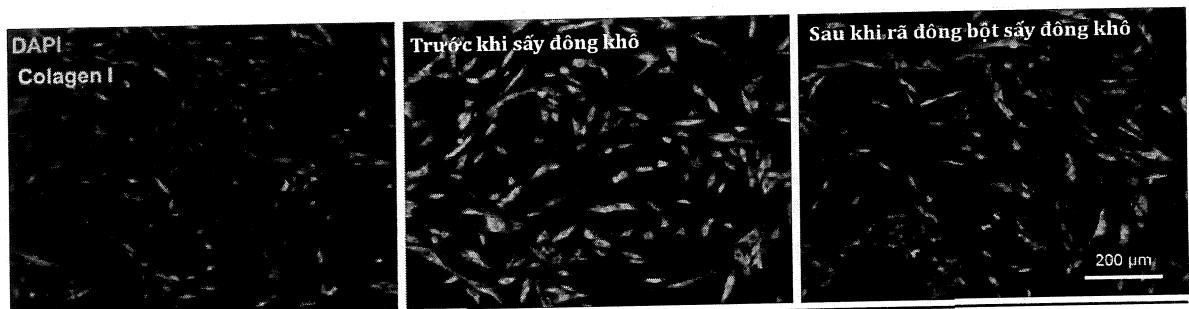


FIG.7C



Nước muối

Exosome sữa non

FIG.8

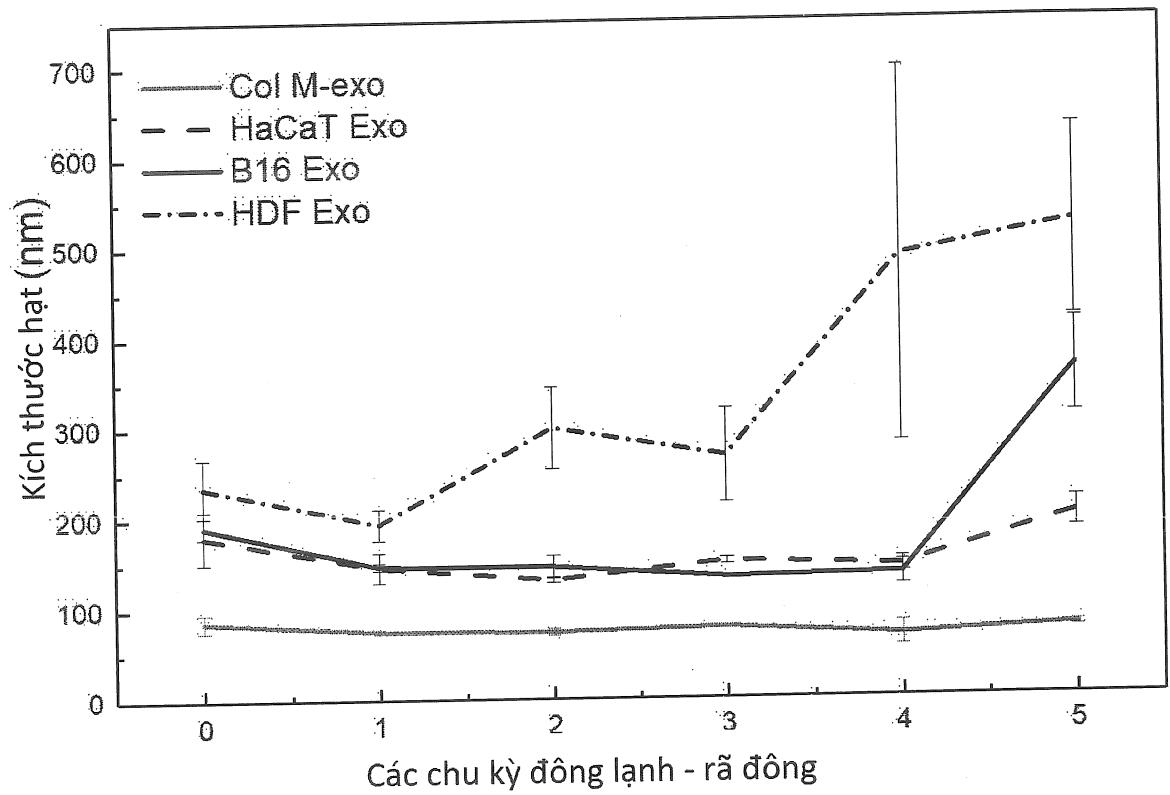


FIG.9

