



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

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

(11) 
1-0022622

(51)⁷ **C07K 5/06**

(13) **B**

-
- | | | | | | |
|------|--|------------|------------|---------------|------------|
| (21) | 1-2011-01022 | (22) | 14.11.2008 | | |
| (86) | PCT/JP2008/071164 | 14.11.2008 | (87) | WO2010/038323 | 08.04.2010 |
| (30) | 2008-254552 | 30.09.2008 | JP | | |
| (45) | 25.12.2019 | 381 | (43) | 25.07.2011 | 280 |
| (73) | NITTA GELATIN INC. (JP)
4-26, Sakuragawa 4-chome, Naniwa-ku, Osaka-shi, OSAKA 556-0022 JAPAN | | | | |
| (72) | SUGIHARA, Fumihito (JP), INOUE, Naoki (JP), KOIZUMI, Seiko (JP), LIU, Chinfang (TW), TAKASAKI, Hajime (JP), KOBAYASHI, Hisayuki (JP), MANO, Hiroshi (JP), NAKATANI, Sachie (JP), WADA, Masahiro (JP) | | | | |
| (74) | Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD) | | | | |
-

(54) **CHẤT ỨC CHẾ BỆNH CHỨA DIPEPTIT CÓ CẤU TRÚC HYP-GLY**

(57) Sáng chế đề cập đến chất ức chế bệnh chứa dipeptit Hyp-Gly và ít nhất một dipeptit được chọn từ nhóm bao gồm Pro-Hyp và Ala-Hyp. Ngoài ra, chất ức chế bệnh này còn chứa glucosamin và/hoặc muối của nó. Chất ức chế bệnh này được dùng để điều trị bệnh loãng xương, viêm xương khớp và loét do tỳ đè.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến peptit collagen, dipeptit và chất ức chế bệnh (chất phòng ngừa bệnh). Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến peptit collagen bao gồm dipeptit có cấu trúc đặc hiệu ở dạng dipeptit cần thiết, dipeptit có cấu trúc mới, và chất ức chế bệnh chứa dipeptit này làm thành phần hữu hiệu cần thiết và hữu hiệu để ức chế bệnh (theo sáng chế, thuật ngữ “ức chế” bao gồm cả nghĩa “phòng ngừa” để ức chế sự xuất hiện các triệu chứng bệnh và nghĩa “chữa trị” để ức chế các triệu chứng bệnh gây ra) chẳng hạn như bệnh loãng xương, viêm xương khớp và loét do tỳ đè.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh loãng xương là tình trạng bệnh mà gây ra sự giảm lượng xương tuyệt đối, nhưng không kéo theo sự thay đổi về chất lượng xương. Xương liên tục được hấp thu và tạo thành, và nếu có sự chênh lệch giữa tỷ lệ hấp thu và tỷ lệ tạo thành mà dẫn đến sự tạo thành xương nghiêng về mức cân bằng âm, thì khi đó sẽ dẫn đến loãng xương. Sự hấp thu xương được thực hiện bởi tế bào hủy xương, và nếu sự biệt hóa và hoạt hóa các tế bào hủy xương càng lớn, thì tỷ lệ hấp thu xương càng cao. Mặt khác, sự tạo thành xương được thực hiện bởi tế bào tạo xương, và nếu sự biệt hóa và hoạt hóa các tế bào tạo xương càng lớn, thì tỷ lệ tạo thành xương càng cao.

Bệnh viêm xương khớp là bệnh mà sự thay đổi thoái triển mạn tính và sự thay đổi tăng sinh mạn tính xảy ra đồng thời ở khớp do đó làm thay đổi hình dạng khớp. Kết quả là, sụn khớp dần dần bị mòn và bị hao tổn, đến nỗi xương bị nhô ra. Ở sụn khớp, không có bất kỳ một hệ mạch nào, và đặc biệt là, các tế bào sụn phân khe khớp và mô sụn ở xương sườn khó phục hồi hoặc tái tạo hơn là các mô xương mà có hệ thống mạch. Đặc biệt là, nếu mô xương mà hỗ trợ cho sụn

khớp trở nên thừa thớt (loãng xương), thì chức năng của phần khớp bị cản trở, đến nỗi gây ra viêm xương khớp.

loét do tỳ đè là tình trạng bệnh mà do nằm lâu trên giường, da và mô mềm ở nơi mà xương bị nhô ra trải qua một quá trình làm mất khả năng tuần hoàn do bị tỳ đè trong một thời gian dài giữa xương và giường do đó dẫn đến sự hoại tử.

Giống như tác dụng của peptit lên các triệu chứng trên đây, tác dụng lên viêm xương khớp được thông báo. Ví dụ đã được biết đến là như sau: đồ uống củng cố khớp chứa peptit collagen và muối glucosamin làm các thành phần hữu hiệu và có độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 5 (tham khảo tài liệu sáng chế 1 dưới đây), được chất cải thiện viêm khớp dạng thấp hoặc viêm xương khớp, được chất này thu được bằng cách phân hủy thành phần collagen hoặc thành phần gelatin bằng enzym collagenaza và chứa tripeptit Gly-X-Y trong trình tự axit amin làm thành phần hữu hiệu (tham khảo tài liệu sáng chế 2 dưới đây) và được chất chữa cứng khớp miệng hoặc thực phẩm chức năng được khác biệt nhờ chứa: ít nhất một chất được chọn từ nhóm bao gồm collagen và peptit collagen; amino sacarit; và ít nhất một chất được chọn từ nhóm bao gồm mucopolysacarit; và axit uronic (tham khảo tài liệu sáng chế 3 dưới đây).

Tài liệu sáng chế 1: JP-A-2002-125638

Tài liệu sáng chế 2: JP-A-2002-255847

Tài liệu sáng chế 3: JP-A-2003-048850

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các giải pháp nêu trên đây chỉ mô tả rằng collagen, peptit collagen (mà là hỗn hợp của nhiều phân tử peptit) hoặc tripeptit đặc hiệu là hữu hiệu để phòng hoặc điều trị bệnh viêm xương khớp. Cấu trúc peptit mà hữu hiệu để phòng hoặc điều trị các chứng bệnh không chỉ bao gồm bệnh viêm xương khớp mà còn bao gồm các bệnh như loãng xương và loét do tỳ đè chưa được biết đến.

Do đó, các vấn đề mà sáng chế cần giải quyết là: từ quan điểm khác các giải pháp kỹ thuật đã biết, phát hiện ra phần thân chính của phân tử peptit mà hữu hiệu để ức chế các bệnh khác nhau chẳng hạn như bệnh loãng xương, bệnh viêm xương khớp và loét do tỳ đè, cụ thể là dipeptit mà dễ hấp thu vào cơ thể qua ruột non và là mới; và sáng chế đề xuất: chất ức chế bệnh mà chứa dipeptit làm thành phần hữu hiệu cần thiết; và peptit collagen mà chứa dipeptit làm dipeptit cần thiết.

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu để giải quyết các vấn đề trên đây. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã hoàn thành sáng chế nhờ phát hiện ra rằng dipeptit có cấu trúc Hyp-Gly dễ hấp thu vào cơ thể qua ruột non và có tác dụng như một thành phần ức chế bệnh hữu hiệu, đặc biệt là ức chế sự biệt hóa và hoạt hóa các tế bào hủy xương, thúc đẩy sự biệt hóa và hoạt hóa các tế bào tạo xương, và ức chế sự thoái hóa các tế bào sụn nhờ đó điều chỉnh được sự biệt hóa các tế bào này và dipeptit này hữu hiệu để ức chế bệnh loãng xương và viêm xương khớp, và dipeptit này còn phục hồi lượng tropocolagen ở chân bì da do đó cũng ức chế bệnh loét do tỳ đè, và bằng cách khẳng định các thực tế này.

Tức là, peptit collagen theo sáng chế được khác biệt nhờ chứa dipeptit có cấu trúc Hyp-Gly làm dipeptit cần thiết.

Dipeptit theo sáng chế được khác biệt nhờ chứa có cấu trúc Hyp-Gly.

Chất ức chế bệnh theo sáng chế được khác biệt nhờ chứa dipeptit có cấu trúc Hyp-Gly làm thành phần hữu hiệu cần thiết.

Sáng chế có thể ức chế hữu hiệu các triệu chứng như loãng xương, viêm xương khớp và loét do tỳ đè.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây các phần mô tả chi tiết về peptit collagen, dipeptit, và chất ức chế bệnh theo sáng chế được thực hiện. Tuy nhiên, phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các phần mô tả này. Và ngoài các minh họa dưới đây, còn có thể

tiến hành các thay đổi thích hợp đối với các minh họa này mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế.

Dipeptit, peptit collagen

Dipeptit theo sáng chế có cấu trúc Hyp-Gly.

Peptit collagen theo sáng chế bao gồm dipeptit nêu trên làm dipeptit cần thiết. Như được nêu dưới đây, peptit collagen này có thể thu được bằng cách xử lý collagen hoặc gelatin bằng enzym.

Trong dipeptit có cấu trúc Hyp-Gly, thành phần hydroxyprolin và/hoặc thành phần glyxin có thể được cải biến về mặt hóa học, và đối với thành phần hydroxyprolin nhóm hydroxyl có thể được cải biến về mặt hóa học.

Theo cách nêu trên, theo sáng chế, “dipeptit có cấu trúc Hyp-Gly” bao gồm cả cấu trúc được cải biến về mặt hóa học và cấu trúc không được cải biến về mặt hóa học. Ngoài ra, dưới đây, thuật ngữ “dipeptit có cấu trúc Hyp-Gly” có thể đơn giản được gọi là “Hyp-Gly” (thuật ngữ này cũng được áp dụng tương tự cho các peptit khác).

Trường hợp Hyp-Gly được cải biến về mặt hóa học, nó có thể hòa tan trong môi trường có độ pH nằm trong khoảng từ axit yếu đến trung tính, và nhờ đó việc tăng tính tương thích với các thành phần hữu hiệu khác nêu dưới đây cũng có thể xảy ra. Cụ thể là, đối với nhóm hydroxyl của gốc hydroxyprolin, các cải biến hóa học chẳng hạn như axetyl hóa ở vị trí O có thể được đề cập, và đối với nhóm α -carboxyl của gốc glyxin, thì các cải biến hóa học chẳng hạn như este hóa và amit hóa có thể được đề cập. Các cải biến hóa học thích hợp có thể được chọn theo loại thành phần hữu hiệu khác nêu dưới đây.

Hyp-Gly nêu trên có thể, ví dụ, như nêu dưới đây, thu được bằng cách xử lý collagen hoặc gelatin bằng enzym bằng hai bước riêng hoặc được tổng hợp từ axit amin. Đối với cải biến hóa học, các biện pháp đã biết như nêu dưới đây có thể được đề cập. Tuy nhiên, dipeptit theo sáng chế có thể thu được bằng các phương pháp khác ngoài các phương pháp này, ví dụ bằng phương pháp trong

đó việc xử lý bằng enzym lần thứ nhất được loại thay cho phương pháp xử lý bằng enzym bao gồm hai bước nêu dưới đây hoặc bằng phương pháp trong đó phương pháp xử lý bằng enzym lần thứ nhất và phương pháp xử lý bằng enzym lần thứ hai được tiến hành đồng thời.

Xử lý collagen hoặc gelatin bằng enzym bao gồm hai bước

Peptit collagen có cấu trúc Hyp-Gly có thể thu được bằng phương pháp xử lý bằng enzym gồm hai bước trong đó collagen hoặc gelatin được xử lý bằng enzym lần thứ nhất bằng phương pháp thông thường và sau đó được xử lý bằng enzym lần thứ hai bằng phản ứng với enzym có hoạt tính hydroxyprolidaza.

Nếu tiến hành việc xử lý bằng enzym gồm hai bước này, thì sẽ thu được peptit có trọng lượng phân tử tương đối lớn mà hữu dụng để làm giảm chứng viêm của xương hoặc mô sụn thông qua cơ chế dung nạp miễn dịch đường miệng bằng cách xử lý bằng enzym lần thứ nhất, và, ví dụ, trong trường hợp peptit có cấu trúc x-Hyp-Gly (x là gốc axit amin không phải là prolin), liên kết peptit giữa gốc Hyp-Gly và gốc x (liên kết peptit thu được từ nhóm axit amino của Hyp và nhóm carboxyl của gốc x) được phân cắt bằng cách xử lý bằng enzym lần thứ hai nhờ đó tạo thành Hyp-Gly.

Mặc dù, không bị giới hạn cụ thể nhưng các ví dụ về collagen nêu trên bao gồm các collagen thu được từ động vật có vú chẳng hạn như trâu bò và lợn và collagen thu được từ cá chẳng hạn như cá mập và cá tráp và các loại collagen có thể thu được từ xương và các phần da của động vật có vú và xương, da và các phần vảy của cá. Đặc biệt là, các phương pháp xử lý đã biết trước đây chẳng hạn như phương pháp xử lý tẩy nhờn và loại canxi và phương pháp xử lý chiết có thể được áp dụng cho các phần xương, da và vảy cá nêu trên.

Gelatin nêu trên có thể thu được bằng cách xử lý collagen nêu trên bằng các phương pháp đã biết trước đây chẳng hạn như chiết bằng nước nóng.

Enzym mà được sử dụng trong phương pháp xử lý collagen hoặc gelatin bằng enzym gồm hai bước nêu trên không được giới hạn cụ thể. Tuy nhiên, trường hợp mà dipeptit thu được hữu dụng cho các loại thực phẩm dành cho sức

khỏe được xem xét thì tốt hơn là sử dụng các enzym mà không phải enzym thu được từ vi khuẩn gây bệnh.

Theo các điều kiện xử lý của phương pháp xử lý bằng enzym lần thứ nhất thì có thể sử dụng 0,1 đến 5 phần trọng lượng enzym trên 100 phần trọng lượng collagen hoặc gelatin để tiến hành xử lý ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 65°C trong khoảng thời gian từ 1 đến 72 giờ, chẳng hạn.

Trọng lượng phân tử trung bình của peptit collagen thu được bằng cách xử lý collagen hoặc gelatin bằng enzym lần thứ nhất nêu trên tốt hơn nằm trong khoảng từ 200 đến 2000, tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 200 đến 1800. Nếu trọng lượng phân tử trung bình này nằm trong khoảng nêu trên, thì có thể nói rằng dipeptit có trọng lượng phân tử tương đối lớn được tạo ra đủ.

Sau khi xử lý bằng enzym lần thứ nhất, nếu cần, enzym này có thể được bất hoạt. Trong trường hợp này, nhiệt độ bất hoạt nằm trong khoảng từ 70 đến 100°C.

Enzym được sử dụng trong phương pháp xử lý bằng enzym lần thứ nhất nêu trên không được giới hạn cụ thể, nếu enzym này có thể phân cắt được liên kết peptit của collagen hoặc peptit. Tuy nhiên, thường sử dụng enzym mà được gọi là enzym phân giải protein hoặc proteaza. Cụ thể, ví dụ về các enzym này bao gồm collagenaza, thiol proteaza, serin proteaza, proteaza axit, proteaza kiềm, và proteaza kim loại, và các enzym có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với nhau. Giống như thiol proteaza nêu trên, một số enzym đã được biết đến chẳng hạn như chymopapain, papain, bromelain, và fixin thu được từ thực vật, và cathepsin và proteaza phụ thuộc canxi thu được từ động vật. Ngoài ra, giống như serin proteaza nêu trên, có một số enzym đã được biết đến chẳng hạn như trypsin và cathepsin D, và giống như proteaza axit nêu trên, có một số enzym đã được biết đến chẳng hạn như pepsin và chymotrypsin.

Ngoài ra, trong phương pháp xử lý bằng enzym lần thứ hai, chẳng hạn, phản ứng enzym được thực hiện bằng cách sử dụng enzym có hoạt tính hydroxyprolidaza và hoạt tính proliraza thu được từ *Aspergillus*. Bằng phản

ứng này, Hyp-Gly mà không được bao gồm trong sản phẩm thu được từ phương pháp xử lý bằng enzym lần thứ nhất được tạo ra.

Giống như các điều kiện xử lý của phương pháp xử lý bằng enzym lần thứ hai, chẳng hạn, có thể sử dụng từ 0,01 đến 5 phần trọng lượng enzym trên 100 phần trọng lượng sản phẩm thu được từ phương pháp xử lý bằng enzym lần thứ nhất để tiến hành xử lý ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 65°C trong khoảng thời gian từ 1 đến 72 giờ.

Trọng lượng phân tử trung bình của peptit collagen mà thu được bằng phương pháp xử lý bằng enzym lần thứ hai trên đây thích hợp nằm trong khoảng từ 200 đến 1500, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 200 đến 900. Phương pháp xử lý bằng enzym lần thứ hai này làm cho peptit collagen trở thành đối tượng chính tạo ra Hyp-Gly và được tiến hành thuận lợi để peptit có trọng lượng phân tử tương đối lớn trong số các peptit collagen mà thu được bằng cách xử lý bằng enzym lần thứ nhất sẽ không được thủy phân quá mức và để peptit collagen này có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng trọng lượng phân tử trung bình nêu trên.

Sau khi xử lý bằng enzym lần thứ hai, enzym này cần được bất hoạt. Nhiệt độ bất hoạt nằm trong khoảng từ 70 đến 100°C, chẳng hạn.

Chất thủy phân mà thu được nhờ phương pháp xử lý bằng enzym gồm hai bước nêu trên hoặc sản phẩm lên men mà thu được bằng phương pháp xử lý bằng enzym gồm hai bước nêu trên và quá trình lên men là một hỗn hợp chứa thành phần axit amin hoặc peptit khác với Hyp-Gly. Do đó, trong trường hợp mà thu được Hyp-Gly hoặc muối của nó, nếu cần có thể tiến hành việc cất phân đoạn hoặc tinh chế. Phương pháp cất phân đoạn hoặc tinh chế không được giới hạn cụ thể. Ví dụ, việc cất phân đoạn hoặc tinh chế có thể được tiến hành bằng các phương pháp đã biết trước đây chẳng hạn như siêu lọc, sắc ký lỏng khác (ví dụ, sắc ký lọc gel, sắc ký trao đổi ion, sắc ký pha đảo, và sắc ký ái lực), và các phương pháp bao gồm sự kết hợp của các phương pháp này. Cụ thể là, ví dụ, cất phân đoạn hoặc tinh chế mà có thể được tiến hành theo cách dưới đây, chẳng

hạn. Tức là, đầu tiên, khoảng 2g/10ml chất thủy phân hoặc sản phẩm lên men nêu trên được chia thành hai phần, và hai phần này lần lượt được nạp vào cột trao đổi ion (cột DEAE TOYOPEARL 650M (do TOSOH Corporation sản xuất), cột SP TOYOPEARL 650M (do TOSOH Corporation sản xuất), chẳng hạn), và thu hồi phần thể tích trống mà được giải hấp bằng nước cất. Sau đó, nạp phần đã thu hồi này vào cột (cột TOYOPEARL 650M (do TOSOH Corporation sản xuất), cột DEAE TOYOPEARL 650M (do TOSOH Corporation sản xuất), chẳng hạn) mà có nhóm trao đổi ion ngược với cột trao đổi ion nêu trên, và thu hồi phần thể tích trống mà được giải hấp bằng nước cất. Sau đó, nạp phần này vào cột lọc gel (cột SEPHADEX LH-20 (do Pharmacia Co., Ltd. sản xuất), chẳng hạn) và tiến hành giải hấp bằng dung dịch nước metanol 30%, sao cho phần mà tương ứng với vị trí giải hấp sản phẩm tổng hợp hóa học Hyp-Gly được thu hồi. Đối với phần này, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) cùng với cột pha đảo (ví dụ cột μ Bondasphere 5 μ C18 300Å (do Waters Co., Ltd. sản xuất)) được đề xuất để tiến hành cắt phân đoạn nhờ gradien nồng độ tuyến tính của dung dịch nước chứa axetonitril có nồng độ bằng 32% hoặc thấp hơn mà chứa axit trifloaxetic 0,1%. Sau đó, phần Hyp-Gly đã thu hồi được làm khô trong chân không đến khi thu được chất rắn để thu được Hyp-GLy có độ tinh khiết cao.

Tổng hợp từ axit amin

Hyp-Gly có thể được tổng hợp từ axit amin.

Về các phương pháp tổng hợp Hyp-Gly, thường có hai phương pháp là (1) phương pháp tổng hợp ở pha rắn và (2) phương pháp tổng hợp ở pha lỏng (tham khảo tài liệu JP-A-2003-183298, chẳng hạn) và trước đây còn gọi là (A) phương pháp Fmoc và (B) phương pháp Boc. Tuy nhiên, Hyp-Gly có thể được tổng hợp bằng phương pháp bất kỳ.

Theo một ví dụ, phương pháp tổng hợp ở pha rắn được giải thích chi tiết dưới đây.

Có thể tiến hành tổng hợp bằng phương pháp tổng hợp ở pha rắn đã biết trong đó, hydroxyproline được cố định lên giá thể polystyren và nhóm Fmoc

hoặc nhóm Boc được sử dụng để bảo vệ nhóm amino. Tức là, các hạt gel polyme polystyren có đường kính khoảng 0,1mm mà có bề mặt được cải biến bằng nhóm amino được sử dụng làm pha rắn, và glyxin được liên kết (liên kết peptit) với hydroxyprolin (mà có nhóm amino được bảo vệ bằng nhóm Fmoc (florenyl-metoxycarbonyl) bằng phản ứng loại nước nhờ diisopropylcarbodiimide (DIC) làm chất làm đặc, và sau đó pha rắn được rửa kỹ bằng dung môi để loại bỏ chẳng hạn như glyxin còn lại. Sau đó, nhóm bảo vệ gốc hydroxyprolin mà liên kết với pha rắn được loại bỏ (khử bảo vệ), sao cho Hyp-Gly có thể được tổng hợp.

Cải biến hóa học

Hyp-Gly có thể là chất đã được cải biến hóa học. Theo các phương pháp và các điều kiện xử lý cụ thể trong phương pháp cải biến hóa học, các kỹ thuật cải biến hóa học thông thường được áp dụng cho các peptit.

Đối với cải biến hóa học nhóm hydroxyl của gốc hydroxyprolin, ví dụ sự axetyl hóa ở vị trí O có thể được tiến hành bằng cách tạo ra phản ứng với axit axetic khan trong dung môi nước hoặc trong dung môi không phải nước.

Đối với cải biến hóa học nhóm α -carboxyl của gốc glyxin, ví dụ sự este hóa có thể được tiến hành bằng cách cho đi qua khí hydro clorua khô sau đó tạo huyền phù trong metanol, và tiến hành amit hóa bằng cách tạo phản ứng với carbodiimide.

Theo các ví dụ cụ thể khác về cải biến hóa học, các kỹ thuật cải biến hóa học như được mô tả trong tài liệu JP-B-62-044522 và JP-B-05-079046 có thể được áp dụng.

Chất ức chế bệnh

Chất ức chế bệnh theo sáng chế chứa dipeptit có cấu trúc Hyp-Gly làm thành phần hữu hiệu cần thiết. Ví dụ về các chất ức chế bệnh bao gồm chất ức chế bệnh loãng xương, chất ức chế bệnh viêm xương khớp và chất ức chế loét do tỳ đè.

Chất ức chế bệnh theo sáng chế chứa dipeptit theo sáng chế làm thành phần hữu hiệu, và ngoài ra, chất ức chế bệnh theo sáng chế có thể là chất ức chế mà chứa dipeptit theo sáng chế làm thành phần hữu hiệu trong đó, dipeptit này nằm trong peptit collagen theo sáng chế. Sau đó, theo trường hợp này, chất ức chế không chỉ là chất ức chế bệnh nêu trên bao gồm Hyp-Gly được tổng hợp hóa học từ axit amin hoặc Hyp-Gly được phân lập từ peptit collagen mà là sản phẩm thủy phân của collagen hoặc gelatin, mà còn là chất ức chế bệnh chứa Hyp-Gly còn lại ở dạng peptit collagen mà không phân lập Hyp-Gly từ peptit collagen nêu trên. Theo cách này, chất ức chế bệnh theo sáng chế là chất mà chứa dipeptit theo sáng chế làm thành phần hữu hiệu, bao gồm chất ức chế mà Hyp-Gly còn lại ở dạng peptit collagen được tạo thành chứa trong đó, và cũng có thể sử dụng kết hợp các dipeptit này, bao gồm trường hợp mà dipeptit được sử dụng ở dạng peptit collagen.

Tốt hơn là, Hyp-Gly nêu trên có mặt với tỷ lệ không dưới 0,001 phần trọng lượng, tốt hơn nữa là không dưới 0,01 phần trọng lượng, so với toàn bộ lượng chất ức chế bệnh nêu trên theo sáng chế. Trong trường hợp Hyp-Gly có tỷ lệ dưới 0,001 phần trọng lượng, thì có thể là các tác dụng theo sáng chế không được thể hiện đầy đủ.

Ngoài ra, trong trường hợp mà chất ức chế bệnh theo sáng chế được sử dụng bằng cách tiêm trực tiếp vào phần bị bệnh thì lượng Hyp-Gly nêu trên tốt hơn là không dưới 1mmol/l.

Chất ức chế bệnh theo sáng chế có thể thu được bằng cách pha loãng Hyp-Gly bằng dung dịch nước muối sinh lý, và trong trường hợp này, hiệu quả của sáng chế có thể đạt được đầy đủ, nhưng các thành phần hữu hiệu khác hoặc các thành phần để bào chế thuốc có thể được đưa vào một cách thích hợp ngoài Hyp-Gly nêu trên với lượng nằm trong khoảng mà không làm ảnh hưởng đến hiệu quả của sáng chế.

Các thành phần hữu hiệu khác nêu trên được lấy làm ví dụ như glucosamin và/hoặc muối của nó và chondroitin sulphat. Các thành phần này có

thể lần lượt được sử dụng riêng hoặc kết hợp với nhau. Trong số tất cả các thành phần trên đây, glucosamin và/hoặc muối của nó được ưu tiên hơn cả vì chúng có chức năng làm tăng tác dụng ức chế bệnh của Hyp-Gly.

Ngoài ra, các peptit hoặc axit amin ngoài Hyp-Gly có thể được đưa vào làm các thành phần hữu hiệu khác nêu trên. Ví dụ, peptit có trọng lượng phân tử tương đối lớn là hữu dụng vì chống lại chẳng hạn như bệnh viêm khớp dạng thấp, peptit này cũng có tác dụng làm giảm chứng viêm của xương hoặc mô sụn thông qua cơ chế dung nạp miễn dịch đường miệng. Để các peptit hoặc axit amin không phải Hyp-Gly được đưa vào, ví dụ, collagen hoặc gelatin được thủy phân để thu được peptit collagen chứa Hyp-Gly, và sau đó peptit collagen này được sử dụng luôn mà không cần tách ra khỏi Hyp-Gly.

Hơn thế nữa, canxi hoặc hesperidin tái sắp xếp sacarit có thể được dùng làm các thành phần hữu hiệu khác nêu trên với mục đích làm tăng sự lắng đọng muối vào xương, và chẳng hạn như vitamin C cũng có thể được sử dụng nhằm mục đích làm tăng sự tổng hợp và lắng đọng collagen.

Giống như lượng các thành phần hữu hiệu khác nêu trên, các thành phần này cũng có thể được sử dụng với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0,001 đến 20 phần trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 20 phần trọng lượng, so với toàn bộ lượng chất ức chế bệnh. Cụ thể là, lượng glucosamin và/hoặc muối của nó tốt hơn là có tỷ lệ nằm trong khoảng từ 5 đến 15 phần trọng lượng so với toàn bộ lượng chất ức chế bệnh. Trong trường hợp dưới tỷ lệ này là 5 phần trọng lượng, thì có thể việc làm tăng các tác dụng của Hyp-Gly không được thể hiện đầy đủ. Trong trường hợp tỷ lệ này lớn hơn 15 phần trọng lượng, thì việc tiêu hóa quá mức là có thể vì chúng được thải vào trong nước tiểu hoặc phân.

Các nguyên liệu tạo hình có thể được sử dụng làm các thành phần để bào chế thuốc, chẳng hạn như xenluloza tinh thể, và lượng thích hợp có thể được thiết lập theo dạng thuốc.

Ví dụ về các phương thức sử dụng chất ức chế bệnh theo sáng chế bao gồm các phương thức chẳng hạn như tiêu hóa bằng cách sử dụng qua đường miệng và tiêm trực tiếp vào phần bị bệnh. Hyp-Gly được hấp thu nhanh ở ruột và ít bị phân hủy thành các axit amin. Do đó, việc tiêu hóa bằng cách sử dụng qua đường miệng được ưu tiên.

Trong trường hợp sử dụng qua đường miệng, bằng các phương pháp đã biết trước đây, hỗn hợp chứa Hyp-Gly và các thành phần hữu hiệu khác nêu trên hoặc các thành phần nêu trên để bào chế thuốc có thể được bào chế thành viên nén bằng cách nén thành viên nén, và ngoài ra có thể được bào chế thành dạng thuốc rắn bất kỳ (ví dụ, hạt, bột, nang), dạng thuốc lỏng (ví dụ, dung dịch, hỗn dịch, nhũ tương), và dạng thuốc đông khô.

Trong trường hợp tiêm trực tiếp vào phần bị bệnh, nguyên liệu thu được bằng cách pha loãng Hyp-Gly bằng dung dịch nước muối sinh lý được sử dụng, nhưng nếu cần, các thành phần hữu hiệu khác nêu trên có thể cũng được sử dụng. Tốt hơn là, nồng độ của các thành phần này là như nêu trên, hàm lượng của Hyp-Gly không dưới 1mmol/l.

Dipeptit mà chứa trong chất ức chế bệnh theo sáng chế làm thành phần hữu hiệu cần thiết là dipeptit mà có cấu trúc Hyp-Gly và khác các axit amin, dipeptit có cấu trúc không phải Hyp-Gly và tripeptit và nhiều peptit đa giá mà có axit amin khác liên kết với Hyp-Gly. Bằng cách tạo ra chất ức chế bệnh chứa dipeptit nêu trên có cấu trúc Hyp-Gly, các tác dụng ức chế bệnh tốt (tác dụng ức chế các triệu chứng bệnh như loãng xương, viêm xương khớp và loét do tỳ đè) được thể hiện.

Điều nêu trên đặc biệt được chứng minh trong các thử nghiệm đánh giá hoạt tính như được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Sử dụng cùng với các dipeptit khác

Có một vài trường hợp mà các tác dụng ức chế bệnh của Hyp-Gly có thể được tăng hiệp đồng bằng cách sử dụng kết hợp với các dipeptit khác.

Ví dụ, các tác dụng ức chế bệnh của Hyp-Gly có thể được tăng hiệp đồng bằng cách sử dụng kết hợp Pro-Hyp.

Ngoài ra, các tác dụng lên các bệnh chẳng hạn như bệnh viêm xương khớp có thể được tăng hiệp đồng bằng cách sử dụng kết hợp với Ala-Hyp.

Để thu được peptit collagen theo sáng chế, ví dụ, peptit collagen chứa cả Hyp-Gly và Pro-Hyp, về cơ bản chỉ cần thay đổi loại enzym sử dụng trong phương pháp xử lý bằng enzym lần thứ hai trong phương pháp giống như phương pháp xử lý bằng enzym gồm hai bước đã giải thích cho trường hợp Hyp-Gly. Vì vậy, enzym, ví dụ enzym có hoạt tính prolidaza và hoạt tính hydroxyprolidaza thu được từ ví dụ *Aspergillus* có thể được đề xuất.

Trong trường hợp mà Hyp-Gly và Pro-Hyp được sử dụng cùng nhau trong chất ức chế bệnh theo sáng chế, thì tốt hơn là tỷ lệ hàm lượng Hyp-Gly nằm trong khoảng từ 50% đến 90% trọng lượng, và tỷ lệ hàm lượng Pro-Hyp nằm trong khoảng từ 10% đến 50% trọng lượng nếu tổng cả hai chất này là 100% trọng lượng.

Ngoài ra, trong trường hợp mà Hyp-Gly và một dipeptit khác được sử dụng cùng nhau, thì tổng tỷ lệ hàm lượng của các dipeptit này tốt hơn là không dưới 0,001 phần trọng lượng và tốt hơn nữa là không dưới 0,01 phần trọng lượng so với tổng lượng chất ức chế bệnh nêu trên theo sáng chế, chẳng hạn. Hơn thế nữa, trong trường hợp mà chất ức chế theo sáng chế được sử dụng bằng cách tiêm trực tiếp vào phần bị bệnh thì tổng lượng các dipeptit này tốt hơn là không dưới 10 μ mol/l.

Các tác dụng hiệp đồng bằng cách sử dụng kết hợp với các dipeptit khác được giải thích cụ thể dưới đây nhờ viện dẫn các triệu chứng tiêu biểu nêu trên làm ví dụ, các triệu chứng mà chất ức chế bệnh theo sáng chế có thể ức chế là loãng xương, viêm xương khớp và loét do tỳ đè.

Như nêu trên, bệnh loãng xương là bệnh mà sự hấp thu xương được thực hiện bởi tế bào hủy xương, và nếu sự biệt hóa và hoạt hóa các tế bào hủy xương

càng lớn thì tỷ lệ hấp thu xương càng cao, trong khi đó sự tạo thành xương được thực hiện bởi tế bào tạo xương và nếu sự biệt hóa và hoạt hóa các tế bào tạo xương càng lớn thì tỷ lệ tạo xương càng cao. Do đó, bệnh loãng xương được ức chế bằng cách ức chế sự biệt hóa và hoạt hóa tế bào hủy xương và thúc đẩy sự biệt hóa và hoạt hóa tế bào tạo xương. Sau đó, theo kiến thức và phát hiện của tác giả sáng chế, Hyp-Gly và Pro-Hyp có các chức năng dưới đây trong việc biệt hóa và hoạt hóa các tế bào hủy xương và tạo xương.

Tức là, đầu tiên, các cơ chế biệt hóa và hoạt hóa các tế bào hủy xương được giải thích. Đầu tiên, (i) nhiều tiền tế bào hủy xương dung hợp với nhau và biệt hóa thành các tế bào khổng lồ đa nhân. Enzym mà xúc tác sự biệt hóa này là TRAP (Tartaric Acid Reistant Acid Phosphatase). Sau đó, (ii) các tế bào khổng lồ đa nhân nêu trên (các tế bào hủy xương) hòa tan và phân hủy mô xương. Theo cơ chế nêu trên, Hyp-Gly chủ yếu ức chế (i), và Pro-Hyp ức chế cả (i) và (ii). Do đó, đề xuất việc sử dụng kết hợp Hyp-Gly và Pro-Hyp, vì hoạt động hiệp đồng của hai chất này sẽ thu được các tác dụng tốt hơn nhiều.

Ngoài ra, các tế bào tạo xương tổng hợp và tiết chất xương (collagen typ I) và ALP (phosphatase kiềm) canxi hóa chất xương này thành $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (hydroxyapatit), để quá trình cốt hóa được thúc đẩy. Do đó, Hyp-Gly thúc đẩy hoạt tính ALP nêu trên, và ngoài ra bằng cách sử dụng kết hợp với Pro-Gly, tác dụng thúc đẩy của Hyp-Gly được thúc đẩy bằng tác dụng hiệp đồng, vì vậy tác dụng thúc đẩy mà tốt hơn so với tác dụng thúc đẩy của việc sử dụng riêng mỗi dipeptit có thể được thể hiện.