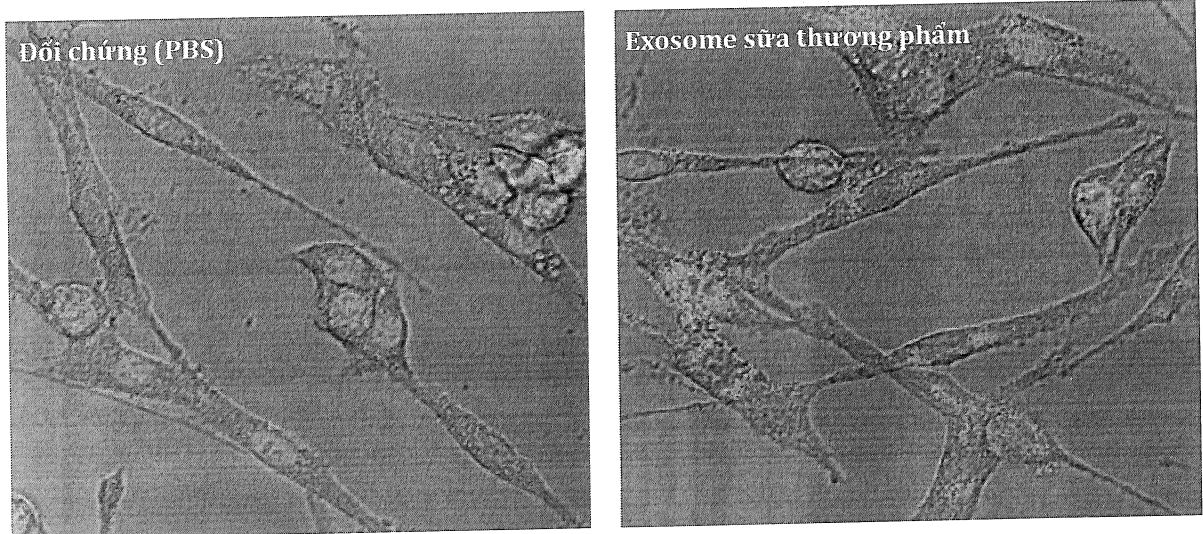


FIG.10

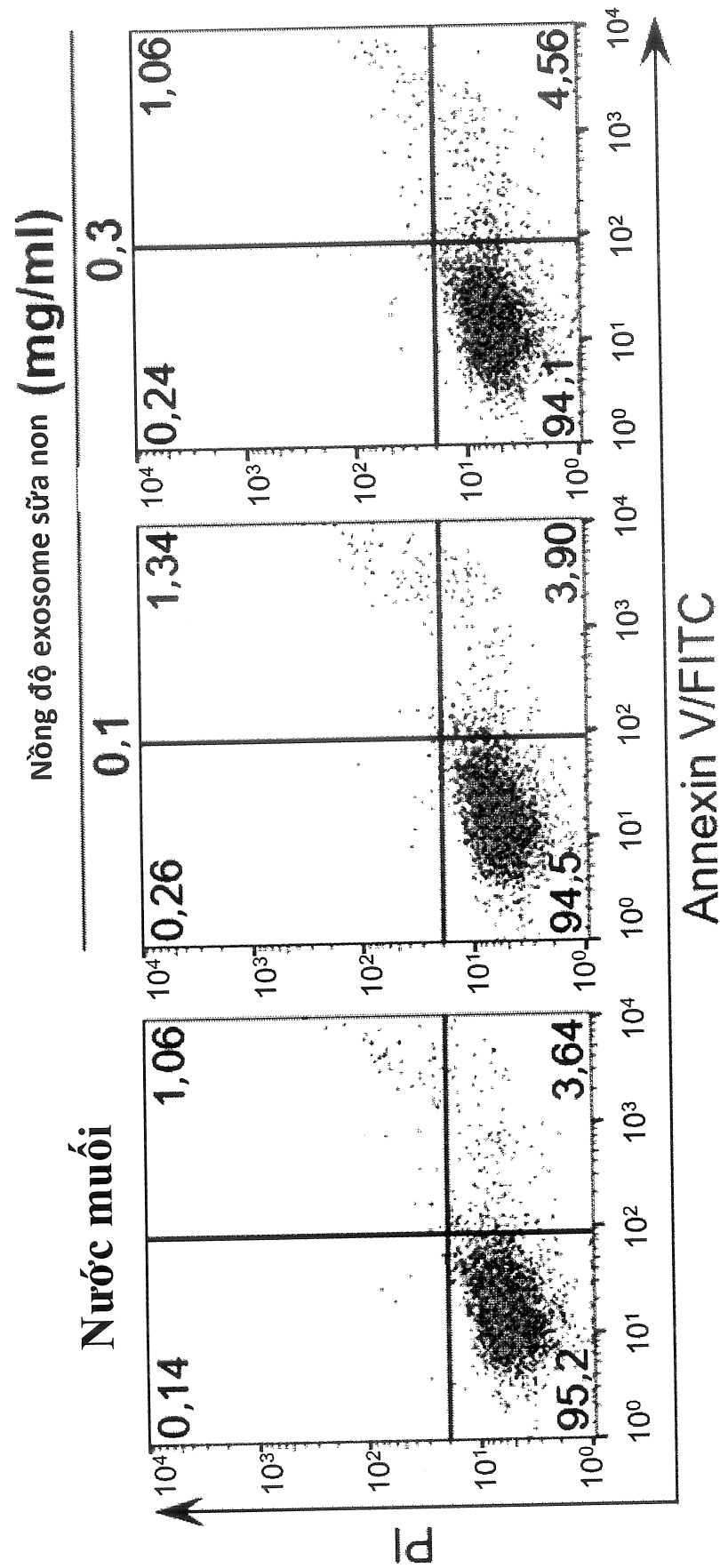


FIG.11A

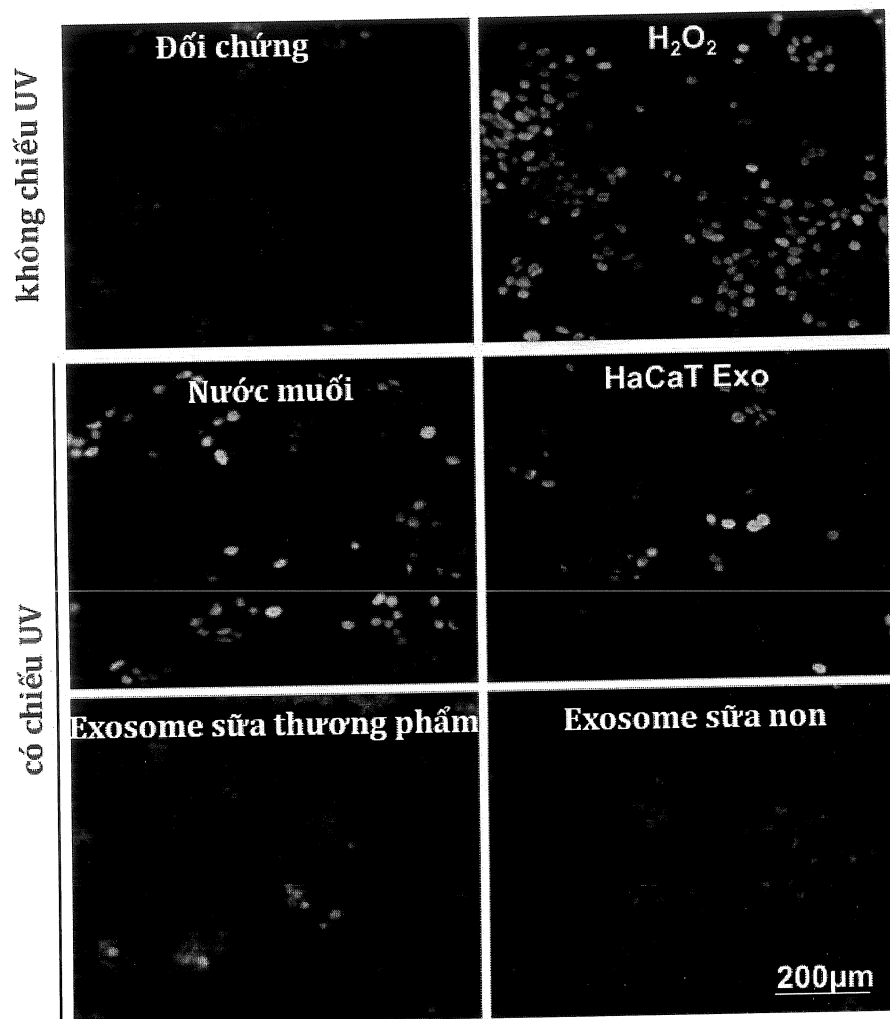