Bệnh viêm xương khớp được chia thành bốn giai đoạn sau: (i) giai đoạn tăng sinh tế bào, (ii) giai đoạn biệt hóa/trưởng thành tế bào sụn, (iii) giai đoạn biệt hóa (thoái hóa) thành tế bào sụn phì đại, (iv) canxi hóa và sự chết tế bào theo chương trình sau đó. Theo giai đoạn (i) và (ii), Pro-Hyp chủ yếu thúc đẩy biệt hóa thành các tế bào sụn và duy trì điều này, và ngoài ra trong giai đoạn (ii), Hyp-Gly điều chỉnh sự biệt hóa tiền tế bào sụn khớp, xúc tác cho quá trình biệt hóa (thoái hóa) thành tế bào sụn phì đại, và ức chế hoạt tính ALP (phosphatase

kiềm) cũng là một chỉ thị đặc hiệu, sao cho việc chuyển sang giai đoạn (iii) bị ức chế. Do đó, theo các tác giả sáng chế, nếu Ala-Hyp cũng được sử dụng kết hợp, thì các chức năng của Hyp-Gly trong giai đoạn (ii), tức là, việc điều chỉnh sự biệt hóa các tiền tế bào sụn khớp và ức chế hoạt tính ALP được tăng lên hiệp đồng. Theo cách này, có thể thấy rằng bằng cách sử dụng kết hợp Hyp-Gly và Pro-Gly và tốt hơn là sử dụng kết hợp thêm Ala-Hyp, thì sự thoái hóa các tế bào sụn được ức chế hiệp đồng, và kiểu biểu hiện các tế bào sụn được duy trì, nhờ vậy, góp phần ức chế bệnh viêm xương khớp.

Sự tiến triển triệu chứng và quá trình lành vết loét do tỳ đè được chia thành ba giai đoạn sau: (i) giai đoạn phản ứng viêm, (ii) giai đoạn tăng sinh (giai đoạn tạo hạt) và (iii) giai đoạn ổn định.

Tức là, nếu da bị tổn thương, thì trong (i) giai đoạn phản ứng viêm, xảy ra hiện tượng thoát vị mô và thoát vị mạch máu và xảy ra hiện tượng xuất hiện khu trú. Tuy nhiên, hiện tượng cầm máu được thực hiện bởi các yếu tố đông máu trong máu và sự co mạch máu. Tiếp đó, các tế bào lympho và các bạch cầu đơn nhân to đi ra khỏi mạch máu giống như dịch rỉ và di chuyển đến vết thương (di động đến tế bào). Do đó, Pro-Hyp thể hiện chức năng thúc đẩy sự di động của các tế bào lympho và bạch cầu đơn nhân to. Các bạch cầu đơn nhân to trở thành đại thực bào, và đại thực bào này còn giải phóng nhiều hóa chất khác nhau và là nguồn phát sinh các tín hiệu tiếp theo. Ngoài ra, các sợi collagen trong chân bì da được tiết bởi collagenaza nội sinh (ví dụ, MMP-13).

Tiếp đó, trong giai đoạn tăng sinh (ii), các hóa chất được giải phóng bởi hoạt động của đại thực bào và đoạn peptit thu được từ sự phân hủy collagen (ví dụ, Pro-Hyp và Hyp-Gly) được tạo thành bởi collagenaza nội sinh nêu trên tạo ra các tín hiệu kích thích để tập hợp các nguyên bào sợi, sao cho các sợi collagen (collagen: chủ yếu bao gồm tropocollagen) được tạo thành. Các nguyên bào sợi, các mao mạch và collagen kết hợp lại, di chuyển đến vết thương, bao lấy bề mặt bị thương, và bám vào bề mặt vết thương (sự tạo thành mô hạt).

Do đó, cả Pro-Hyp và Hyp-Gly hiệp đồng thúc đẩy sự tổng hợp collagen để thúc đẩy sự tạo thành mô hạt. Cụ thể là, ở giai đoạn đầu của giai đoạn tăng sinh (ii), Pro-Hyp chủ yếu biểu hiện chức năng sinh lý, và ở giai đoạn cuối, Hyp-Gly chủ yếu biểu hiện chức năng sinh lý. Nếu mô hạt được tạo thành, thì các tế bào không tăng sinh không phải lớp mầm di chuyển để tạo thành một lớp tế bào biểu mô. Sau đó, các tế bào của lớp mầm di chuyển đến dưới lớp này và tăng sinh từ rìa của vết thương để tạo thành biểu mô đa lớp, sao cho kết thúc sự tạo thành biểu bì.

Cuối cùng, trong giai đoạn (iii), hoạt động của nguyên bào sợi trở về hoạt động ban đầu, sự tạo thành collagen bị suy giảm, lượng tạo thành và lượng phân hủy chuyển sang giai đoạn tĩnh đồng thời giữ ở trạng thái cân bằng, sao cho việc làm lành vết thương được hoàn tất.

Các chức năng nêu trên của dipeptit mà chứa trong peptit collagen theo sáng chế cũng được đề xuất xuất phát từ bằng chứng về các tác dụng khác nhau trong các thử nghiệm đánh giá đặc tính như được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế nêu dưới đây.

Pro-Hyp

Pro-Hyp có các chức năng ức chế các triệu chứng của bệnh chẳng hạn như loãng xương, viêm xương khớp và loét do tỳ đè không chỉ trong trường hợp mà Pro-Hyp được sử dụng kết hợp với Hyp-Gly, mà còn trong trường hợp sử dụng riêng Pro-Hyp.

Pro-Hyp được giải thích chi tiết dưới đây. Tuy nhiên, phần lớn các đối tượng của việc giải thích này trùng lặp với sự giải thích về Hyp-Gly nêu trên, nên chủ yếu các điểm khác nhau sẽ được giải thích.

Trong Pro-Hyp, đơn vị prolin và/hoặc đơn vị hydroxyprolin có thể được cải biến hóa học. Cụ thể là, đối với đơn vị hydroxyprolin, một trong hai hoặc cả hai nhóm carboxyl và nhóm hydroxyl có thể được cải biến hóa học.

Do đó, trong bản mô tả sáng chế, nếu "dipeptit có cấu trúc Pro-Hyp" hoặc thuật ngữ viết tắt của nó "Pro-Hyp" được đề cập, thì thuật ngữ này bao gồm cả dạng được cải biến về mặt hóa học và dạng không được cải biến hóa học.

Trong trường hợp mà Pro-Hyp được cải biến hóa học, thì Pro-Hyp này có thể được hòa tan trong dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ axit yếu đến trung tính, và nhờ đó hi vọng tăng cường khả năng tương thích với các thành phần hữu hiệu khác. Cụ thể là, đối với nhóm α -amino của gốc prolin, các cải biến hóa học chẳng hạn như polypeptidyl hóa, succinyl hóa, maleyl hóa, axetyl hóa, khử amin hóa, benzoyl hóa, alkylsulfonyl hóa, aryl sulfonyl hóa, dinitrophenyl hóa, trinitrophenyl hóa, carbamyl hóa, phenylcarbamyl hóa, và thiol hóa có thể được viện dẫn. Đối với nhóm α -carboxyl của gốc hydroxyprolin, các cải biến hóa học chẳng hạn như este hóa và amit hóa có thể được viện dẫn. Đối với nhóm hydroxyl của gốc hydroxyprolin, các cải biến hóa học chẳng hạn như O-axetyl hóa có thể được viện dẫn. Các cải biến hóa học thích hợp có thể được chọn tùy thuộc vào các loại thành phần hữu hiệu khác.

Tỷ lệ Pro-Hyp nêu trên chứa trong chất ức chế bệnh và lượng Pro-Hyp trong trường hợp mà chất ức chế bệnh được sử dụng bằng cách tiêm vào phần khớp là giống như tỷ lệ và lượng được đề xuất cho Hyp-Gly.

Tương tự với Hyp-Gly, Pro-Hyp nêu trên có thể thu được bằng cách xử lý collagen hoặc gelatin bằng enzym nhờ hai bước riêng hoặc được tổng hợp từ các axit amin. Đối với cải biến hóa học, các phương pháp đã biết đề cập dưới đây được viện dẫn.

Phương pháp xử lý bằng enzym để thu được Pro-Hyp, về cơ bản có thể giống phương pháp xử lý bằng enzym gồm hai bước đã giải thích trong trường hợp Hyp-Gly. Tuy nhiên, đối với phương pháp xử lý bằng enzym lần hai, ví dụ, enzym có hoạt tính aminopeptidaza P và prolidaza như thu được từ *Aspergillus* được sử dụng.

Tương tự Hyp-Gly, Pro-Hyp có thể được tổng hợp từ axit amin. Tuy nhiên, trong trường hợp này, đủ để thay thế hydroxyprolin bằng prolin, và glyxin bằng hydroxyprolin trong phương pháp tổng hợp Hyp-Gly được giải thích nêu trên.

Như đã nêu trên, Pro-Hyp có thể là dạng đã cải biến hóa học. Các kỹ thuật cải biến hóa học peptit thông thường được áp dụng cho các biện pháp và điều kiện xử lý cải biến hóa học cụ thể.

Đối với cải biến hóa học nhóm α -amino của gốc prolin, ví dụ, có thể tiến hành polypeptidyl hóa bằng phản ứng với N-carboxylic anhydrit, và có thể tiến hành succinyl hóa và maleyl hóa bằng phản ứng với succinic anhydrit hoặc maleic anhydrit ở độ pH gần bằng 8, và có thể tiến hành axetyl hóa bằng phản ứng với N-hydroxysuccinimit axetat gần trung tính, và tiến hành khử amin hóa bằng cách tạo ra phản ứng với axit có nitơ, và có thể tiến hành benzoyl hóa bằng cách tạo ra phản ứng với benzoyl clorua hoặc benzoic anhydrit, và có thể tiến hành alkylsulfonyl hóa hoặc arylsulfonyl hóa bằng phản ứng với benzensulfonyl clorua, p-toluensulfonyl clorua, hoặc metansulfonyl clorua, và có thể tiến hành dinitrophenyl hóa hoặc trinitrophenyl hóa bằng cách tạo ra phản ứng với 2,4-dinitroflobenzen hoặc axit 2,4,6-trinitrobenzensulfonic, và có thể tiến hành carbamyl hóa hoặc phenylcarbamyl hóa bằng cách tạo ra phản ứng với axit xyanic, và có thể tiến hành thiol hóa bằng cách tạo ra phản ứng với N-axetylhomoxystinthiolacton, S-axetylmercaptosuccinic anhydrit, axit thioparaconic, hoặc S-axetylthioitamalic anhydrit.

Đối với cải biến hóa học nhóm α -carboxyl của gốc hydroxyprolin, ví dụ, có thể tiến hành este hóa bằng cách cho khí hydro clorua khô đi qua metanol sau khi tạo huyền phù, và có thể tiến hành amit hóa bằng cách tạo ra phản ứng với carbodiimit.

Đối với cải biến hóa học nhóm hydroxyl của gốc hydroxyprolin, ví dụ, có thể tiến hành axetyl hóa ở vị trí O bằng cách tạo ra phản ứng với axit axetic

khan trong dung môi nước hoặc trong dung môi không phải nước.

Giống như các ví dụ cụ thể khác về cải biến hóa học, có thể áp dụng các kỹ thuật cải biến hóa học như được mô tả trong tài liệu JP-B-62-044522 và JP-B-05-079046.

Về việc mô tả chi tiết chất ức chế bệnh chứa Pro-Hyp làm thành phần hữu hiệu, do các mô tả này là giống với các mô tả về chất ức chế bệnh chứa Hyp-Gly làm thành phần hữu hiệu mà đã được mô tả nêu trên, nên sự giải thích về chất ức chế bệnh chứa Pro-Hyp được bỏ qua.

Ala-Hyp

Ala-Hyp nêu trên có các chức năng ức chế các triệu chứng của bệnh chẳng hạn như viêm xương khớp không chỉ trong trường hợp mà Ala-Hyp được sử dụng kết hợp với Hyp-Gly, mà còn trong trường hợp sử dụng một mình Ala-Hyp.

Dưới đây, Ala-Hyp này được mô tả chi tiết. Tuy nhiên, vì phần lớn các đối tượng của việc giải thích này trùng lặp với sự giải thích về Hyp-Gly và Pro-Gly nêu trên, nên chủ yếu các điểm khác nhau sẽ được giải thích.

Trong Ala-Hyp, đơn vị alanin và/hoặc đơn vị hydroxyprolin có thể được cải biến hóa học. Cụ thể là, đối với đơn vị hydroxyprolin, hoặc một trong hai hoặc cả hai nhóm carboxyl và nhóm hydroxyl có thể được cải biến hóa học.

Do đó, trong bản mô tả sáng chế, nếu thuật ngữ "dipeptit có cấu trúc Ala-Hyp" hoặc thuật ngữ viết tắt "Ala-Hyp" được đề cập, thì thuật ngữ này bao gồm cả dạng đã được cải biến hóa học và dạng không được cải biến hóa học.

Trong trường hợp mà Ala-Hyp được cải biến hóa học, Ala-Hyp có thể hòa tan trong dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ axit yếu đến trung tính, và nhờ đó cũng hi vọng tăng cường tính tương đồng với các thành phần hữu hiệu khác. Về cơ bản, có thể tiến hành các cải biến hóa học giống như các cải biến nêu trên về Pro-Hyp. Cụ thể, đối với nhóm α -amino của gốc alanin, có

thể tiến hành các cải biến hóa giống các cải biến hóa học nêu trên về nhóm α -amino của gốc prolin trong Pro-Hyp. Đối với nhóm α -amino và nhóm hydroxyl của gốc hydroxyprolin, có thể tiến hành các cải biến hóa học giống các cải biến hóa học nêu trên về nhóm α -amino và nhóm hydroxyl của gốc hydroxyprolin trong Pro-Hyp. Có thể chọn các cải biến hóa học thích hợp theo loại thành phần hữu hiệu khác.

Tỷ lệ trong đó Ala-Hyp nêu trên chứa trong chất ức chế bệnh và lượng Ala-Hyp trong trường hợp mà chất ức chế bệnh được sử dụng bằng cách tiêm vào phần khớp có thể giống tỷ lệ và lượng đã đề cập cho Hyp-Gly.

Tương tự với Hyp-Gly, Ala-Hyp nêu trên có thể thu được bằng cách xử lý collagen hoặc gelatin bằng enzym gồm hai bước riêng biệt hoặc được tổng hợp từ axit amin. Đối với cải biến hóa học, đề xuất các biện pháp đã biết như nêu dưới đây.

Phương pháp xử lý bằng enzym thu được Ala-Hyp, về cơ bản, có thể là phương pháp giống như phương pháp xử lý bằng enzym gồm hai bước đã áp dụng cho Hyp-Gly. Tuy nhiên, đối với phương pháp xử lý bằng enzym lần thứ hai, ví dụ, enzym có hoạt tính proteinaza và hoạt tính hydroxyprolinaza thu được từ *Aspergillus* được sử dụng.

Tương tự với Hyp-Gly, Ala-Hyp có thể được tổng hợp từ các axit amin. Tuy nhiên, trong trường hợp này, đủ để thay thế dễ dàng hydroxyprolin bằng alanin, và glyxin bằng hydroxyprolin, trong phương pháp tổng hợp Hyp-Gly nêu trên.

Như đã nêu trên, Ala-Hyp có thể là dạng được cải biến hóa học. Đối với các biện pháp và điều kiện xử lý cải biến hóa học cụ thể, các kỹ thuật cải biến hóa học peptit thông thường được áp dụng. Đối với nhóm α -amino của gốc alanin, có thể tiến hành các cải biến hóa học giống như các cải biến hóa học nêu trên ở nhóm α -amino của gốc prolin trong Pro-Hyp. Đối với nhóm α -amino và nhóm hydroxyl của gốc hydroxyprolin, có thể tiến hành các cải biến hóa học giống các cải biến hóa học nêu trên ở nhóm α -amino và nhóm

hydroxyl của gốc hydroxyprolin trong Pro-Hyp.

Đối với việc mô tả chi tiết về chất ức chế bệnh chứa Ala-Hyp làm thành phần hữu hiệu, vì các mô tả chi tiết này là tương tự với các mô tả chi tiết mà đã được đề cập ở chất ức chế bệnh chứa Hyp-Gly làm thành phần hữu hiệu, nên không cần thuyết minh các mô tả chi tiết này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế được mô tả cụ thể hơn bởi các thử nghiệm đánh giá đặc tính dipeptit theo sáng chế hoặc peptit collagen chứa dipeptit này và bằng các ví dụ về các hợp phần của chất ức chế bệnh mà chứa dipeptit nêu trên làm thành phần hữu hiệu. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này. Dưới đây, để thuận tiện, đơn vị "phần trọng lượng" có thể được gọi đơn giản là "các phần" và đơn vị "% trọng lượng" có thể được gọi đơn giản là "%".

Dipeptit

Ví dụ 1

Hyp-Gly được tổng hợp bằng phương pháp tổng hợp trong pha rắn nêu trên.

Tức là, các hạt gel polyme polystyren có đường kính 0,1mm mà có bề mặt đã được cải biến bằng nhóm amino được sử dụng làm pha rắn, và 45 phần glyxin được liên kết (được liên kết bằng liên kết peptit) với 45 phần hydroxyprolin (mà nhóm amino được bảo vệ bằng nhóm Fmoc (florenyl-methoxy-carbonyl)) bằng phản ứng loại nước sử dụng 10 phần diisopropylcarbodiimide (DIC) làm chất ngưng tụ, và sau đó pha rắn được rửa kỹ bằng dung môi (rượu etylic) để loại bỏ glyxin còn thừa. Sau đó, nhóm bảo vệ gốc hydroxyprolin mà đã liên kết với pha rắn được loại bỏ (khử bảo vệ) bằng cách ngâm trong axit trifloaxetic, sao cho Hyp-Gly được tổng hợp.

Đối với sự tổng hợp dipeptit này, hệ thống tổng hợp peptit tự do (do CEM sản xuất) được sử dụng.

Ví dụ 2

Hỗn hợp chứa Hyp-Gly nêu trong ví dụ 1 và Pro-Hyp nêu trong ví dụ tham

khảo 1-1 dưới đây với tỷ lệ 1:1 (tính theo trọng lượng) được lấy làm ví dụ 2.

Ví dụ 3

Hỗn hợp chứa Hyp-Gly thu được từ ví dụ 1, Pro-Hyp nêu trong ví dụ tham khảo 1-1 dưới đây và Ala-Hyp nêu trong ví dụ tham khảo 1-2 dưới đây với tỷ lệ 1:1:1 (tính theo trọng lượng) được lấy làm ví dụ 3.

Ví dụ tham khảo 1-1

Pro-Hyp được tổng hợp theo cách giống như phương pháp tổng hợp Hyp-Gly nêu trên ngoại trừ hydroxyprolin được thay thế bằng prolin, glyxin được thay bằng hydroxyprolin. Pro-Hyp thu được được lấy làm ví dụ tham khảo 1-1.

Ví dụ tham khảo 1-2

Ala-Hyp được tổng hợp theo cách giống như phương pháp tổng hợp Hyp-Gly nêu trên ngoại trừ hydroxyprolin được thay thế bằng alanin, và glyxin được thay thế bằng hydroxyprolin. Ala-Hyp thu được được lấy làm ví dụ tham khảo 1-2.

Ví dụ so sánh 1

Leu-Hyp được tổng hợp theo cách giống như phương pháp tổng hợp Hyp-Gly nêu trên ngoại trừ hydroxyprolin được thay bằng leuxin, và glyxin được thay bằng hydroxyprolin. Leu-Hyp thu được được lấy làm ví dụ so sánh 1.

Ví dụ so sánh 2

Phe-Hyp được tổng hợp theo cách giống như phương pháp tổng hợp Hyp-Gly nêu trên ngoại trừ là hydroxyprolin được thay thế bằng phenylalanin, và glyxin được thay thế bằng hydroxyprolin. Phe-Hyp thu được được lấy làm ví dụ so sánh 2.

Ví dụ so sánh 3

Ser-Hyp được tổng hợp theo cách giống như phương pháp tổng hợp Hyp-Gly nêu trên ngoại trừ hydroxyprolin được thay thế bằng serin, và glyxin được

thay thế bằng hydroxyprolin. Ser-Hyp thu được được lấy làm ví dụ so sánh 3.

Tripeptit

Ví dụ so sánh 4

Pro-Hyp-Gly được tổng hợp theo cách giống như phương pháp tổng hợp Hyp-Gly nêu trên ngoại trừ là hydroxyprolin được thay thế bằng prolin, và glyxin được thay thế bằng Hyp-Gly tổng hợp trong ví dụ 1. Pro-Hyp-Gly thu được được lấy làm ví dụ so sánh 4.

Axit amin

Ví dụ so sánh 5 và 6

Prolin là axit amin được lấy làm ví dụ so sánh 5, và hydroxyprolin được lấy làm ví dụ so sánh 6.

peptit collagen

Ví dụ 4

Peptit collagen (PC) có nguồn gốc từ da lợn chứa Hyp-Gly được tổng hợp bằng phương pháp dưới đây và được lấy làm ví dụ 4.

1kg gelatin (colagen typ I) là sản phẩm bị thoái hóa bởi nhiệt của collagen có nguồn gốc từ da lợn được hòa tan trong 4l nước ấm 75°C, và điều chỉnh nhiệt độ xuống 60°C, và sau đó là phản ứng thứ nhất, bổ sung 10g proteaza thu được từ *Aspergillus* màu vàng, và giữ hệ này ở pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 và ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45 đến 55°C trong 120 phút, nhờ đó phản ứng thủy phân bằng enzym được thực hiện. Tiếp theo, là phản ứng bằng enzym lần hai, enzym được chiết từ *Aspergillus oryzae* có hoạt tính hydroxyprolidaza được bổ sung để thu được nồng độ cuối là 1,5%, sao cho hòa tan được nguyên liệu này. Sau đó, nguyên liệu này được để phản ứng ở nhiệt độ 50°C trong 6 giờ. Sau phản ứng này, xử lý dung dịch phản ứng bằng nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong 10 phút và sau đó làm nguội đến 60°C và lọc bằng than hoạt và chất trợ lọc (diatomit), và dung dịch cái thu được được vô trùng bằng nhiệt độ cao ở nhiệt độ 120°C trong 3 giây. Sau đó, dung dịch cái đã vô

trùng được sấy phun, sao cho thu được peptit collagen có nguồn gốc từ da lợn (PC).

PC này được tiến hành sắc ký lớp mỏng (thin layer chromatography-TLC). Tức là, 10 μ g PC đã hòa tan trong nước được thêm nhỏ giọt (ban đầu là vết) lên đĩa TLC (tên thương mại: "xenluloza F", do Merck sản xuất) và được làm khô và sau đó được giải hấp bằng dung môi (n-butanol: axit axetic: nước =4:1:2). Đĩa này được làm khô trong không khí và sau đó phun chất màu isatin-kẽm axetat (được điều chế bằng cách hòa tan 1g isatin và 1,5g kẽm axetat vào 100ml isopropanol trong điều kiện gia nhiệt và, sau đó làm nguội, bổ sung 1ml axit axetic), nhờ đó khẳng định rằng giá trị Rf {[khoảng cách từ điểm ban đầu đến điểm có màu]/[khoảng cách từ điểm ban đầu đến trước điểm giải hấp dung môi]} của vết màu xanh của PC thu được trên đây bao gồm giá trị Rf của vết màu xanh của Hyp-Gly trong số Hyp-Gly và Pro-Hyp mà là các chất chỉ thị nội được chấm vào đĩa này, nói cách khác, PC này chứa Hyp-Gly.

Ngoài ra, tổng (Y) các trình tự của Hyp-Gly chứa trong collagen typ I có nguồn gốc từ da lợn (có trọng lượng (X)g) mà đã biết trình tự axit amin được đếm, và lượng Hyp-Gly theo lý thuyết trong toàn bộ collagen typ I được xác định bằng công thức dưới đây, sao cho lượng này bằng 20,0% trọng lượng.

$$((\text{Số (Y) của Hyp-Gly}) \times (\text{trọng lượng (trọng lượng phân tử) của Hyp-Gly})) / (\text{trọng lượng (X) của tất cả các trình tự})$$

Từ công thức nêu trên, có thể kết luận rằng PC nêu trên chứa Hyp-Gly về mặt lý thuyết với tỷ lệ tối đa là 20,0% trọng lượng.

Ví dụ 5

Peptit collagen có nguồn gốc từ vây cá (FC) chứa Hyp-Gly thu được theo cách giống như quy trình sản xuất PC nêu trên ngoại trừ sử dụng gelatin có nguồn gốc từ vây cá. Peptit collagen này được lấy làm ví dụ 5.

FC này được phân tích bằng TLC theo cách giống như trường hợp của PC nêu trên. Kết quả là, sự có mặt của Hyp-Gly được khẳng định.

Ngoài ra, tổng (Y) các trình tự của Hyp-Gly được chứa trong collagen typ I có nguồn gốc từ vây cá (trọng lượng (X) g) mà đã biết trình tự axit amin được đếm, và lượng theo lý thuyết của Hyp-Gly trong toàn bộ collagen typ I được xác định từ công thức dưới đây, sao cho lượng này bằng 23,5% trọng lượng.

$$((\text{Số (Y) của Hyp-Gly}) \times (\text{trọng lượng (trọng lượng phân tử) của Hyp-Gly})) / (\text{trọng lượng (X) của tất cả các trình tự})$$

Từ công thức trên đây, có thể kết luận rằng FC nêu trên chứa Hyp-Gly về mặt lý thuyết với tỷ lệ tối đa là 23,5% trọng lượng.

Ví dụ 6

Peptit collagen có nguồn gốc từ da lợn (PC-CP) chứa Hyp-Gly thu được bằng phương pháp dưới đây được lấy làm ví dụ 6.

Lượng 1kg gelatin (collagen typ I) là sản phẩm bị thoái hóa bởi nhiệt của collagen có nguồn gốc từ da lợn được hòa tan trong 4l dung dịch đệm Tris-HCl 20mM (pH 7,5) đồng thời đun nóng và sau đó làm nguội đến nhiệt độ 40°C, và sau đó là phản ứng bằng enzym lần thứ nhất, bổ sung 1g collagenaza (Collagenaza N2, do Nitta Gelatin, Inc. sản xuất), và giữ hệ này ở pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,8 và ở nhiệt độ 40°C trong 24 giờ, nhờ đó phương pháp xử lý phân hủy bằng enzym được thực hiện. Tiếp đó, là phản ứng bằng enzym lần thứ hai, enzym được chiết từ *Aspergillus niger* có hoạt tính hydroxyprolidaza được bổ sung vào dung dịch phản ứng thu được đến nồng độ cuối bằng 1,0%, sao cho nguyên liệu này được hòa tan. Sau đó, cho nguyên liệu này phản ứng ở pH 4,0 và ở nhiệt độ 50°C trong 6 giờ. Sau phản ứng này, xử lý dung dịch phản ứng này bằng nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong 10 phút và sau đó làm nguội đến 60°C và sau đó lọc bằng than hoạt và chất trợ lọc (diatomit), và vô trùng dung dịch cái thu được ở nhiệt độ cao ở nhiệt độ 120°C trong 3 giây. Sau đó, dung dịch cái đã vô trùng được sấy phun, sao cho thu được PC-CP.

Ngoài ra, PC-CP này được phân tích bằng TLC theo cách giống như trường hợp của PC nêu trên. Kết quả là, sự có mặt của Hyp-Gly

được khẳng định.

Ngoài ra, tổng (Y) các trình tự của the Hyp-Gly chứa trong collagen typ I có nguồn gốc từ da lợn (trọng lượng (X) g) mà đã biết trình tự axit amin được đếm, và lượng theo lý thuyết của Hyp-Gly trong toàn bộ collagen typ I được xác định bằng công thức dưới đây, sao cho lượng này bằng 20,0% trọng lượng.

$$((\text{Số (Y) Hyp-Gly}) \times (\text{trọng lượng (trọng lượng phân tử) của Hyp-Gly})) / (\text{trọng lượng (X) của tất cả các trình tự})$$

Từ quan điểm nêu trên, có thể kết luận rằng PC-CP nêu trên chứa Hyp-Gly về mặt lý thuyết với tỷ lệ tối đa là 20,0% trọng lượng.

Ví dụ 7

Peptit collagen có nguồn gốc từ da lợn (PC-PH) chứa Hyp-Gly và Pro-Hyp thu được bằng phương pháp dưới đây được lấy làm ví dụ 7.

Lượng 1kg gelatin (collagen typ I) là sản phẩm bị thoái hóa bởi nhiệt của collagen có nguồn gốc từ da lợn được hòa tan trong 4l nước ấm 75°C, và điều chỉnh nhiệt độ của nước này xuống 60°C, và sau đó là phản ứng bằng enzym lần thứ nhất, bổ sung 10g proteaza có nguồn gốc từ *Aspergillus* màu vàng, và giữ hệ này ở pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45 đến 55°C trong 120 phút, nhờ đó phương pháp xử lý thủy phân bằng enzym được thực hiện. Tiếp đó, là phản ứng bằng enzym lần thứ hai, enzym được chiết từ *Aspergillus niger* có hoạt tính prolidaza và hoạt tính hydroxyprolidaza được bổ sung đến nồng độ cuối bằng 1,5%, sao cho nguyên liệu này được hòa tan. Sau đó, nguyên liệu này được để phản ứng ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,5 và ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45 đến 50°C trong 6 giờ. Sau phản ứng này, dung dịch phản ứng này được xử lý bằng nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong 10 phút và sau đó làm nguội đến 60°C và sau đó lọc bằng than hoạt và chất trợ lọc (diatomit), và dung dịch cái thu được được vô trùng ở nhiệt độ cao ở 120°C trong 3 giây. Sau đó, dung dịch cái đã vô trùng được sấy khô, sao cho thu được PC-PH.

Ngoài ra, PC-PH này được phân tích bằng TLC theo cách giống như trường hợp của PC nêu trên. Kết quả là, giá trị R_f của vết PC-PH màu xanh bao gồm giá trị R_f của mỗi vết Hyp-Gly và Pro-Hyp màu xanh, sao cho khẳng định được rằng PC-PH chứa cả Hyp-Gly và Pro-Hyp.

Ví dụ so sánh 7

Peptit collagen (PC-CP-Cont) không chứa Hyp-Gly và Pro-Hyp thu được bằng cách chỉ tiến hành phản ứng bằng enzym lần thứ nhất trong quá trình sản xuất PC-CP nêu trên được lấy làm ví dụ so sánh 7.

Tức là, 1kg gelatin (Collagen typ I) là sản phẩm bị thoái biến bởi nhiệt của collagen có nguồn gốc từ da lợn được hòa tan trong 4l dung dịch đệm Tris-HCl 20mM (pH 7,5) đồng thời đun nóng và sau đó làm nguội đến 40°C, và sau đó là phản ứng enzym lần thứ nhất, bổ sung 1g collagenaza (Collagenase N2, do Nitta Gelatin, Inc. sản xuất), và giữ hệ này ở pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,8 và ở nhiệt độ 40°C trong 24 giờ, nhờ đó phương pháp xử lý phân hủy bằng enzym được tiến hành. Tiếp đó, dung dịch thu được bằng cách thủy phân bằng enzym được đun nóng đến nhiệt độ 100°C trong 10 phút và sau đó làm nguội xuống 60°C và sau đó lọc bằng than hoạt và chất trợ lọc (diatomit), và dung dịch cái thu được được vô trùng ở nhiệt độ cao ở nhiệt độ 120°C trong 3 giây. Sau đó, dung dịch cái đã vô trùng này được sấy khô, sao cho thu được PC-CP-Cont.

Ngoài ra, PC-CP-Cont được phân tích bằng TLC theo cách giống như trường hợp của PC nêu trên. Kết quả là, sự có mặt của Hyp-Gly và Pro-Hyp không được khẳng định.

Các thử nghiệm đánh giá đặc tính

Các mô tả chi tiết về các thử nghiệm đánh giá đặc tính các dipeptit, tripeptit, axit amin và peptit collagen nêu trong các ví dụ 1 đến 7, các ví dụ tham khảo 1-1 và 1-2 và các ví dụ so sánh từ 1 đến 7 được thể hiện dưới đây.

Thử nghiệm đánh giá 1-1: ức chế sự biệt hóa và hoạt hóa các tế bào hủy xương

Tiến hành đánh giá theo phương pháp nuôi cấy biệt hóa tế bào hủy xương của Kobayashi Y. và các đồng tác giả [J. Bone Miner. Metab. (2004) 22: p. 318-328].

Tức là, Hyp-Gly và hỗn hợp Hyp-Gly và Pro-Hyp có tỷ lệ 1:1 được sử dụng, và mỗi thành phần trong số hai thành phần này được bổ sung vào dung dịch nuôi cấy tế bào tủy xương của chuột nguyên thủy sao cho nồng độ cuối là $625\mu\text{M}$. Sau 6 ngày nuôi cấy, kiểm tra mỗi hoạt tính ức chế của phosphatase axit kháng axit tartaric (tartaric acid resistant acid phosphatase-TRAP) là enzym chỉ thị. Theo cách này, hoạt tính ức chế TRAP khi sử dụng các dipeptit khác (Pro-Hyp, Ala-Hyp, Leu-Hyp, Phe-Hyp, Ser-Hyp), tripeptit (Pro-Hyp-Gly) và các axit amin (Pro, Hyp) được kiểm tra. Hơn thế nữa, hoạt tính ức chế TRAP khi không bổ sung peptit (trống) cũng được kiểm tra làm mẫu đối chứng.

Ngoài ra, mức độ ức chế sự biệt hóa và hoạt hóa tế bào hủy xương bởi các peptit và axit amin khác nhau được đánh giá bằng thử nghiệm Pit dưới đây. Tức là, thử nghiệm Pit mà nuôi cấy các tế bào hủy xương trên các mảnh nguyên bào tạo ngà được thực hiện theo Kakudo S, et al. (1996). J. Bone Miner. Metab. 14: 129-136, cụ thể là như dưới đây.

Các tiền tế bào của tế bào hủy xương thu được từ xương ruột của chuột non được bảo quản đông lạnh ở nhiệt độ -80°C cùng với huyền dịch chứa các tế bào đệm tủy xương có mặt DMSO 10%, nhờ đó tiêu diệt được các tế bào hủy xương đã trưởng thành.

Các tế bào này với lượng $2,0 \times 10^5$ được nuôi vào mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ mà đã được đặt các lát ngà răng, và mỗi peptit đã kiểm tra được bổ sung vào dung dịch nuôi cấy, và tiến hành nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 5% CO_2 trong khoảng 1 tuần. Sau đó, loại các tế bào ra khỏi các lát ngà răng bằng miếng cọ bằng silicon POLICEMAN, và sau đó các lát ngà răng được nhuộm bằng dung dịch axit hematoxylin trong vài phút. Sau đó, số tế bào khổng lồ đa nhân dương tính với việc nhuộm TRAP (các tế bào hủy xương) được đếm bằng

cách nhuộm bằng TRAP, và số tương ứng với số tế bào trong mẫu đối chứng (trống) được tính toán. Sau đó, số lỗ (số lỗ hấp thu) bởi các tế bào hủy xương được đếm dưới kính hiển vi, và mức ức chế hoạt tính của tế bào hủy xương của mỗi peptit kiểm tra được thể hiện bằng tỷ lệ tương đối so với mẫu trống (mẫu đối chứng).