FIG.11B

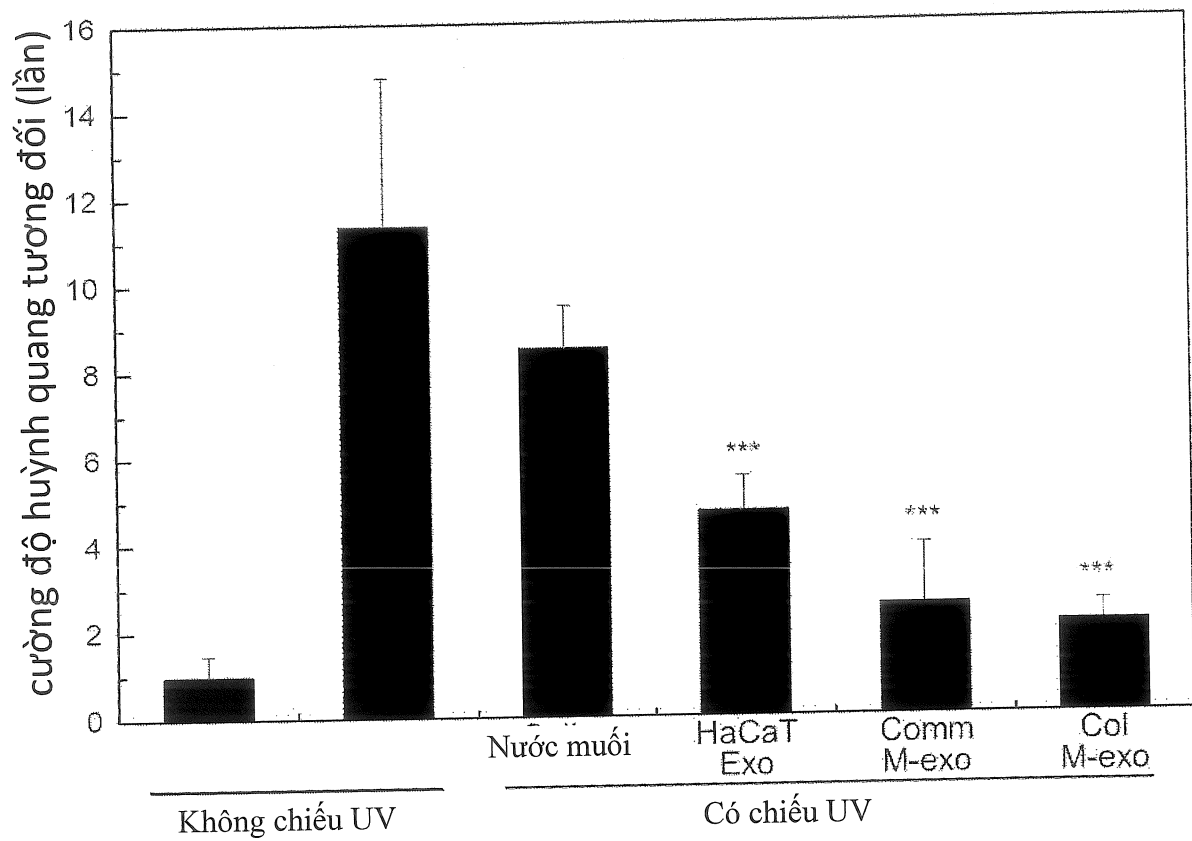


FIG.12A

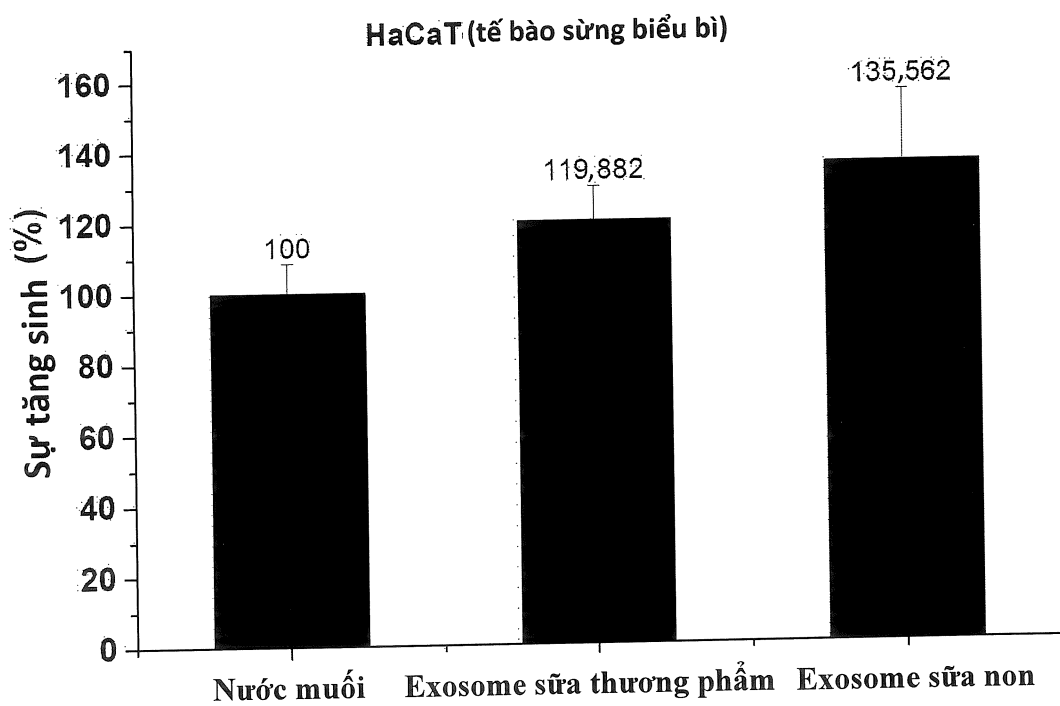


FIG.12B

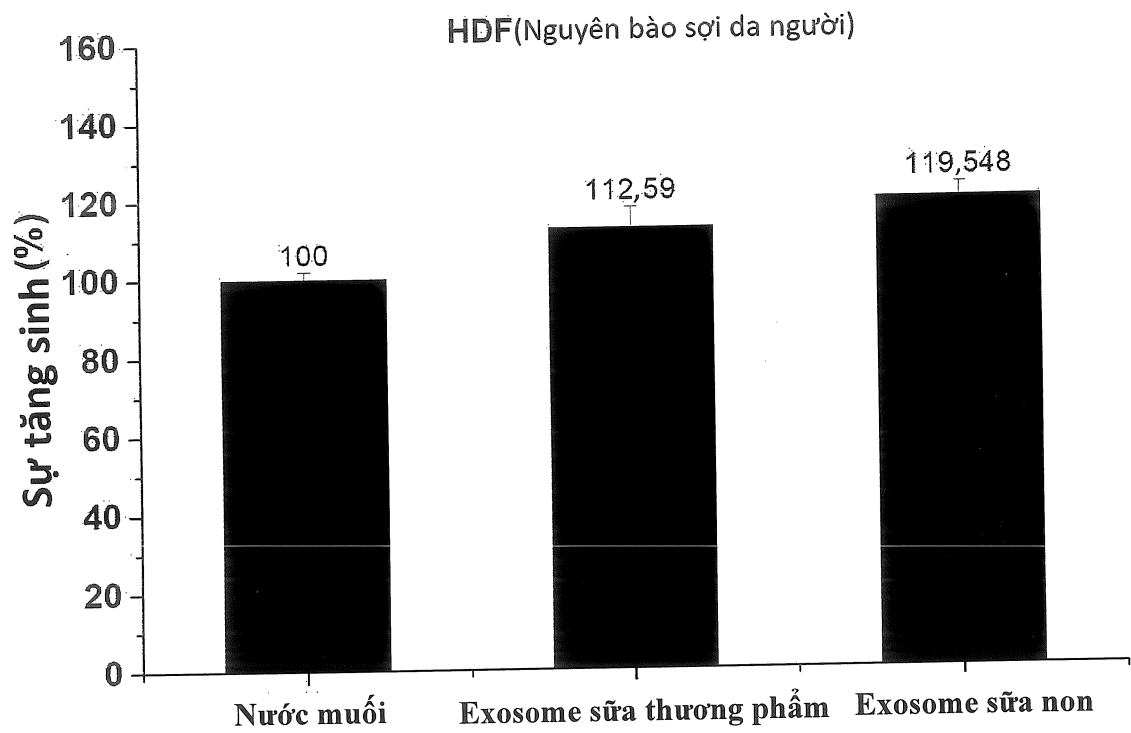