Các kết quả được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1

	Số tế bào không lồ đa nhân dương tính với TRAP tương đối (tế bào hủy xương) trong môi trường nuôi cấy trên đĩa Petri bằng nhựa	Diện tích tương đối (%) của các tế bào không lồ đa nhân dương tính với TRAP (tế bào hủy xương) trong môi trường nuôi cấy trên đĩa petri bằng nhựa	Số tế bào không lồ đa nhân dương tính với TRAP (tế bào hủy xương) tương đối (%) trong môi trường nuôi cấy trên các lát ngà răng	Số lỗ tương đối (%)
Đối chứng (trống)	100	100	100	100
Ví dụ 1	9 ± 2 ^{**}	7 ± 1 ^{**}	9 ± 5 ^{**}	2 ± 2 ^{**}
Ví dụ 2	11 ± 1 ^{**}	8 ± 3 ^{**}	3 ± 3 ^{**}	0 ^{**}
Ví dụ tham khảo 1-1	130 ± 9 [*]	120 ± 12 [*]	17 ± 6 ^{**}	9 ± 2 ^{**}
Ví dụ tham khảo 1-2	102 ± 4	110 ± 31	89 ± 13	101 ± 12
Ví dụ so sánh 1	88 ± 22	83 ± 27	101 ± 12	91 ± 1
Ví dụ so sánh 2	119 ± 16	118 ± 21	98 ± 11	109 ± 15
Ví dụ so sánh 3	96 ± 5	91 ± 10	105 ± 4	98 ± 12
Ví dụ so sánh 4	109 ± 15	113 ± 11	91 ± 11	97 ± 13
Ví dụ so sánh 5	119 ± 44	125 ± 69	119 ± 20	121 ± 23
Ví dụ so sánh 6	126 ± 4 [*]	117 ± 13 [*]	141 ± 9 [*]	131 ± 11 [*]

Số thử nghiệm : n=6

Lưu ý) **: Có sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng.

(p<0,01)

*: Có sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng.

(p<0,05)

Thử nghiệm đánh giá 1-2: thúc đẩy sự biệt hóa và hoạt hóa các tế bào tạo xương

Mỗi chất trong số các chất dexamethason (nồng độ cuối: 1nmol/l), axit β -glyxerophosphoric (nồng độ cuối: 5mmol/l), và axit ascorbic (nồng độ cuối: 100 μ g/ml) được bổ sung vào dung dịch nuôi cấy tế bào tạo xương gốc MC3T3-E1, sau đó Hyp-Gly và hỗn hợp chứa Hyp-Gly và Pro-Hyp có tỷ lệ 1:1 được sử dụng, và mỗi thành phần trong số chúng được bổ sung vào dung dịch nuôi cấy nêu trên sao cho nồng độ cuối là 2,5mmol/l. Sau 10 ngày nuôi cấy, mỗi hoạt tính thúc đẩy của phosphatase kiềm (ALP) là enzym chỉ thị của sự biệt hóa và canxi hóa các tế bào tạo xương được kiểm tra. Theo cách này, hoạt tính thúc đẩy ALP khi sử dụng các dipeptit khác (Pro-Hyp, Ala-Hyp, Leu-Hyp, Phe-Hyp, Ser-Hyp), tripeptit (Pro-Hyp-Gly) và các axit amin (Pro, Hyp) được kiểm tra. Hơn thế nữa, hoạt tính thúc đẩy của ALP khi không bổ sung peptit (trống) cũng được kiểm tra làm mẫu đối chứng. Các kết quả được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2

		Giá trị tương đối (%) của ALP
Đối chứng (trống)		100
Ví dụ 1	Hyp-Gly	140 $\pm$ 24**
Ví dụ 2	(Hyp-Gly)+(Pro-Hyp)	151 $\pm$ 17**
Ví dụ tham khảo 1-1	Pro-Hyp	115 $\pm$ 25
Ví dụ tham khảo 1-2	Ala-Hyp	112 $\pm$ 31
Ví dụ so sánh 1	Leu-Hyp	92 $\pm$ 12
Ví dụ so sánh 2	Phe-Hyp	109 $\pm$ 11
Ví dụ so sánh 3	Ser-Hyp	91 $\pm$ 21
Ví dụ so sánh 4	Pro-Hyp-Gly	103 $\pm$ 22
Ví dụ so sánh 5	Pro	97 $\pm$ 15
Ví dụ so sánh 6	Hyp	103 $\pm$ 25

Số thử nghiệm : n=6

Lưu ý) **: Có sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng.
($p < 0,01$)

Thử nghiệm đánh giá 1-3: ức chế sự thoái hóa các tế bào sụn

Hyp-Gly, hỗn hợp chứa Hyp-Gly và Pro-Hyp theo tỷ lệ 1:1 và hỗn hợp chứa Hyp-Gly, Pro-Hyp và Ala-Hyp theo tỷ lệ 1:1:1 được sử dụng, và mỗi dipeptit được bổ sung vào dung dịch nuôi cấy tiền tế bào sụn gốc ATDC5 đến nồng độ cuối bằng 2,5mmol/l. Sau 5 ngày nuôi cấy, mỗi hoạt tính ức chế của phosphatase kiềm (ALP) là enzym chỉ thị cho các sụn phôi đại và canxi hóa được thử nghiệm. Theo cách này, hoạt tính ALP khi sử dụng các dipeptit khác (Pro-Hyp, Ala-Hyp, Leu-Hyp, Phe-Hyp, Ser-Hyp), tripeptit (Pro-Hyp-Gly) và các axit amin (Pro, Hyp) được thử nghiệm. Hơn thế nữa, hoạt tính ALP khi không bổ sung peptit (trống) cũng được thử nghiệm làm mẫu đối chứng. Các kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3

		Giá trị tương đối (%) của ALP
Đối chứng (trống)		100
Ví dụ 1	Hyp-Gly	76±21*
Ví dụ 2	(Hyp-Gly)+(Pro-Hyp)	9±3**
Ví dụ 3	(Hyp-Gly)+(Pro-Hyp)+(Ala-Hyp)	7±2**
Ví dụ tham khảo 1-1	Pro-Hyp	12±2**
Ví dụ tham khảo 1-2	Ala-Hyp	17±6**
Ví dụ so sánh 1	Leu-Hyp	93±12
Ví dụ so sánh 2	Phe-Hyp	109±11
Ví dụ so sánh 3	Ser-Hyp	91±21
Ví dụ so sánh 4	Pro-Hyp-Gly	84±14
Ví dụ so sánh 5	Pro	98±10
Ví dụ so sánh 6	Hyp	101±1

Số thử nghiệm: n=6

Lưu ý) **: Có sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng.
($p < 0,01$)

*: Có sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng. ($p < 0,05$)

Thử nghiệm đánh giá 1-4: thu hồi lượng tropocolagen ở chân bì da

Chuột đực chủng Wister (140g) ban đầu được nuôi bằng thức ăn rắn sẵn có trên thị trường (loại MF, do ORIENTAL YEAST Co., Ltd. sản xuất) trong 3 ngày, và sau đó thay thức ăn này bằng casein để làm tổn thương da sau 3 ngày.

Việc làm tổn thương da nói trên được gây ra bằng cách cạo lông ở phần bụng của mỗi con chuột trong ba ngày. Cụ thể là, tiêm Nembutal (4mg/0,08ml/100g thể trọng) vào ổ bụng của mỗi con chuột để gây mê chuột, và sau đó cắt lông bằng kéo cắt tóc ở phần bụng (3x5cm). Ngoài ra, có thể sử dụng chất gây rụng lông sẵn có trên thị trường (kem gây rụng lông Epilat, do Kanebo Co. sản xuất), và sau đó phần bụng được để trong 5 phút và sau đó cạo cẩn thận bằng dao cạo. Tiến hành phương pháp xử lý này một lần một ngày liên tục trong ba ngày bắt đầu từ 3 ngày trước khi bắt đầu lấy mẫu da.

Nhóm thử nghiệm được chia làm nhóm nuôi bằng casein, nhóm Hyp-Gly, nhóm (Hyp-Gly)+(Pro-Hyp) (hỗn hợp chứa Hyp-Gly và Pro-Hyp có tỷ lệ 1:1), nhóm PC, nhóm FC, nhóm PC-CP, và nhóm PC-PH, và tất cả các nhóm được đánh giá bằng sự thay đổi lượng collagen ở da (tỷ lệ so với tổng lượng collagen) trong quá trình phục hồi tổn thương da vào ngày cạo lông (0 ngày sau khi cạo lông), sau 1 ngày kể từ ngày cạo lông, sau 2 ngày kể từ ngày cạo lông và sau 4 ngày kể từ ngày cạo lông.

Các chế phẩm nuôi dùng trong các nhóm được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4

Thành phần	Đối chứng (nuôi bằng casein)	Hyp-Gly	(Hyp-Gly) + (Pro-Hyp)	PC	FC	PC-CP	PC-PH
Casein	150	145	145	100	100	100	101
Hyp—Gly	—	5	2,5	—	—	—	--
Pro—Hyp	—	—	2,5	—	—	—	—
Peptit collagen	—	—	—	50	50	50	50
Tinh bột ngô α	735	735	735	735	735	735	735
Dầu ngô	50	50	50	50	50	50	50
Xenluloza	20	20	20	20	20	20	20
Hỗn hợp khoáng	35	35	35	35	35	35	35
Hỗn hợp vitamin	10	10	10	10	10	10	10
Tổng số	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Chuột được nuôi bằng các chế phẩm nuôi nêu trên, và nước và thức ăn được cung cấp tự do trong suốt giai đoạn nuôi.

Hơn thế nữa, đối với nhóm Hyp-Gly, nhóm (Hyp-Gly) + (Pro-Hyp) (hỗn hợp chứa Hyp-Gly và Pro-Hyp theo tỷ lệ 1:1), nhóm PC, nhóm FC, nhóm PC-CP, và nhóm PC-PH, 10g mỗi chất trong số các chất Hyp-Gly, PC, FC, PC-CP, và PC-PH chứa trong các thức ăn được cân chính xác và sau đó hòa tan và giữ nhiệt bằng 20ml nước cất và tiêm vào bụng của chuột trong mỗi nhóm thử nghiệm bằng một ống thông một lần một ngày vào buổi trưa.

Các kết quả của phép đo sự thay đổi lượng collagen ở da (tỷ lệ so với tổng lượng collagen) trong quá trình phục hồi da bị tổn thương ở mỗi nhóm được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5

	Sự thay đổi lượng collagen ở da (tỷ lệ so với tổng lượng collagen) (%) trong quá trình phục hồi da bị tổn thương				
	Không xử lý	0 ngày sau khi cạo lông	1 ngày sau khi cạo lông	2 ngày sau khi cạo lông	4 ngày sau khi cạo
Đối chứng (nuôi bằng casein)	8,2±0,6 ^a	2,9±0,3 ^b	2,5±0,2 ^b	2,6±0,3 ^b	3,1±0,4 ^b
Ví dụ 1	Hyp-Gly	8,2±0,6 ^a	2,4±0,2 ^b	3,1±0,3 ^o _b	4,0±0,2 ^c
Ví dụ 2	(Hyp-Gly) + (Pro-Hyp)	8,2±0,6 ^a	2,3±0,1 ^b	3,2±0,2 ^c	4,3±0,3 ^c
Ví dụ 4	PC	8,2±0,6 ^a	2,1 ±0,3 ^b	2,3±0,1 ^c _b	3,1±0,3 ^c
Ví dụ 5	FC	8,2±0,6 ^a	2,6±0,3 ^b	2,5±0,3 ^b	3,5±0,2 ^c
Ví dụ 6	PC-CP	8,2±0,6 ^a	2,5±0,1 ^b	3,1±0,4 ^c _b	3,8±0,1 ^c
Ví dụ 7	PC-PH	8,2±0,6 ^a	2,3±0,2 ^b	3,2±0,2 ^c	4,1±0,4 ^c

Số chuột thử nghiệm : n=4

Lưu ý) có sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê giữa các chữ cái. (p<0,05)

•(Lưu ý) : Tỷ lệ tropocolagen ở da (%)= $\frac{\text{④} + \text{⑤} + \text{⑥} + \text{⑦}}{4} \times 100$

④ : lượng collagen hòa tan trong dung dịch nước NaCl 0,45M: lượng tropocolagen

⑤ : Lượng collagen hòa tan trong dung dịch nước axit axetic 0,5M: lượng collagen hòa tan trong axit

⑥ : Lượng collagen không tan trong dung dịch nước axit axetic 0,5M:lượng (collagen không tan trong axit = collagen liên kết ngang)

Do đó, việc định lượng collagen trong da hòa tan được tiến hành như sau.

Trong khi loại bỏ mỡ ở dưới da nhiều nhất có thể, da đã xử lý và da không xử lý được cắt. Cắt cẩn thận chúng thành các mảnh mỏng bằng kéo để phân tích kỹ, và cân chính xác khoảng từ 0,2 đến 0,3g các mảnh này và đưa vào ống kết tủa ly tâm có dung tích 14ml. Ngoài ra, bổ sung 4ml dung dịch natri clorua lạnh 0,45M, và tiến hành đồng nhất bằng thiết bị đồng nhất POLYTRON (tốc độ số 4) trong 20 giây đồng thời làm lạnh trên đá. Hơn thế nữa, 2ml dung dịch natri clorua lạnh 0,45M được bổ sung, và tiến hành chiết bằng thiết bị khuấy quay (do TAITEC sản xuất) trong phòng lạnh trong 24 giờ. Ly tâm một lượng 20.000g dịch chiết thu được bằng thiết bị ly tâm làm lạnh trong 20 phút, và lấy dịch nổi thu được ra và được ký hiệu là phần collagen hòa tan trong dung dịch nước muối trung hòa. Bổ sung 6ml axit axetic lạnh 0,5M vào phần ly tâm còn lại, và tiến hành chiết theo cách này trong 24 giờ. Ly tâm một lượng 20.000g dịch chiết thu được bằng axit axetic 0,5M bằng thiết bị ly tâm làm lạnh trong 20 phút, và lấy dịch nổi thu được ra và được ký hiệu là phần collagen hòa tan trong axit. Phần ly tâm còn lại được xác định là phần collagen không tan.

Bổ sung cùng một thể tích 5ml dung dịch axit clohydric đặc vào 5ml của mỗi phần collagen hòa tan trong dung dịch nước muối trung hòa và phần collagen hòa tan trong axit, và bổ sung 1ml axit clohydric đặc vào phần collagen không tan, và hòa tan các phần này bằng cách đun nóng ở nhiệt độ 60°C trong 5 phút và sau đó chuyển vào ống thử nghiệm bằng thủy tinh để thủy phân đồng thời rửa ba lần bằng 2ml axit clohydric 6N, và thủy phân ở nhiệt độ 110°C trong 24 giờ.

Sau đó, lượng hydroxyprolin chứa trong dung dịch đã thủy phân của mỗi phần collagen được định lượng bằng thiết bị đo màu, nhờ đó định lượng được mỗi phần collagen, và tỷ lệ tương đối của phần collagen hòa tan trong dung dịch nước muối trung hòa nêu trên so với tổng phần collagen được tính toán.

Định lượng lượng hydroxyprolin bằng phép đo màu nêu trên được tiến hành bằng phương pháp Firschein và Shill, cụ thể là như sau.

Bổ sung lượng 2ml 2-propanol vào 2ml dung dịch mẫu, và tiến hành khuấy đủ. Ngoài ra, bổ sung 0,5ml dung dịch chất oxy hóa cloramin T, và để yên hỗn hợp này chính xác trong 4 phút và sau đó làm lạnh trên đá. Bổ sung tiếp 5ml dung dịch p-dimetylaminobenzaldehyt, và khuấy hỗn hợp này vừa đủ và sau đó đun nóng trong bể nước sôi trong đúng 2 phút và ngay sau đó làm lạnh trên đá và sau đó định lượng bằng phép so màu ở bước sóng 575nm.

Dung dịch cloramin T được điều chế bằng cách hòa tan cloramin T (5g) vào 50ml nước cất và sau đó bảo quản trước trong tủ lạnh và sau đó, trước khi sử dụng, hòa tan bằng dung dịch đệm axit axetic (pH 6,0) theo tỷ lệ 1:4 và sau đó sử dụng. Ngoài ra, điều chế dung dịch p-dimetylaminobenzaldehyt (dung dịch Ehrlich) bằng cách bổ sung 22ml axit clohydric đặc vào 20g bột p-dimetylaminobenzaldehyt và hòa tan bột này bằng cách làm nóng trong nước sôi và ngay sau đó làm nguội dung dịch thu được này trong nước đá và bổ sung thêm 122ml 2-propanol và tiến hành hòa tan bằng cách khuấy.

Thử nghiệm đánh giá 1-5: khả năng hấp thụ ở ruột

Chuột đực chủng Wister (170g) được để cho nhịn đói một đêm và sau đó được đưa vào các thử nghiệm. Mỗi thành phần trong số Hyp-Gly, Pro-Hyp, Ala-Hyp và Ser Hyp được sử dụng với lượng 215nmol/10ml đối với một mẫu thử nghiệm và tiêm vào bụng.

Ống thông tim được lắp vào tim và tĩnh mạch cửa của mỗi con chuột giống như phương pháp thử nghiệm, và tiến hành truyền một chiều. Dung dịch truyền sử dụng được điều chế theo cách như sau bổ sung 10g albumin huyết thanh bò, 0,5ml dexamethason (0,123mg/ml) và 0,5ml noradrenalin (0,024mg/ml) tương ứng với 500ml dung dịch KRB nêu trên vào dung dịch Krebs-Ringer bicarbonat (dung dịch KRB, pH 7,4) chứa 9,0g NaCl, 8ml KCl 5,75%, 2ml KH_2PO_4 10,55%, 2ml MgSO_4 19%, 2,73g NaHCO_3 , 3,43g glucoza và 1255ml nước.

Bổ sung một lượng 0,5ml axit sulfosalixylic 30% vào 5,0ml dung dịch mẫu truyền lấy ra từ tĩnh mạch cửa, và khuấy mạnh hỗn hợp thu được và sau đó để yên trong tủ lạnh một đêm. Ly tâm mẫu này ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ protein. Đối với dịch nổi ly tâm thu được, định lượng lượng hydroxyprolin trong 0,5ml dịch nổi này bằng phép đo màu, bằng cách đó thu được lượng Hyp loại tự do.

Hơn thế nữa, lấy 3,0ml dịch nổi ly tâm nêu trên và cho vào ống thử nghiệm đang mở, và bổ sung thêm một đương lượng axit clohydric đặc để tiến hành thủy phân ở nhiệt độ 110°C trong 24 giờ. Tiến hành cô đến khô bằng thiết bị bay hơi để loại bỏ axit clohydric, và sau đó hòa tan phần còn lại trong 5ml nước cất, và bổ sung thêm một vài giọt dung dịch lithi hydroxit bão hòa để điều chỉnh pH đến khoảng từ 5 đến 7, và điều chỉnh thể tích đến 10ml. Đối với 2ml dung dịch thu được, định lượng lượng hydroxyprolin bằng phép đo màu, nhờ đó thu được tổng lượng Hyp. Giá trị thu được bằng cách lấy lượng Hyp tự do trước khi thủy phân trừ đi tổng lượng Hyp sau thủy phân là lượng Hyp dạng peptit. Từ lượng Hyp dạng tự do này xác định được lượng định lượng của mỗi dipeptit (của mỗi mẫu thử nghiệm) hấp thu vào dung dịch truyền qua tĩnh mạch cửa.

Tiến hành định lượng bằng phép so màu lượng hydroxyprolin bằng phương pháp Firschein và Shill như trên như được giải thích cụ thể trong thử nghiệm đánh giá 1-4.

Ngoài ra, việc định dạng và định lượng các dipeptit thu hồi được trong dung dịch truyền qua tĩnh mạch cửa của chuột, là, Hyp-Gly, Pro-Hyp, Ala-Hyp và Ser-Hyp được hấp thụ vào ruột được tiến hành bằng phân tích HPLC và phân tích phổ khối (LC/MS/MS) dưới đây.

Phân tích HPLC

Phân tích các dipeptit trong dung dịch truyền được tiến hành bằng phân tích HPLC pha đảo. Hệ thống LCSS-905 do JASCO Corporation sản xuất bao gồm bơm nạp chất lỏng, decassa, bộ phận lấy mẫu tự động, buồng sấy cột, thiết

Bảng 6

Dipeptit định lượng		Lượng (nmol/ml) của mỗi dipeptit được xác định sau khi hấp thu
Ví dụ 1	Hyp-Gly	9,8
Ví dụ tham khảo 1-1	Pro-Hyp	21,3
Ví dụ tham khảo 1-2	Ala-Hyp	1,2
Ví dụ so sánh 3	Ser-Hyp	0,7

Thử nghiệm đánh giá 1-6

Chuột C57BL/6J 10 tuần tuổi được nuôi qua đường miệng thức ăn chứa các chế phẩm như nêu trong bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

	Nhóm N	Nhóm C	Nhóm được bổ sung Hyp-Gly	Nhóm được bổ sung [(Hyp-gly)+Pro-Hyp]	Nhóm được bổ sung (Pro+Hyp)
Casein	200	200	200	200	200
Mỡ lợn	58,3	58,3	58,3	58,3	58,3
Dầu ngô	11,7	11,7	11,7	11,7	11,7
Hỗn hợp khoáng chất	35	35	35	35	35
Hỗn hợp vitamin	10	10	10	10	10
Sucroza	100	100	100	100	100
Tinh bột ngô	529,5	470,45	517,45	517,45	517,45
Xenluloza	50	50	50	50	50
L-Xystin	3	3	3	3	3
Kali phosphat	—	59,05	59,05	59,05	59,05
Hyp—Gly	—	—	3	1,5	—
Pro—Hyp	—	—	—	1,5	—
(Pro+Hyp)	—	—	—	—	3

bị đo quang phổ bằng tia tử ngoại, máy in và thiết bị kiểm soát hệ thống được sử dụng làm thiết bị HPLC. Cột Nova Pak C18 (3,9 x 150mm) được sử dụng làm cột pha đảo.

Tầng động gradien tuyến tính của hệ nước-axetonitril chứa TFA 0,1% được sử dụng, lượng mẫu này tiêm vào là 70µl, và tốc độ dòng là 1ml/phút.

Phân tích LC/MS/MS

U980HPLC (do JASCO Corporation sản xuất) được sử dụng làm thiết bị HPLC. Thiết bị này được trang bị cột ODS (C18) (Mightysil RP-18, 2 x 250mm, do Kanto Chemical Co Ltd sản xuất). Dung môi trong tầng động là hệ nước-axetonitril chứa axit formic 0,2%, và nồng độ của axetonitril được tăng lên từ 0% đến 40% bằng gradien tuyến tính trong 40 phút, và tiến hành rửa bằng axetonitril 100% trong 10 phút. Lượng mẫu tiêm vào là 10µl, và nhiệt độ cột là 40°C.

Tiến hành phân tích MS theo hệ MS/MS bằng thiết bị đo phổ khối Quattro LC (Micromass, Manchester, UK) bằng phương pháp kiểm tra đa phản ứng gồm 4 kênh. Tức là, dung dịch giải hấp thu được từ HPLC được kiểm tra bằng m/z là $[M+H]^+$ và m/s của phần mảnh ion. Kiểm tra Pro-Hyp bằng cách sử dụng $[M+H]^+$ m/z: 229,1>132,1, kiểm tra Ser-Hyp bằng cách sử dụng $[M+H]^+$ m/z: 219,1>132,1, kiểm tra Ala-Hyp bằng cách sử dụng $[M+H]^+$ m/z: 203,1>132,1, và kiểm tra Hyp-Gly bằng cách sử dụng $[M+H]^+$ m/z: 189,1>86,1.

Xử lý dung dịch truyền bằng axit sulfosalixylic với nồng độ cuối bằng 3% để loại bỏ protein. Đông khô dịch nổi này và hòa tan 10mg bột khô thu được trong nước cất và xử lý bằng cột nhựa trao đổi cation, nhờ đó thu được phân đoạn đã giải hấp amoniac. Loại bỏ dung môi khỏi phân đoạn này, và hòa tan phần còn lại trong nước cất, và phân tích LC/MS/MS dung dịch thu được.

Các kết quả được thể hiện trong bảng 6.

Trong thử nghiệm này, trong bảng 7, Hyp-Gly (nhóm [Hyp-Gly]) được sử dụng như là nhóm được bổ sung Hyp-Gly, và hỗn hợp chứa Hyp-Gly và Pro-Hyp (nhóm [(Hyp-Gly) + (Pro-Hyp)]) có tỷ lệ 1:1 được sử dụng như là nhóm được bổ sung [(Hyp-Gly) + (Pro-Hyp)]. Chuột bị giết sau 3 tuần, và độ rộng của ổ khớp được đo từ hình ảnh μ CT (thiết bị quét desk micro CT SKYSCAN 1172, do SKYSCAN sản xuất) của phần khớp giữa xương đùi và xương chày của mỗi nhóm, và cấu trúc nền và tình trạng tế bào được đánh giá từ các mẫu cắt được nhuộm hematoxylin không được loại canxi. Để so sánh, nhóm được bổ sung hỗn hợp axit amin tự do (nhóm [Pro + Hyp]) mà hỗn hợp axit amin tự do gồm prolin và hydroxyprolin được sử dụng như nhóm được bổ sung (Pro + Hyp) trong bảng 7 để tiến hành quy trình và đánh giá này.

Các kết quả được thể hiện trong bảng 8.

Bảng 8

	Nhóm N	Nhóm C	Ví dụ 1		Ví dụ 2		Nhóm [Pro+Hyp]
			Nhóm [Hyp-Gly]	Nhóm [(Hyp-Gly)+(Pro-Hyp)]			
Độ dày tương đối của sụn khớp	1,0±0,2	0,5±0,1(*)	1,0±0,2	1,0±0,1			0,5±0,2(*)
Điểm số bệnh học (phần sụn khớp)	0,2±0,04	5,0±1,5(*)	0,3±0,05	0,2±0,06			5,0±1,8(*)
Đặc điểm của các phát hiện bệnh học ở phần xương xốp ở khớp so với nhóm N	—	Giảm đáng kể thể tích xương. Giảm đáng kể các tế bào tạo xương và tế bào xương; ngược lại, tăng số tế bào hủy xương	Thể tích xương giống nhóm N. Số tế bào tạo xương và tế bào xương giống nhóm N hiện có.	Thể tích xương giống nhóm N. Số tế bào tạo xương và tế bào xương giống nhóm N hiện có.			Thể tích xương giảm hơn nhóm N. Giảm số tế bào tạo xương và tế bào xương

Số chuột thử nghiệm: n=4

Lưu ý (*): Có sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê so với nhóm N. ($p<0,05$)

Thử nghiệm đánh giá 1-7

Chỉ mỗi thành phần Hyp-Gly (nhóm [Hyp-Gly]) và hỗn hợp chứa Hyp-Gly và Pro-Hyp có tỷ lệ 1:1 (nhóm [(Hyp-Gly) + (Pro-Hyp)]) được hòa tan trong dung dịch nước muối sinh lý sao cho nồng độ cuối bằng 5mmol/l và sau đó lọc vô trùng. Lượng 0,5ml dung dịch thu được được tiêm vào ổ khớp giữa xương đùi và xương chày của nhóm C nhóm này là nhóm chuột C57BL/6J 10 tuần tuổi được nuôi bằng các thức ăn chứa các chế phẩm nêu trong bảng 7 trên đây trong 3 tuần. Sau 1 tuần, chuột bị giết, và các mẫu cắt đã nhuộm Mayer hematoxylin không được loại canxi của các phần ổ khớp giữa xương đùi và xương chày trái và phải được chuẩn bị và được đánh giá bệnh học. Theo cách này, đối với các trường hợp mà chuột bị giết sau 3 tuần tiêm, các mẫu cắt đã nhuộm Mayer hematoxylin không loại canxi của các phần ổ khớp giữa xương đùi và xương chày trái và phải được chuẩn bị và đánh giá bệnh học bằng cách so sánh với các mẫu cắt bệnh học của nhóm N trong thử nghiệm đánh giá 1-6 nêu trên.

Các kết quả được thể hiện trong bảng 9.

Bảng 9

	Nhóm N	Ví dụ 1		Ví dụ 2	
		Nhóm [Hyp-Gly]		Nhóm [(Hyp-Gly)+(Pro-Hyp)]	
		1 tuần sau khi tiêm	3 tuần sau khi tiêm	1 tuần sau khi tiêm	3 tuần sau khi tiêm
Độ dày tương đối của sụn khớp	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,05
Điểm số bệnh học (phần sụn khớp)	0,2 ± 0,04	0,4 ± 0,04	0,2 ± 0,03	0,3 ± 0,05	0,2 ± 0,02
Đặc điểm của các phát hiện bệnh học ở phần xương xốp ở khớp so với nhóm N	—	Tăng thể tích xương được quan sát thấy. Có nhiều tế bào tạo xương.	Thể tích xương giống nhóm N. Số tế bào tạo tế bào xương giống nhóm N hiện có.	Tăng đáng kể thể tích xương. Có nhiều tế bào tạo xương.	Thể tích xương giống nhóm N. Số tế bào tạo xương và tế bào xương giống nhóm N hiện có.

Số chuột thử nghiệm : n=4

Xem xét các kết quả của các thử nghiệm đánh giá đặc tính

Như đã thấy ở các kết quả trên đây, từ việc so sánh với các mẫu đối chứng (trống), có thể hiểu rằng: Hyp-Gly ức chế sự biệt hóa và hoạt hóa các tế bào hủy xương (Bảng 1), thúc đẩy sự biệt hóa và hoạt hóa các tế bào tạo xương (Bảng 2), ức chế sự thoái biến các tế bào sụn để điều chỉnh sự biệt hóa của chúng (Bảng 3), và thu hồi lượng tropocolagen ở chân bì da (Bảng 5). Ngoài ra, các tác dụng này tốt hơn nhiều so với các tác dụng của các dipeptit, axit amin và tripeptit khác theo các ví dụ so sánh.

Ngoài ra, có thể hiểu rằng Hyp-Gly được hấp thu vào ruột rất nhanh và ổn định (mà không bị phân hủy thành các axit amin), khi so sánh với Ser-Hyp và Ala-Hyp (Bảng 6).

Ngoài ra, từ các kết quả như được thể hiện trong Bảng 8 và 9, có thể hiểu rằng trong các trường hợp mà sử dụng một mình dipeptit Hyp-Gly theo sáng chế hoặc trong các trường hợp sử dụng kết hợp dipeptit này với Pro-Hyp, sự thoái biến các sụn khớp bị ức chế hoặc sự tái tạo các sụn khớp được thúc đẩy.

Hơn thế nữa, trong các trường hợp mà sử dụng kết hợp Hyp-Gly và Pro-Hyp, có thể hiểu rằng các tác dụng được mong đợi nhiều hơn so với các tác dụng thu được khi sử dụng từng dipeptit tương ứng được thể hiện, và các tác dụng hiệp đồng được ghi nhận (các Bảng 1 đến 3 và Bảng 5). Cụ thể là, các tác dụng thu được tốt hơn cả tác dụng thu được từ việc chỉ sử dụng Hyp-Gly và chỉ sử dụng Pro-Hyp được thể hiện trong việc thúc đẩy sự hoạt hóa các tế bào tạo xương (Bảng 2) và ức chế sự thoái biến các tế bào sụn (Bảng 3).

Đối với việc ức chế sự thoái biến các tế bào sụn (bảng 3), các trường hợp sử dụng kết hợp ba loại Hyp-Gly, Pro-Hyp và Ala-Hyp thu được các tác dụng tốt hơn nhiều so với trường hợp khác bất kỳ, và các tác dụng hiệp đồng đáng kể cũng bằng cách sử dụng kết hợp Ala-Hyp được ghi nhận.

Ngoài ra, đối với Pro-Hyp, trong đánh giá trên đĩa petri bằng nhựa trong Bảng 1 hoặc trong đánh giá "giá trị tương đối (%)" của ALP trong Bảng 2, các tác dụng đáng kể giống Hyp-Gly không được ghi nhận. Tuy nhiên, từ đánh

giá trên các lát ngà răng trong bảng 1, rõ ràng là Pro-Hyp có hiệu quả trong việc ức chế sự biệt hóa và hoạt hóa các tế bào hủy xương, và do đó có thể hiểu rằng Pro-Hyp có hiệu quả trong việc ức chế loãng xương. Hơn thế nữa, như đã thấy trong bảng 3, có thể hiểu rằng Pro-Hyp cũng có tác dụng rất tốt trong việc ức chế sự thoái biến các tế bào sụn.

Từ các kết quả thể hiện trong bảng 3, cũng có thể hiểu rằng một mình Ala-Hyp cũng hữu hiệu ức chế sự thoái biến các tế bào sụn.

Ngoài ra, có thể hiểu rằng tương tự với Hyp-Gly, Pro-Hyp được hấp thu vào ruột rất nhanh và ổn định (mà không bị phân hủy thành các axit amin), nếu so với Ser-Hyp và Ala-Hyp (bảng 6).

Các chất ức chế bệnh

Các chất ức chế bệnh theo sáng chế được tổng hợp nhờ các dipeptit nêu trên hoặc các peptit collagen theo sáng chế. Ví dụ về các chế phẩm chứa chúng được thể hiện dưới đây.

Ví dụ 8 đến 13

Các thành phần được trộn theo các chế phẩm được thể hiện trong bảng 10, và xenluloza tinh thể được sử dụng làm nguyên liệu tạo hình theo tỷ lệ 10 phần so với toàn bộ chế phẩm như được mô tả trong bảng 10 để tiến hành nén viên nén theo phương pháp thông thường, nhờ đó thu được các chất ức chế bệnh theo các ví dụ 8 đến 13 mà có thể sử dụng qua đường miệng. Ngoài ra, trong bảng 10, Hyp-Gly là dipeptit tổng hợp theo ví dụ 1, Pro-Hyp là dipeptit tổng hợp theo ví dụ tham khảo 1-1, PC, FC, PC-CP và PC-PH lần lượt là các peptit collagen nêu trong ví dụ 4 đến 7, và PC-CP-Cont là peptit collagen nêu trong ví dụ so sánh 7.

Bảng 10

	Ví dụ 8 (% trọng lượng)	Ví dụ 9 (% trọng lượng)	Ví dụ 10 (% trọng lượng)	Ví dụ 11 (% trọng lượng)	Ví dụ 12 (% trọng lượng)	Ví dụ 13 (% trọng lượng)
Hyp—Gly	2	1	—	—	—	—
Pro—Hyp	—	1	—	—	—	—
PC	—	—	76	—	—	—
FC	—	—	—	76	—	—
PC—CP	—	—	—	—	76	—
PC—PH	—	—	—	—	—	76
PC—CP—Cont	74	74	—	—	—	—
Canxi (nghiên nung vỏ sò)	6	6	6	6	6	6
Glucosamin hydroclorua	14	14	14	14	14	14
Vitamin C	4	4	4	4	4	4

Ví dụ 14

Các viên nén loại nhai được bào chế bằng cách sử dụng PC nêu trong ví dụ 4 trên đây.

Cụ thể là, các thành phần nêu dưới đây được trộn để bào chế viên nén loại nhai được với lượng 0,8g mỗi viên nén nhờ dụng cụ nén viên nén. Các viên nén loại nhai được này chứa Hyp-Gly làm thành phần hữu hiệu với tỷ lệ 10,0% trọng lượng nếu giả sử toàn bộ khối lượng là 100% trọng lượng.