FIG.13

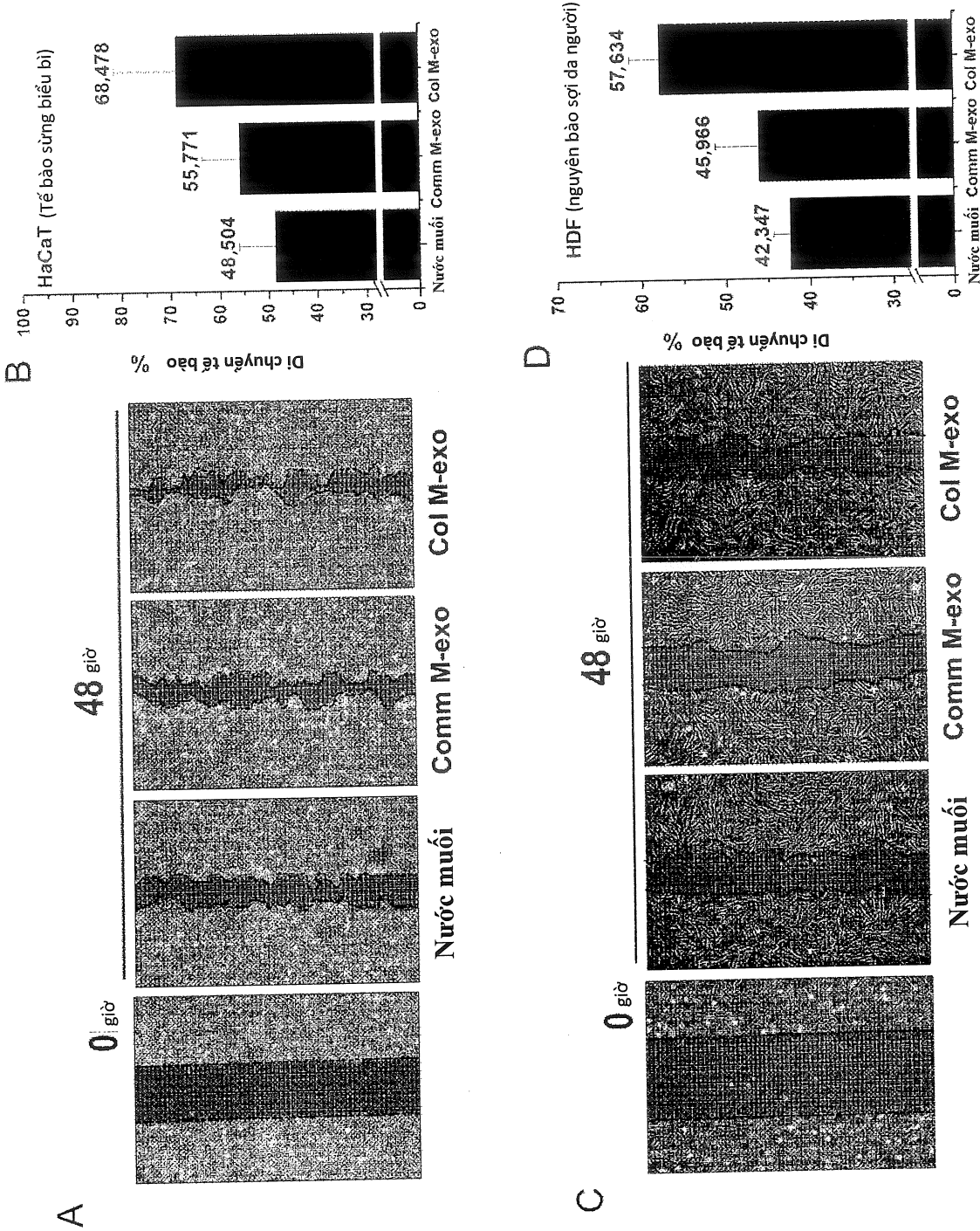
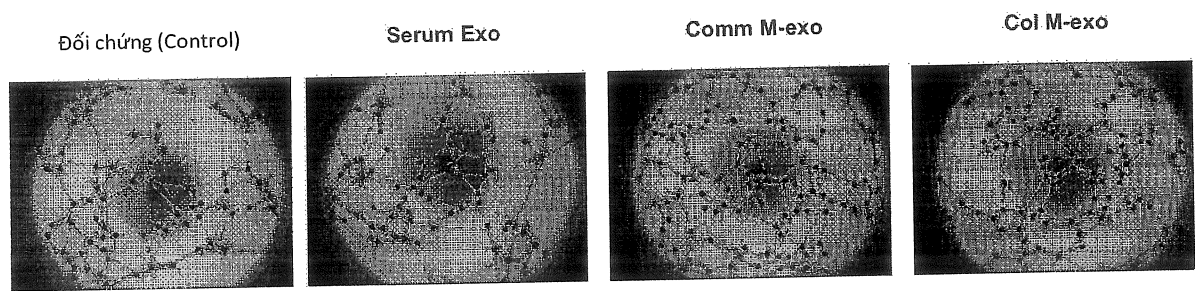
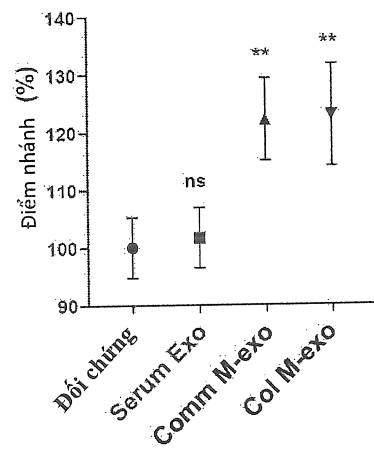


FIG.14



b)



c)

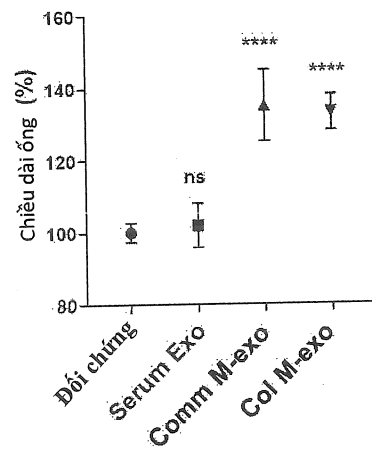


FIG.15A

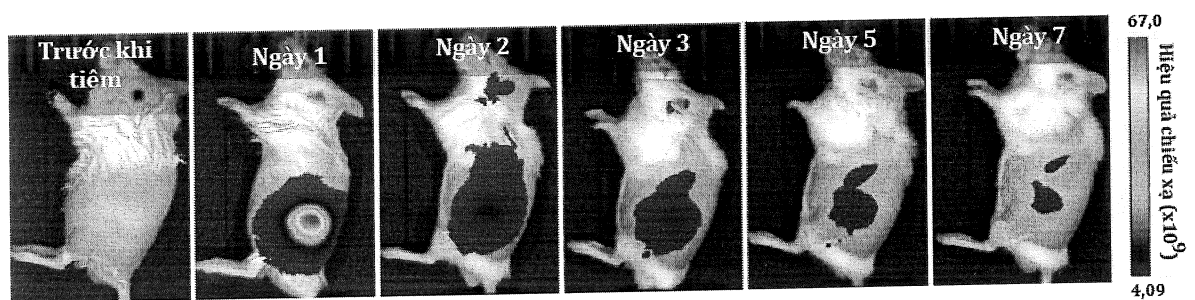


FIG.15B

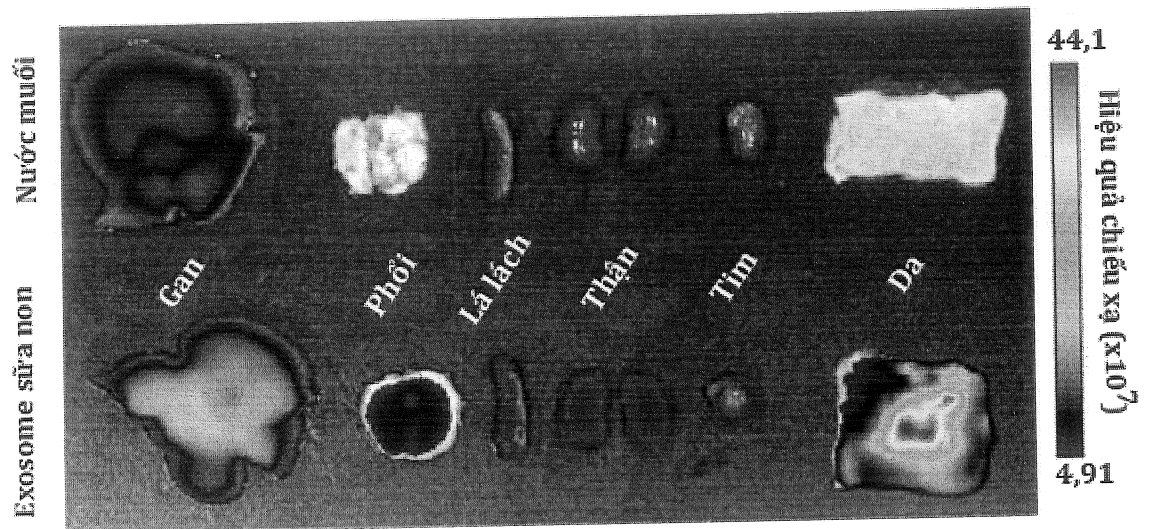