PC	50,0 kg
Axit ascorbic	10,0 kg
MICROCALMAG S (do SK Foods sản xuất)	4,6 kg
MABIT (do Hayashibara sản xuất)	19,0 kg
Xenluloza tinh thể	10,0 kg
Chất nhũ hóa	3,2 kg
Chất tạo ngọt	0,5 kg
Bột sữa đã lên men	1,4 kg
Chất tạo hương dạng bột	1,0 kg
Axit xitric	0,3 kg

Ví dụ 15

PC nêu trong ví dụ 4 được sử dụng, và các thành phần nêu dưới đây được trộn để điều chế súp bột trong (6,0g mỗi túi) được sử dụng bằng cách hòa tan súp này vào 100 đến 140ml nước nóng. Súp bột trong này chứa Hyp-Gly làm thành phần hữu hiệu với tỷ lệ là 7,0% trọng lượng nếu giả sử toàn bộ trọng lượng là 100% trọng lượng.

PC	35,0 kg
Bột cốt gà	25,0 kg
Muối bột	18,0 kg
Glucoza	7,7 kg
Canxi lactat	7,0 kg
Natri glutamat	4,0 kg
Bột cốt hành	1,0 kg

HVP	1,0 kg
Chất tạo hương vị bò	0,5 kg
Dinatri 5'-ribonucleotit	0,5 kg
Hạt tiêu trắng	0,2 kg
Nghệ	0,1 kg

Ví dụ 16

PC nêu trong ví dụ 4 được sử dụng, và các thành phần nêu dưới đây được trộn để tạo ra bột hoa quả (13,0g mỗi túi) được sử dụng bằng cách hòa tan bột này vào trong 100 đến 150ml nước. Bột hoa quả này chứa Hyp-Gly làm thành phần hữu hiệu với tỷ lệ 8,0% trọng lượng nếu giả sử toàn bộ trọng lượng là 100% trọng lượng.

PC	40,4 kg
Natri ascorbat	1,2 kg
Erythritol	52,0 kg
Axesulfam K	0,1 kg
Chất tạo ngọt	0,1 kg
Natri xitrat	0,8 kg
Axit xitric (tinh thể)	4,6 kg
Chất tạo hương nho xạ	0,8 kg

Ví dụ 17

PC nêu trong ví dụ 4 được sử dụng, và hỗn hợp thành phần nêu dưới đây, cùng với các thành phần khác được hòa tan vào nước tinh khiết, và điều chỉnh dung dịch thu được đến pH 3,5, B' x 9,0% và sau đó vô trùng bằng nhiệt ở nhiệt độ 110°C trong 30 giây và sau đó làm lạnh đến 10°C và sau đó lọc vô trùng qua giấy lọc, nhờ đó điều chế được đồ uống mới (125ml mỗi gói). Đồ uống mới này chứa Hyp-Gly làm thành phần hữu hiệu với tỷ lệ 0,5% trọng lượng nếu giả sử toàn bộ khối lượng là 100% trọng lượng.

PC	2,5 kg
Hỗn hợp vitamin DN (do BASF, Nhật Bản sản xuất)	0,1 kg
Erythritol	5,5 kg

Axesulfam K	0,015 kg
Chất tạo ngọt	0,005 kg
Axit xitric	0,6 kg
Chất tạo hương hoa quả hỗn hợp	0,16l
Chất tạo hương vải	0,04l
Nước tinh khiết	vừa đủ

(Vừa đủ được hiểu là sao cho tổng lượng là 100,0kg)

Ví dụ 18

Đầu tiên, PC nêu trong ví dụ 4 và gelatin trong số nhiều thành phần nêu dưới đây được ngâm trong nước tinh khiết (B) và nhờ đó được trương nở trong thời gian 30 phút và sau đó hòa tan hoàn toàn bằng cách đun nóng đến nhiệt độ 80°C trong thời gian 30 phút, nhờ đó thu được dung dịch gelatin. Tiếp theo, oligosacarit sữa, đường khử trong bột mạch nha, erythritol và dextrin khó tiêu hóa trong số các thành phần nêu dưới đây được hòa tan vào nước tinh khiết (A) và đun sôi, và ngoài ra chất tạo ngọt, dung dịch gelatin nêu trên, axit xitric (tinh thể) đã hòa tan trước vào phần nước tinh khiết (A), hương bạc hà cay, hương bạc hà, hương chanh và màu vàng rum được bổ sung, và dung dịch thu được được điều chỉnh đến nồng độ nằm trong khoảng từ 79 đến 81% và sau đó khử bọt và lọc qua khuôn tinh bột và sau đó làm khô ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 24 giờ, nhờ đó điều chế được kẹo gồm (4g mỗi viên). Kẹo gồm này chứa Hyp-Gly làm thành phần hữu hiệu với tỷ lệ 1,0% trọng lượng nếu giả sử toàn bộ trọng lượng là 100% trọng lượng.

PC	5,0kg
Oligosacarit	41,0kg
Đường khử trong bột mạch nha	31,0kg
Erythritol	5,0kg
Dextrin khó tiêu hóa	5,0kg
Chất tạo ngọt	0,05kg
Gelatin (APH250, do Nitta Gelatin, Inc. sản xuất)	7,0kg
Axit xitric (tinh thể)	1,2kg

Hương bạc hà cay	0,6l
Hương bạc hà	0,2l
Hương chanh	0,7l
Chất màu vàng rum	lượng thích hợp
Nước tinh khiết (A)	20,0l
Nước tinh khiết (B)	18,0l

Ví dụ 19

Hyp-Gly nêu trong ví dụ 1 được hòa tan bằng dung dịch nước muối sinh lý vô trùng đến nồng độ 2,5mM, nhờ đó thu được chất ức chế bệnh theo ví dụ 19 mà hữu dụng để tiêm vào phần bị bệnh.

Số liệu tham khảo có liên quan đến Pro-Hyp

Dưới đây thể hiện các tác dụng của Pro-Hyp và peptit collagen chứa Pro-Hyp.

Đầu tiên, các peptit collagen chứa Pro-Hyp như được sử dụng trong các thử nghiệm đánh giá đặc tính được giải thích. Giống như các peptit collagen, hai loại peptit collagen thu được từ da lợn chứa Pro-Hyp (dưới đây lần lượt được viết tắt là "PC" và "PC-CA"), peptit collagen thu được từ vảy cá chứa Pro-Hyp theo sáng chế (dưới đây viết tắt là "FC") và, để so sánh, hai loại peptit collagen thu được từ da lợn không chứa Hyp-Gly và Pro-Hyp (dưới đây lần lượt viết tắt là "PC-Cont" và "PC-CA-Cont").

PC

Lượng 1kg gelatin (collagen typ 1) là sản phẩm bị thoái biến bởi nhiệt của collagen thu được từ da lợn được hòa tan trong 4kg nước ấm 75°C, và điều chỉnh nhiệt độ đến 60°C, và sau đó là phản ứng enzym lần thứ nhất, 10g proteaza thu được từ *Aspergillus* màu vàng được bổ sung, và giữ hệ này ở pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45 đến 55°C trong 120 phút, nhờ đó tiến hành xử lý thủy phân bằng enzym. Tiếp đó, là phản ứng enzym lần thứ hai, enzym chiết từ *Aspergillus oryzae* có hoạt tính aminopeptidaza P và prolidaza được bổ sung đến nồng độ cuối 0,5%, sao

cho nguyên liệu này được hòa tan. Sau đó, cho nguyên liệu này phản ứng ở nhiệt độ 50°C trong 6 giờ. Sau phản ứng, đun dung dịch phản ứng này ở nhiệt độ 100°C trong 10 phút và sau đó làm nguội xuống 60°C và lọc bằng than hoạt và chất trợ lọc (diatomit), và dung dịch cái thu được được vô trùng ở nhiệt độ cao ở 120°C trong 3 giây. Sau đó, dung dịch cái đã vô trùng được sấy khô, sao cho thu được PC.

PC này được tiến hành sắc ký lớp mỏng. Tức là, 10µg PC đã hòa tan trong nước được nhỏ lên đĩa sắc ký lớp mỏng (tên thương mại: "Xenluloza F", do Merck sản xuất) và sau đó giải hấp bằng dung môi (n-butanol:axit axetic:nước = 4:1:2). Đĩa này được làm khô trong không khí và sau đó được phun chất isatin-kẽm axetat, và sau đó sự có mặt của peptit mà có đầu tận cùng N là Pro được khẳng định bằng vết màu xanh, và cũng được khẳng định rằng giá trị R_f {[khoảng cách từ vết gốc đến vết có màu]/[khoảng cách từ vết gốc đến trước dung môi]} của vết màu xanh của PC thu được trên đây phù hợp với giá trị R_f của mỗi vết màu xanh của Pro-Hyp trong số Hyp-Gly và Pro-Hyp mà là các chất chỉ thị nội được chấm vào đĩa này, nói cách khác, PC này chứa Pro-Hyp.

FC

FC thu được theo cách giống như sản xuất PC nêu trên ngoại trừ gelatin thu được từ vảy cá được sử dụng.

Ngoài ra, FC này được phân tích bằng sắc ký lớp mỏng theo cách giống như trường hợp của PC nêu trên. Kết quả là, sự có mặt Pro-Hyp được khẳng định.

PC-CA

Lượng 1kg gelatin (collagen typ 1) là sản phẩm bị phân hủy bởi nhiệt của collagen thu được từ da lợn được hòa tan trong 4l dung dịch đệm tris-HCl 20mM (pH 7,5) ở nhiệt độ 75°C đồng thời đun nóng và làm nguội đến nhiệt độ 40°C, và sau đó là phản ứng enzym lần thứ nhất, 1g collagenaza (Collagenaza

N-2, do Nitta Gelatin, Inc. sản xuất) được bổ sung, và giữ hệ này ở độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,8 và nhiệt độ 40°C trong 24 giờ, nhờ đó tiến hành phân hủy bằng enzym. Tiếp đó, là phản ứng enzym lần thứ hai, enzym chiết từ *Aspergillus niger* có hoạt tính aminopeptidaza P và prolidaza được bổ sung vào dung dịch phản ứng thu được đến nồng độ cuối 0,25%. Sau đó, cho nguyên liệu này phản ứng ở độ pH 4,0 và ở nhiệt độ 50°C trong 6 giờ. Sau phản ứng này, đun dung dịch phản ứng đến nhiệt độ 100°C trong 10 phút và sau đó làm nguội xuống nhiệt độ 60°C và sau đó lọc bằng than hoạt và chất trợ lọc (diatomit), và dung dịch cái thu được được vô trùng ở nhiệt độ cao ở nhiệt độ 120°C trong 3 giây. Sau đó, dung dịch cái đã vô trùng được sấy khô, sao cho thu được PC-CA.

Dung dịch được điều chế bằng cách hòa tan 2g (trọng lượng khô) PC-CA nêu trên vào 10ml nước được chia thành hai phần, và nạp liên tục hai phần này vào cột ("DEAE TOYOPEARL 650M", do TOSOH Corporation sản xuất; 16 x 650mm), và phần thể tích trống được giải hấp bằng nước cất được thu hồi. Tiếp đó, phần đã thu hồi được nạp vào cột ("SP TOYOPEARL 650M", do TOSOH Corporation sản xuất; 16 x 650mm), và phần thể tích trống được giải hấp bằng nước cất được thu hồi. Tiếp theo, nạp phần này vào cột ("SEPHADEX LH-20", do Pharmacia Co., Ltd. sản xuất; 26 x 900mm), và tiến hành giải hấp bằng dung dịch nước metanol 30%. Tiến hành phân đoạn ở mức 9ml/phân đoạn, sao cho thu hồi được phân đoạn tương ứng với vị trí giải hấp Pro-Hyp là sản phẩm tổng hợp hóa học. Phân đoạn này được phân tích HPLC nhờ cột ("μBondasphere 5μC18 300Å, do Waters Co., Ltd. sản xuất; 3,9x 150mm) để tiến hành phân đoạn bằng cách giải hấp dung dịch nước axetonitril có nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 32% hoặc ít hơn chứa 0,1% axit trifloaxetic (được tiến hành ở tốc độ dòng 1ml/phút và gradien nằm trong khoảng từ 0 đến 32% trong 18 phút) theo gradien nồng độ tuyến tính, sao cho phần đỉnh giải hấp ở thời gian lưu tương ứng với vị trí mà thu hồi được sản phẩm tổng hợp hóa học Pro-Hyp đã giải hấp. Sau đó, dung dịch đã thu hồi được làm khô trong chân không thành chất rắn, sao cho thu được bột

màu trắng. Cấu trúc của bột màu trắng thu được được phân tích bằng thiết bị phân tích cấu trúc protein ("Protein Sequencer 491 Model", do Applied Biosystems sản xuất) bằng phương pháp Edman. Kết quả là, sự có mặt Pro-Hyp được khẳng định.

PC-Cont

PC-Cont thu được bằng cách chỉ tiến hành phản ứng enzym lần thứ nhất trong quá trình sản xuất PC nêu trên.

Tức là, 1kg gelatin (colagen typ 1) là sản phẩm bị phân hủy bởi nhiệt của collagen thu được từ da lợn được hòa tan trong 4kg nước ấm 75°C, và điều chỉnh nhiệt độ đến 60°C, và sau đó bổ sung 10g proteaza thu được từ *Aspergillus* màu vàng, và giữ hệ này ở pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45 đến 55°C trong 120 phút, nhờ đó tiến hành thủy phân bằng enzym. Tiếp đó, đun dung dịch thu được nhờ thủy phân bằng enzym ở nhiệt độ 85°C trong 10 phút để bất hoạt enzym và sau đó làm nguội đến 60°C và sau đó lọc bằng than hoạt và chất trợ lọc (diatomit), và vô trùng dung dịch cái thu được ở nhiệt độ cao ở 120°C trong 3 giây. Sau đó, sấy khô dung dịch cái đã vô trùng, sao cho thu được PC-Cont.

Ngoài ra, PC-Cont này còn được phân tích bằng sắc ký lớp mỏng theo cách giống như trường hợp PC nêu trên. Kết quả là, không phát hiện thấy vết màu xanh, vì thế sự có mặt của bất kỳ Hyp-Gly và Pro-Hyp không được khẳng định.

PC-CA-Cont

PC-CA-Cont thu được bằng cách chỉ tiến hành phản ứng enzym lần thứ nhất trong quá trình sản xuất PC-CA nêu trên.

Tức là, 1kg gelatin (colagen typ 1) là sản phẩm bị phân hủy bởi nhiệt của collagen thu được từ da lợn được hòa tan trong 4l dung dịch đệm tris-HCl 20mM (pH 7,5) ở nhiệt độ 75°C đồng thời đun nóng và sau đó làm nguội xuống 40°C, và sau đó bổ sung 1g collagenaza (Collagenaza N-2, do Nitta Gelatin, Inc.

sản xuất), và giữ hệ này ở độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,8 và ở nhiệt độ 40°C trong 24 giờ, nhờ đó tiến hành xử lý phân hủy bằng enzym. Tiếp theo, đun nóng dung dịch thu được bằng cách xử lý thủy phân bằng enzym ở nhiệt độ 85°C trong 10 phút để bất hoạt enzym và sau đó lọc bằng than hoạt và chất trợ lọc (diatomit), và dung dịch cái thu được này được xử lý vô trùng ở nhiệt độ cao ở 120°C trong 3 giây. Sau đó, sấy khô dung dịch cái đã vô trùng, sao cho thu được PC-CA-Cont dạng bột.

Ngoài ra, PC-CA-Cont này còn được phân tích bằng sắc ký lớp mỏng theo cách giống trường hợp PC nêu trên. Kết quả là, không phát hiện thấy vết màu xanh, vì thế sự có mặt của bất kỳ Hyp-Gly và Pro-Hyp không được khẳng định.

Thử nghiệm đánh giá 2-1

PC nêu trên (nhóm PC), FC (nhóm FC) và PC-CA (nhóm PC-CA) được sử dụng, và mỗi peptit collagen được bổ sung vào dung dịch nuôi cấy tiền tế bào sụn gốc ATDC5 đến nồng độ cuối 0,1%. Sau 5 ngày nuôi cấy, kiểm tra mỗi hoạt tính ức chế của phosphatase kiềm (ALP) là enzym chỉ thị cho sụn phì đại và canxi hóa. Để so sánh, hoạt tính ức chế ALP khi không bổ sung peptit (nhóm N), hoạt tính ức chế ALP khi sử dụng pepton (nhóm Pe) có nồng độ cuối 0,1%, và hoạt tính ức chế ALP khi sử dụng PC-Cont nêu trên (nhóm PC-Cont) và PC-CA-Cont (nhóm PC-CA-Cont) được kiểm tra. Kết quả được thể hiện trong bảng 11.

Bảng 11

	Nhóm N	Nhóm Pe	Nhóm PC	Nhóm FC	Nhóm PC-CA	Nhóm PC-Cont	Nhóm PC-CA-Cont
Hoạt tính ALP tương đối	1,0±0,01	1,2±0,01	0,3±0,05 (*)	0,7±0,05 (*)	0,2±0,05 (*)	0,9±0,1	0,9±0,15

*): Có sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê so với nhóm N. ($p < 0,05$)

Thử nghiệm đánh giá 2-2

Hoạt tính ức chế ALP được kiểm tra theo cách giống như thử nghiệm đánh giá 2-1 ngoại trừ là: dipeptit Pro-Hyp được tổng hợp bằng phương pháp tổng hợp ở pha rắn (do PH Nhật Bản sản xuất) (nhóm [Pro-Hyp]) được sử dụng, lượng bổ sung được thay đổi đến 2,5mM và, để so sánh, không bổ sung peptit (nhóm N) hoặc glyxin là axit amin tự do (nhóm Gly), prolin là axit amin tự do (nhóm Pro), hydroxyprolin axit amin tự do (nhóm Hyp), hỗn hợp axit amin tự do gồm prolin và hydroxyprolin (nhóm [Pro + Hyp]), hỗn hợp axit amin tự do gồm glyxin, prolin và hydroxyprolin (nhóm [Gly + Pro + Hyp]), và tripeptit Pro-Hyp-Gly được tổng hợp bằng phương pháp tổng hợp ở pha rắn (do PH Nhật Bản sản xuất) (nhóm [Pro-Hyp-Gly]) được sử dụng. Các kết quả được thể hiện trong bảng 12.