FIG.15C

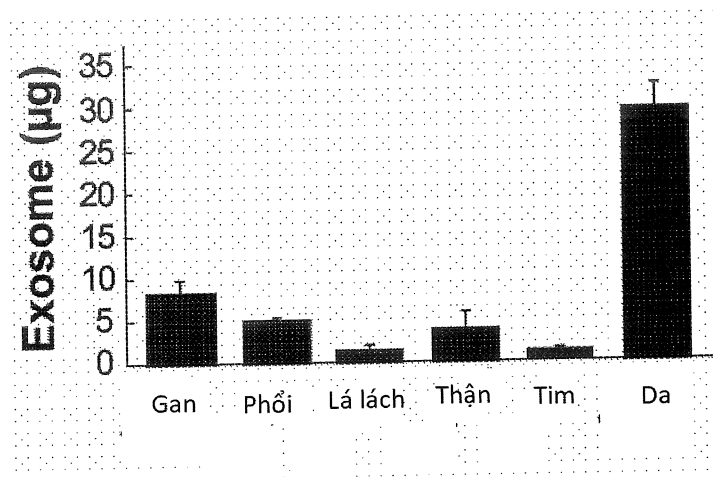


FIG.16

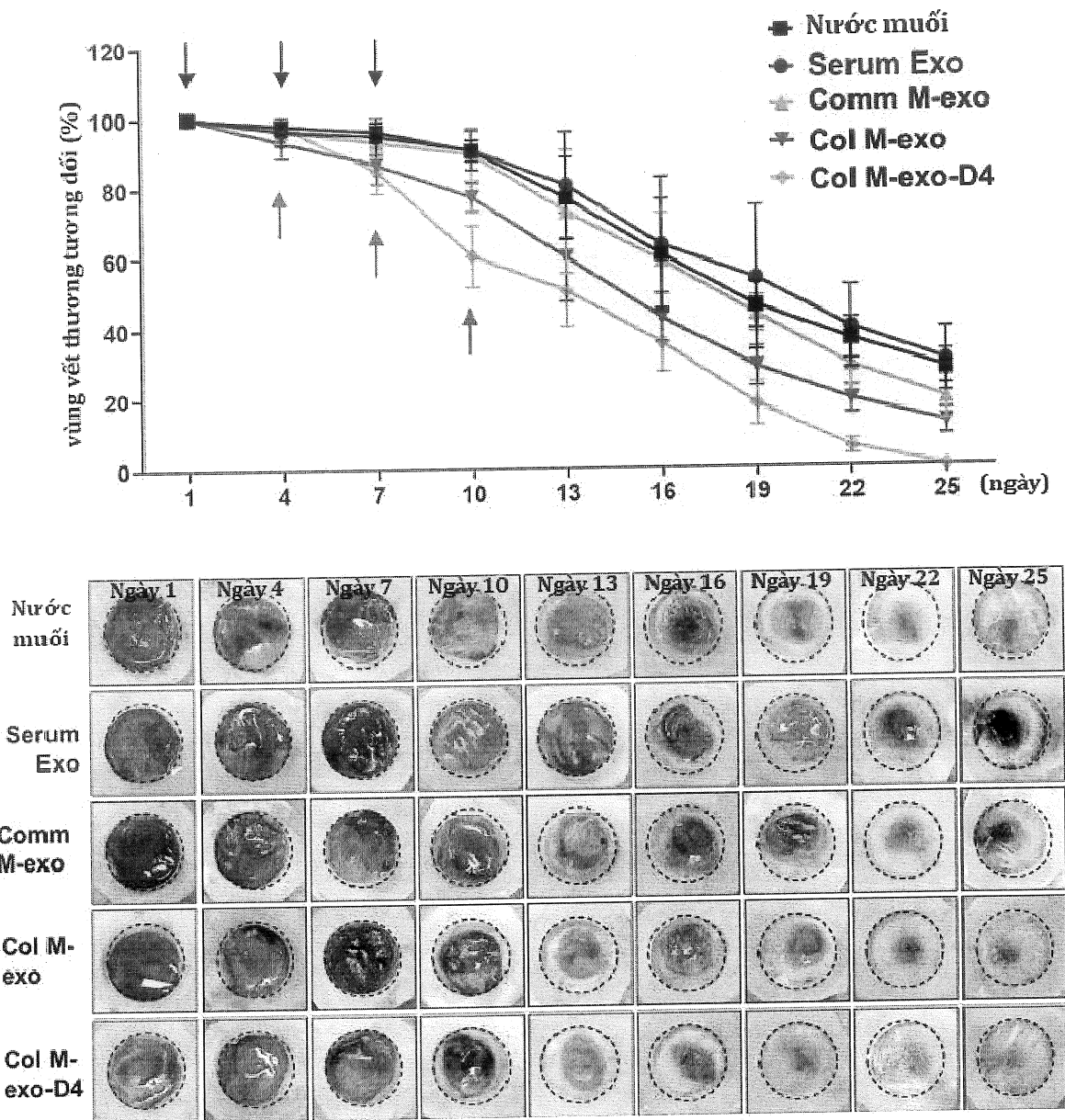


FIG.17

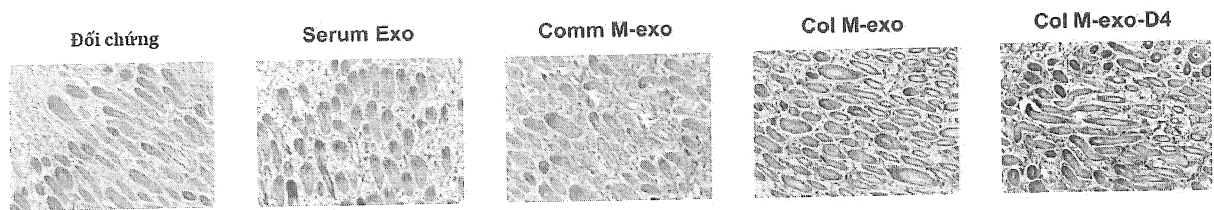


FIG.18A

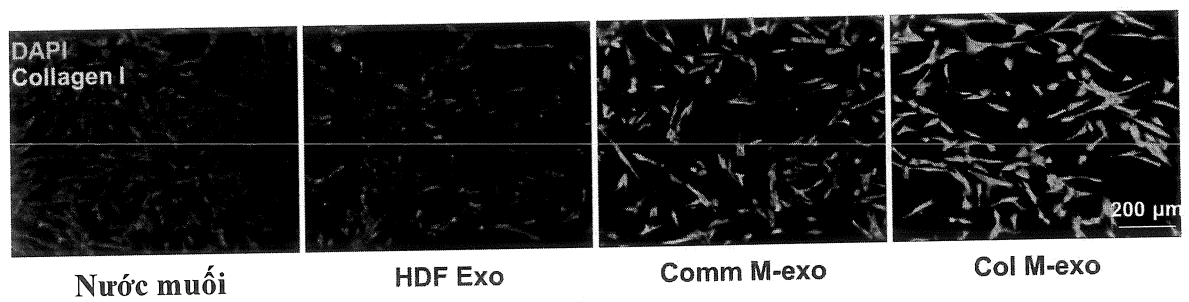


FIG.18B

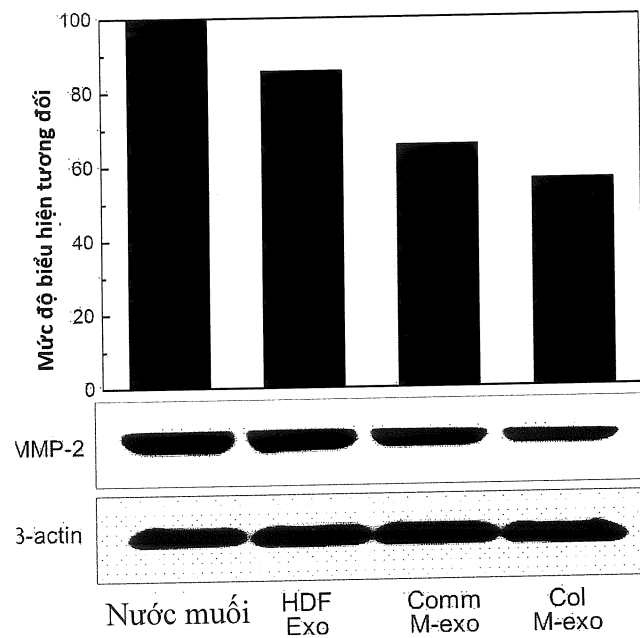


FIG.19

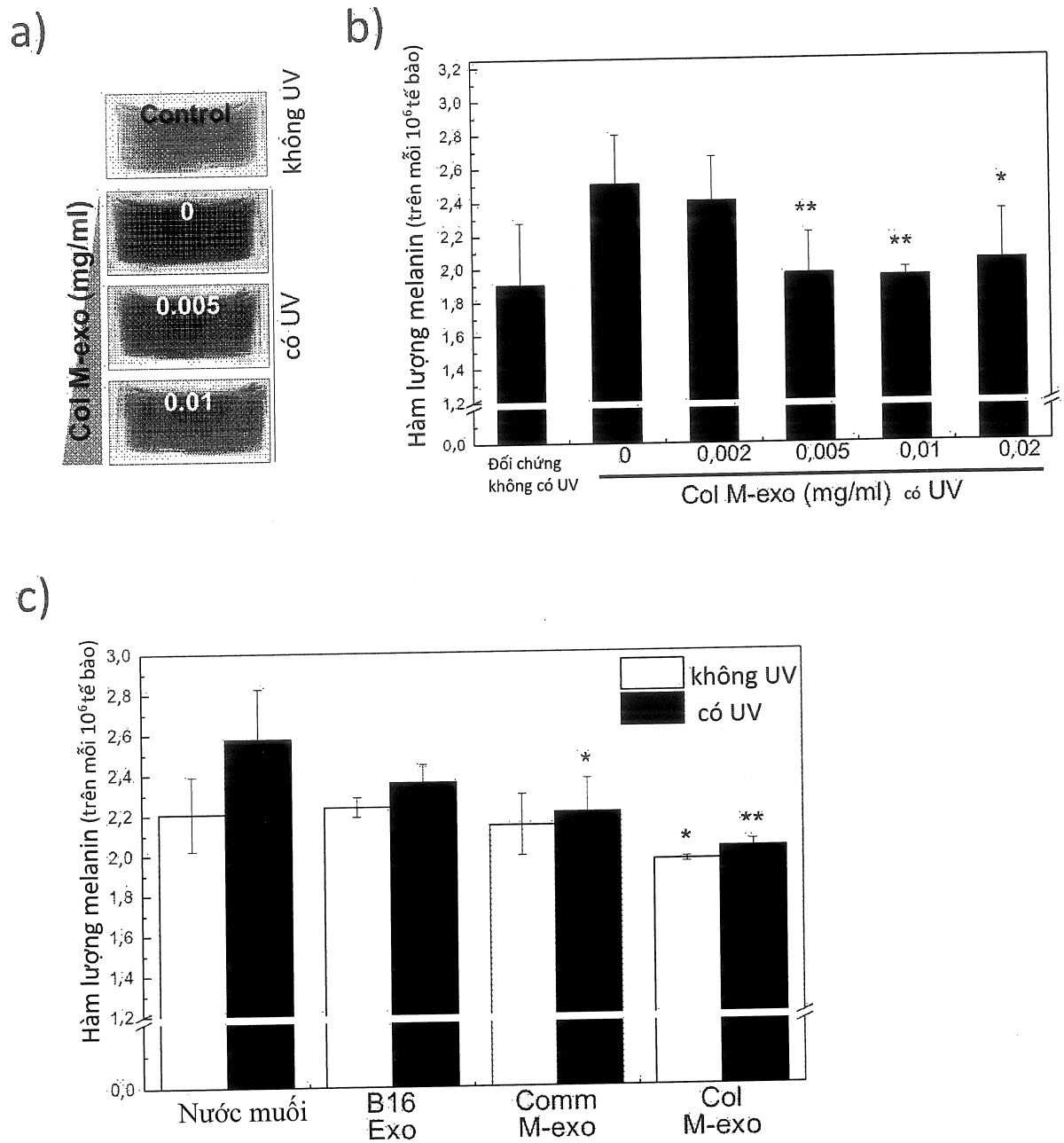


FIG.20