Bảng 12

	Nhóm N	Nhóm Gly	Nhóm Pro	Nhóm Hyp	Nhóm [Pro+Hyp]	Nhóm [Gly+Pro+Hyp+Hyp]	Nhóm [Pro-Hyp] (**)	Nhóm [Pro- Hyp- Gly]
Hoạt tính ALP tương đối	1,0±0,1	1,1±0,01	0,98±0,1	1,0±0,01	1,0±0,03	1,0±0,01	0,1±0,02(*)	0,8±001

*) : Có sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê so với nhóm N.

**) Do PH Nhật sản xuất

Thử nghiệm đánh giá 2-3

Chuột C57BL/6J có độ tuổi 10 tuần được nuôi qua đường miệng thức ăn chứa các chế phẩm như được thể hiện trong bảng 13. Trong thử nghiệm này, trong bảng 13, PC nêu trên (nhóm PC), FC (nhóm FC) và PC-CA (nhóm PC-CA) được sử dụng như các nhóm được bổ sung peptit collagen, và để so sánh, PC-Cont nêu trên (nhóm PC-Cont) và PC-CA-Cont (nhóm PC-CA-Cont) được sử dụng. Chuột bị giết sau 3 tuần, và từ các mẫu cắt được nhuộm bằng hematoxylin không được loại canxi của phần khớp giữa xương đùi và xương chày của mỗi nhóm, cấu trúc nền và trạng thái tế bào được đánh giá và độ rộng của ổ khớp được đánh giá.

Các kết quả được thể hiện trong bảng 14 và 16. Các giá trị được thể hiện trong Bảng 14 (điểm số bệnh học) là các giá trị thu được bằng cách đánh giá cấu trúc nền và tình trạng tế bào của khớp sụn ở mỗi chuột dựa trên tiêu chí như được thể hiện trong Bảng 15 và tính trung bình các giá trị đánh giá.

Bảng 13

	Nhóm N	Nhóm C	Nhóm được bổ sung peptit collagen	Nhóm được bổ sung Pro-Hyp	Nhóm được bổ sung (Pro+Hyp)
Casein	200	200	150	200	200
Mỡ lợn	58,3	58,3	58,3	58,3	58,3
Dầu ngô	11,7	11,7	11,7	11,7	11,7
Hỗn hợp khoáng	35	35	35	35	35
Hỗn hợp vitamin	10	10	10	10	10
Sucroza	100	100	100	100	100
Tinh bột ngô	529,5	470,45	470,45	517,45	517,45
Xenluloza	50	50	50	50	50
L-Xystin	3	3	3	3	3
Kali phosphat	—	59,05	59,05	59,05	59,05
Peptit collagen	—	—	50	—	—
Pro-Hyp	—	—	—	3	—
(Pro+Hyp)	—	—	—	—	3

Bảng 14

	Nhóm N	Nhóm C	Nhóm PC	Nhóm FC	Nhóm PC-CA	Nhóm PC-Cont	Nhóm PC- CA-Cont
Điểm số bệnh học (phần sụn khớp)	0,2± 0,04	5,0± 1,5 (*)	1,7± 0,5 (*)	2,0± 0,4 (*)	0,5± 0,5	2,3± 0,4 (*)	2,2± 0,4 (*)

*) : Có sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê so với nhóm N. ($p < 0,05$)

Bảng 15

Cấu trúc nền	Trạng thái tế bào
0 Bình thường	0 Bình thường
1 Bề mặt bất thường	2 Sai hỏng
3 Co cứng sợi bề mặt	5 Sai hỏng nặng
6 Tổn thương sâu	8 Sai hỏng toàn bộ sụn và tế bào
8 Sai hỏng toàn bộ sụn	

Bảng 16

	Nhóm N	Nhóm C	Nhóm PC	Nhóm FC	Nhóm PC- CA	Nhóm PC- Cont	PC-CA- Cont
Độ dày tương đối của khớp	1,0 ± 0,2	0,5± 0,1 (*)	0,9± 0,1	0,7± 0,2 (*)	1,0± 0,2	0,6± 0,2 (*)	0,6± 0,2 (*)

*) : Có sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê so với nhóm N. ($p < 0,05$)

Hơn thế nữa, đối với nhóm N nêu trên, nhóm C và nhóm PC, mật độ xương được đo bởi thiết bị CT (X-ray CT Latheta, do ALOCA sản xuất). Các kết quả được thể hiện trong bảng 17.

Bảng 17

	Tổng mật độ xương (mg/cm ³)	Mật độ vỏ xương (mg/cm ³)	Mật độ loãng xương (mg/cm ³)	Tổng lượng muối trong xương (mg)	Mômen độ cong thứ cấp mặt cắt của xương (mg • cm)
Nhóm N	617,57±45,01	722,37±43,66	418,10±42,45	26,55±2,05	0,142±0,015
Nhóm C	550,10± 6,73	657,43±10,78	350,28±17,18	23,45±1,09	0,113±0,014
Nhóm PC	576,02±24,67	682,00±30,41	391,12±27,44	27,17±2,55	0,140±0,017

Thử nghiệm đánh giá 2-4

Chuột C57BL/6J có độ tuổi 10 tuần tuổi được nuôi qua đường miệng thức ăn chứa các chế phẩm như nêu trong bảng 13 trên đây. Trong thử nghiệm này, trong bảng 13, dipeptit Pro-Hyp là sản phẩm tổng hợp hóa học (do BACHEM sản xuất) (nhóm [Pro-Hyp]) được sử dụng làm nhóm được bổ sung Pro-Hyp. Chuột bị giết sau 3 tuần, và độ rộng của ổ khớp được đo từ hình ảnh μ ACT (thiết bị quét desk micro CT SKYSCAN 1172, do SKYSCAN sản xuất) của phần khớp giữa xương chày và xương đùi ở mỗi nhóm, và cấu trúc nền và trạng thái tế bào được đánh giá từ các mẫu cắt được nhuộm hematoxylin không loại canxi. Ngoài ra, để so sánh, nhóm được bổ sung hỗn hợp axit amin tự do (nhóm [Pro + Hyp]) mà sử dụng hỗn hợp axit amin tự do gồm prolin và hydroxyprolin được sử dụng làm nhóm được bổ sung (Pro + Hyp) trong bảng 13 để tiến hành quy trình và đánh giá này.

Các kết quả được thể hiện trong bảng 18.

Bảng 18

	Nhóm N	Nhóm C	Nhóm [Pro-Hyp]	Nhóm [Pro+Hyp]
Độ dày tương đối của sụn khớp	1,0±0,2	0,5 ± 0,1(*)	0,9±0,1	0,5±0,2(*)
Các điểm số bệnh học (phần sụn khớp)	0,2±0,04	5,0±1,5(*)	0,5±0,5	5,0±1,8(*)
Đặc điểm của các phát hiện bệnh học ở phần xương xốp của khớp so với nhóm N	—	Giảm đáng kể thể tích xương. Giảm đáng kể các tế bào tạo xương và tế bào xương; ngược lại, tăng tế bào hủy xương	Thể tích xương giống nhóm N. Số tế bào tạo xương và tế bào xương giống nhóm N hiện có.	Thể tích xương giảm hơn nhóm N. Giảm số tế bào tạo xương và tế bào xương.

Số chuột thử nghiệm : n=4

Lưu ý) (*); Có sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê so với nhóm N.
(p<0,05)

Thử nghiệm đánh giá 2-5

Dipeptit Pro-Hyp như được tổng hợp bằng phương pháp tổng hợp ở pha rắn (được tổng hợp bởi PH Nhật Bản) (nhóm [Pro-Hyp]) được hòa tan trong dung dịch nước muối sinh lý đến nồng độ cuối 5mmol/l và sau đó lọc vô trùng. Lượng 0,5ml dung dịch thu được được tiêm vào ổ khớp giữa xương đùi và xương chày của nhóm C là nhóm chuột C57BL/6J 10 tuần tuổi được nuôi bằng thức ăn chứa các chế phẩm nêu trong bảng 13 trên đây trong 3 tuần. Sau 1 tuần, chuột bị giết, và các mẫu cắt được nhuộm Mayer hematoxylin không loại canxi của ổ khớp giữa xương đùi và xương chày phải và trái được chuẩn bị và được đánh giá bệnh học. Cũng theo cách này, đối với các trường hợp mà chuột bị giết sau 3 tuần tiêm, các mẫu cắt được nhuộm Mayer

hematoxylin không được loại canxi của ổ khớp giữa xương đùi và xương chày phải và trái được chuẩn bị và được đánh giá bệnh học bằng cách so sánh với các mẫu cắt đánh giá bệnh học của nhóm N trong thử nghiệm đánh giá 2-4 nêu trên.

Các kết quả được thể hiện trong bảng 19.

Bảng 19

	Nhóm N	Nhóm [Pro—Hyp]	
		1 tuần sau khi tiêm	3 tuần sau khi tiêm
Độ dày tương đối của sụn khớp	1,0±0,2	0,7±0,1	1,0±0,1
Các điểm số bệnh học (phần sụn khớp)	0,2±0,04	0,5±0,05	0,2±0,05
Đặc điểm của các phát hiện bệnh học ở phần xương xốp của khớp so với nhóm N	—	Thể tích xương có khuynh hướng tăng. Hiện có nhiều tế bào tạo xương	Thể tích xương giống như nhóm N. Số tế bào tạo xương và tế bào xương là giống nhóm N hiện có.

Số chuột thử nghiệm : n=4

Xem xét các kết quả của các thử nghiệm đánh giá đặc tính

Từ các kết quả của thử nghiệm đánh giá 2-1 và 2-3 trên đây (Bảng 11, 14 và 16), có thể hiểu rằng PC chứa Pro-Hyp, FC và PC-CA có tác dụng thúc đẩy sự tái tạo các sụn khớp tốt hơn nhiều so với Hyp-Gly và PC-Cont không chứa Pro-Hyp và PC-CA-Cont.

Ngoài ra, trong các thử nghiệm đánh giá 2-2 và 2-4, việc sử dụng một mình Pro-Hyp là một dipeptit tổng hợp có tác dụng tốt trong việc thúc đẩy sự tái tạo các sụn khớp. Mặt khác, đối với prolin, hydroxyprolin, glyxin, hỗn

hợp của chúng, và Pro-Hyp-Gly, không quan sát thấy tác dụng thúc đẩy sự tái tạo các sụn khớp (Bảng 12 và 18).

Cũng trong thử nghiệm đánh giá 2-5, việc sử dụng một mình Pro-Hyp là một dipeptit tổng hợp có tác dụng tốt trong việc thúc đẩy sự tái tạo các sụn khớp (Bảng 19).

Chất ức chế bệnh

Các chất ức chế bệnh có thể thu được nhờ Pro-Hyp nêu trên hoặc peptit collagen chứa Pro-Hyp. Các ví dụ về các chế phẩm của chúng được thể hiện dưới đây để viện dẫn.

Ví dụ tham khảo 2-1 đến 2-3

Trộn các thành phần theo các chế phẩm nêu trong Bảng 20, và xenluloza tinh thể được sử dụng làm nguyên liệu tạo hình với tỷ lệ 10 phần so với toàn bộ mỗi chế phẩm như được mô tả trong Bảng 20 để tiến hành nén viên nén bằng phương pháp thông thường, nhờ đó thu được các chất ức chế bệnh theo các ví dụ tham khảo 2-1 đến 2-3 để sử dụng qua đường miệng. Ngoài ra, trong bảng 20, Pro-Hyp là dipeptit tổng hợp do BACHEM sản xuất như được sử dụng trong thử nghiệm đánh giá đặc tính trên đây, và PC, PC-Cont và PC-CA-Cont là các peptit collagen như được sử dụng trong các thử nghiệm đánh giá đặc tính trên đây.

Bảng 20

	Ví dụ 2-1 (% trọng lượng)	Ví dụ 2-2 (% trọng lượng)	Ví dụ 2-3 (% trọng lượng)
Pro—Hyp	4	4	—
PC	—	—	76
PC—Cont	72	—	—
PC—CA—Cont	—	72	—
Canxi (nghiền canxi hóa vỏ sò)	6	6	6
Glucosamin hydroclorua	14	14	14
Vitamin C	4	4	4

Ví dụ tham khảo 2-4

Các viên nén loại nhai được với lượng 0,8g mỗi viên nén được bào chế theo cách giống như ví dụ 14 ngoại trừ là peptit collagen (PC) chứa Hyp-Gly nêu trong ví dụ 4 được thay bằng peptit collagen (PC) chứa Pro-Hyp như được sử dụng trong các thử nghiệm đánh giá đặc tính trên đây. Các viên nén loại nhai được này chứa Pro-Hyp làm thành phần hữu hiệu với tỷ lệ 4,5% trọng lượng nếu giả sử toàn bộ trọng lượng là 100% trọng lượng.

Ngoài ra, tổng số (Y) các trình tự của Pro-Hyp được chứa trong collagen typ I thu được từ da lợn (trọng lượng (X) g) mà có trình tự axit amin đã biết được đếm, và lượng theo lý thuyết của Pro-Hyp trong toàn bộ lượng collagen typ I được xác định từ công thức dưới đây, sao cho lượng này bằng 9,0% trọng lượng.

$$((\text{Số (Y) của Pro-Hyp}) \times (\text{trọng lượng (trọng lượng phân tử) của Pro-Hyp})) / (\text{trọng lượng (X) của tất cả các trình tự})$$

Từ công thức trên đây cho thấy PC trên đây chứa Pro-Hyp với tỷ lệ theo lý

thuyết là 9,0% trọng lượng là tối đa.

Các ví dụ tham khảo nêu dưới đây từ 2-5 đến 2-8 cũng là các ví dụ về các chế phẩm trong trường hợp mà PC nêu trên chứa Pro-Hyp với tỷ lệ 9,0% trọng lượng là tối đa được sử dụng trong nhiều mục đích khác nhau theo cách giống ví dụ tham khảo 2-4 này.

Ví dụ tham khảo 2-5

Súp bột trong (6,0g mỗi túi) được sử dụng bằng cách hòa tan súp này vào 100 đến 140ml nước nóng được chuẩn bị theo cách giống như ví dụ 15 ngoại trừ là peptit collagen (PC) chứa Hyp-Gly nêu trong ví dụ 4 được thay thế bằng peptit collagen (PC) chứa Pro-Hyp như sử dụng trong các thử nghiệm đánh giá đặc tính nêu trên. Súp bột trong này chứa Pro-Hyp làm thành phần hữu hiệu với tỷ lệ 3,2% trọng lượng nếu giả sử toàn bộ khối lượng là 100% trọng lượng.

Ví dụ tham khảo 2-6

Bột hoa quả (13,0g mỗi túi) được sử dụng bằng cách hòa tan bột này vào 100 đến 150ml nước được chuẩn bị theo cách giống như ví dụ 16 ngoại trừ là peptit collagen (PC) chứa Hyp-Gly nêu trong ví dụ 4 được thay bằng peptit collagen (PC) chứa Pro-Hyp như được sử dụng trong các thử nghiệm đánh giá đặc tính nêu trên. Bột hoa quả này chứa Pro-Hyp làm thành phần hữu hiệu với tỷ lệ 3,6% trọng lượng nếu giả sử toàn bộ trọng lượng là 100% trọng lượng.

Ví dụ tham khảo 2-7

Đồ uống giúp làm tỉnh táo (125ml một hộp) được điều chế theo cách giống như ví dụ 17 ngoại trừ là peptit collagen (PC) chứa Hyp-Gly nêu trong ví dụ 4 được thay thế bằng peptit collagen (PC) chứa Pro-Hyp như được sử dụng trong các thử nghiệm đánh giá đặc tính nêu trên. Đồ uống giúp làm tỉnh táo này chứa một lượng hữu hiệu Pro-Hyp với tỷ lệ 0,2% trọng lượng nếu giả sử toàn bộ trọng lượng là 100% trọng lượng.

Ví dụ tham khảo 2-8

Kẹo gồm (4g mỗi viên) được điều chế theo cách giống như ví dụ 18 ngoại trừ là peptit collagen (PC) chứa Hyp-Gly nêu trong ví dụ 4 được thay thế bằng peptit collagen (PC) chứa Pro-Hyp như được sử dụng trong các thử nghiệm đánh giá đặc tính nêu trên. Kẹo gồm này chứa Pro-Hyp làm thành phần hữu hiệu với tỷ lệ 0,45% trọng lượng nếu giả sử toàn bộ trọng lượng là 100% trọng lượng.

Ví dụ tham khảo 2-9

Các thành phần được trộn theo các chế phẩm giống ví dụ tham khảo 2-1 như được thể hiện trong Bảng 20 ngoại trừ là không sử dụng bất kỳ thành phần nào trong số PC-Cont, canxi và vitamin C. Pha loãng hỗn hợp thu được đến 5mmol/l bằng dung dịch nước muối sinh lý, nhờ đó thu được chất ức chế bệnh theo ví dụ tham khảo 2-9 sử dụng bằng cách tiêm vào vị trí khu trú ở khớp.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Vì peptit collagen theo sáng chế bao gồm dipeptit mà là thành phần hữu hiệu của chất ức chế bệnh để ngăn ngừa hoặc điều trị các triệu chứng chẳng hạn như loãng xương, viêm xương khớp và loét do tỳ đè, nên peptit collagen này có thể được sử dụng thích hợp ở dạng đồ ăn tốt cho sức khỏe và thuốc có các chức năng này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chất ức chế bệnh chứa dipeptit Hyp-Gly và ít nhất một dipeptit được chọn từ nhóm bao gồm Pro-Hyp và Ala-Hyp.
2. Chất ức chế bệnh theo điểm 1, trong đó chất ức chế bệnh này còn chứa glucosamin và/hoặc muối của nó.