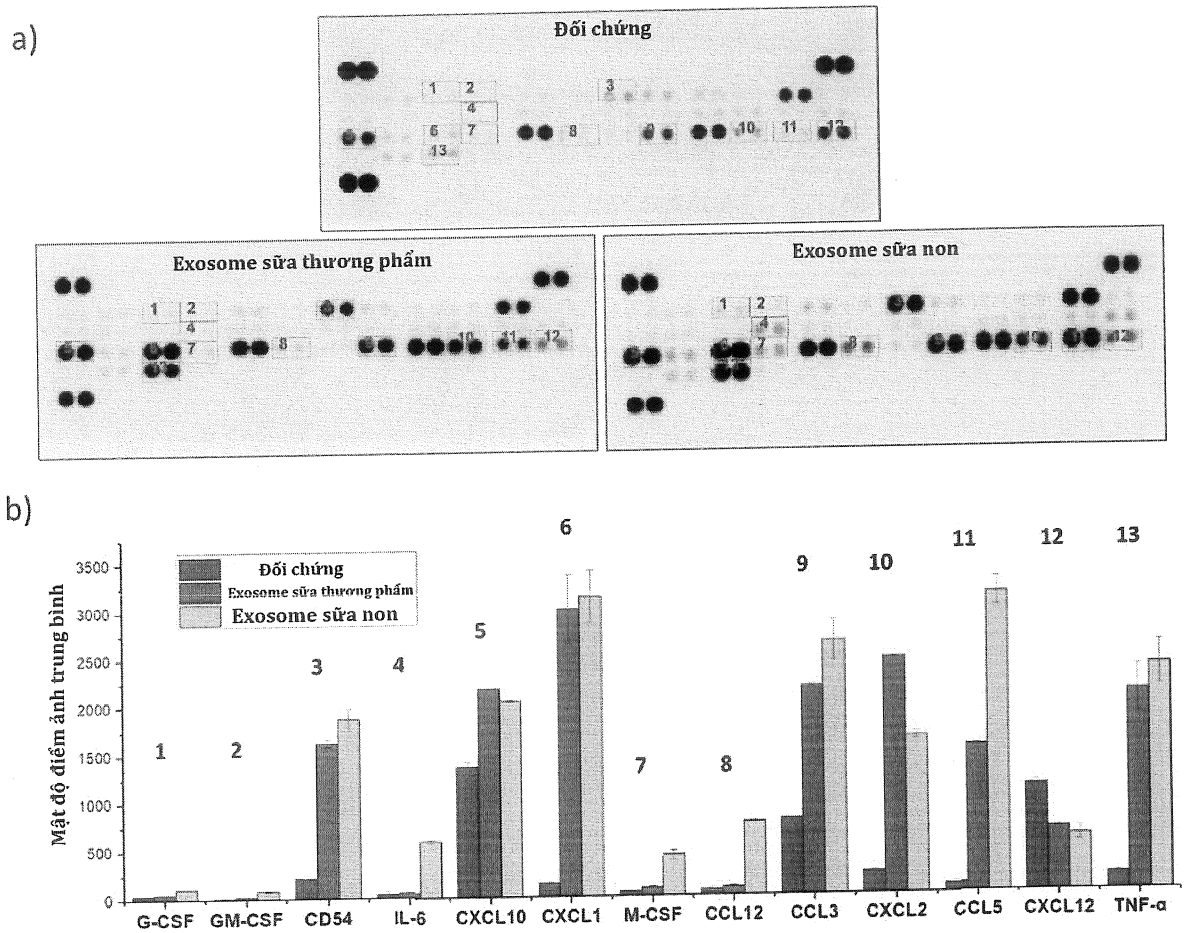


FIG.21

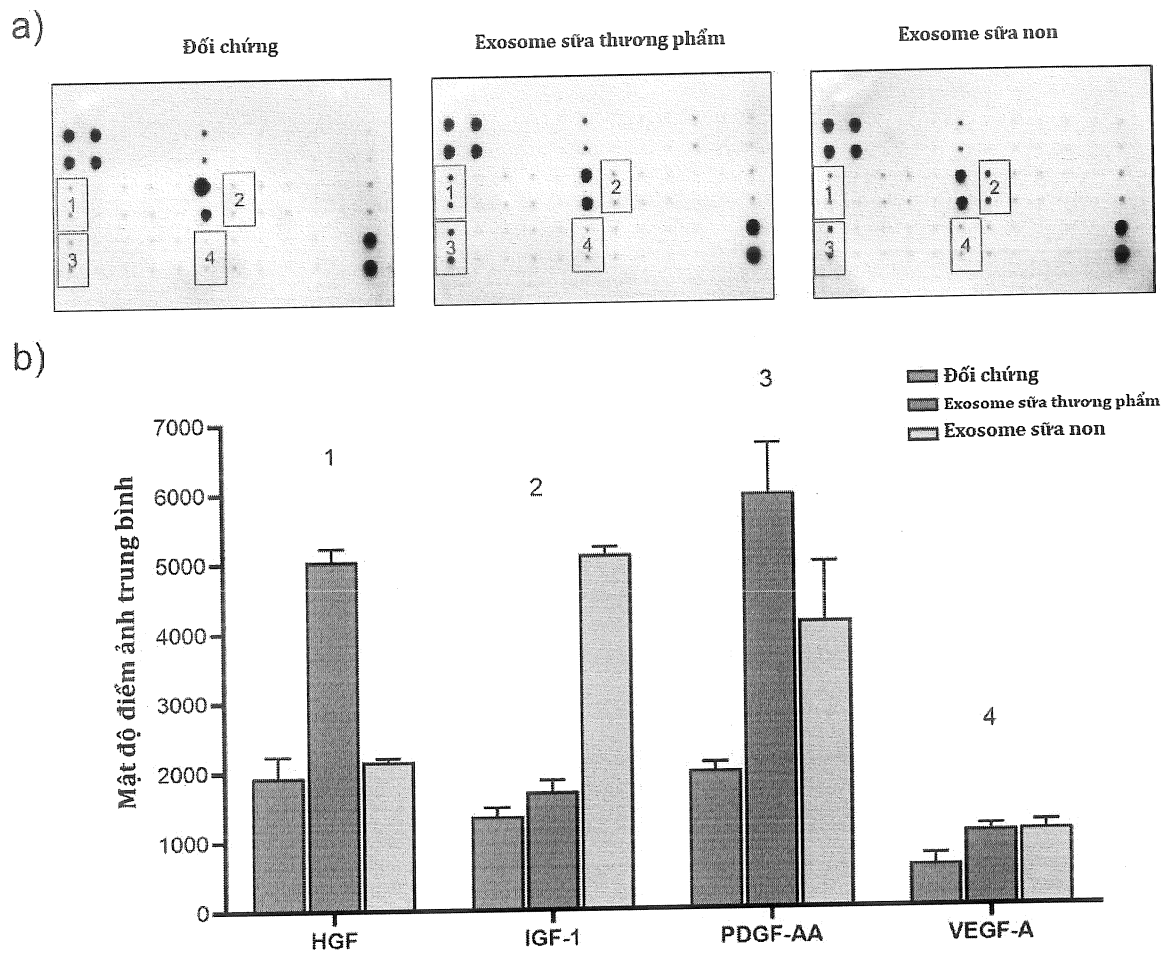


FIG.22A



FIG.22B

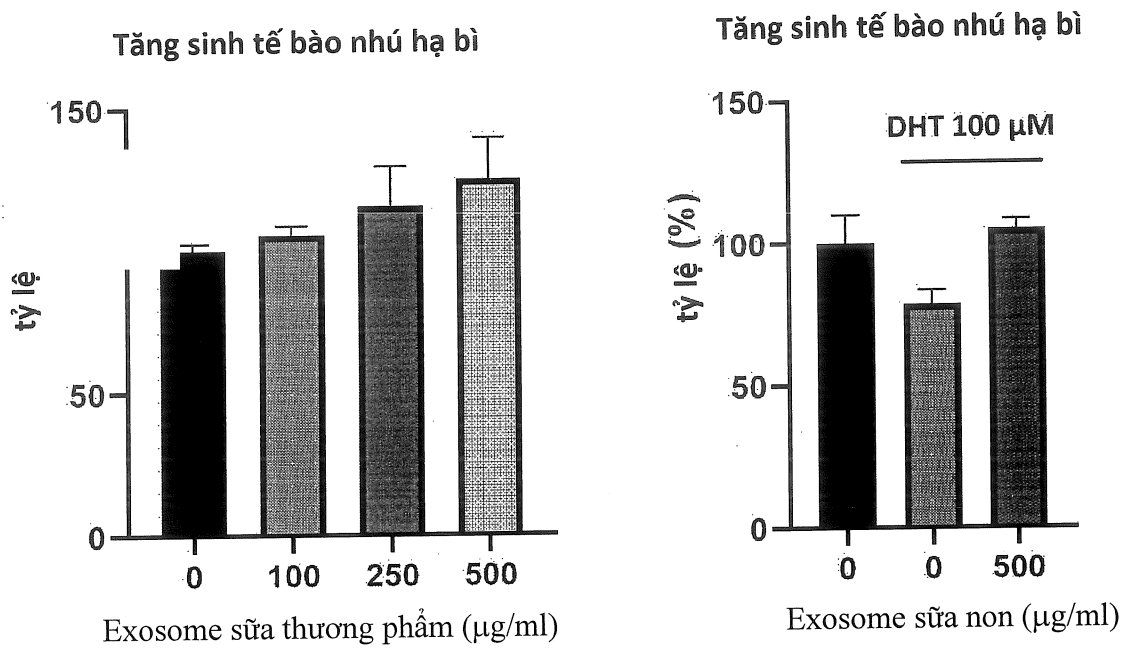


FIG.22C

