



(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)



1-0035777

(51)⁷ A23L 33/105; A61K 127/00; A61K 135/00; A61P 37/04; A61K 36/63; A61K 36/78; A61K 45/00; A23L 2/52; A61K 36/28 (13) B

(21) 1-2019-04817

(22) 10/10/2018

(86) PCT/JP2018/037643 10/10/2018

(87) WO 2019/106967 06/06/2019

(30) 2017-230085 30/11/2017 JP

(45) 25/05/2023 422

(43) 25/08/2020 389ASC

(73) 1. TORII Kazuhito (JP)

3-11-2, Higashimachi, Koganei-shi, Tokyo 1840011, Japan

2. TORII Tomoko (JP)

3-11-2, Higashimachi, Koganei-shi, Tokyo 1840011, Japan

(72) TORII Kazuhito (JP); DAN Katsuaki (JP).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẤT HOẠT HÓA MIỄN DỊCH, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỰC PHẨM VÀ ĐỒ UỐNG ĐỀ HOẠT HÓA MIỄN DỊCH VÀ THUỐC CHỨA CHẤT HOẠT HÓA MIỄN DỊCH

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch bao gồm bước sấy khô để làm khô *Gynura procumbens* ở nhiệt độ cao hơn hoặc bằng 0°C và thấp hơn hoặc bằng 40°C; và bước cắt/nghiền mịn để cắt hoặc nghiền mịn *Gynura procumbens* đã được làm khô trong bước sấy khô trong khi vẫn giữ ở nhiệt độ cao hơn hoặc bằng 0°C và thấp hơn hoặc bằng 40°C.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch và phương pháp sản xuất thực phẩm và đồ uống để hoạt hóa miễn dịch.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Miễn dịch là hệ thống phòng ngự để bảo vệ chống lại các tác động bất lợi bởi sự xâm nhập vào cơ thể của các kháng nguyên như vi khuẩn và virus. Tính miễn dịch trong cơ thể sống có thể được chia thành hai loại là miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thu được.

Sự miễn dịch bẩm sinh tác động ngay sau khi kháng nguyên đi vào cơ thể và truyền thông tin về kháng nguyên đến miễn dịch thu được. Ở đây, các đại thực bào, tế bào giết tự nhiên, tế bào đuôi gai và các tế bào tương tự có liên quan đến miễn dịch bẩm sinh, và sự thải loại nhờ tiêu hóa và sự phân hủy của các kháng nguyên, sự sản xuất các xytokin và chất tương tự được tiến hành.

Ngoài ra, miễn dịch thu được được thực hiện bởi các tế bào T mà thông tin được truyền đến các tế bào này bởi các tế bào miễn dịch liên quan đến miễn dịch bẩm sinh của các đại thực bào hoặc tế bào tương tự. Ở đây, các tế bào T liên quan đến miễn dịch thu được được biến đổi thành tế bào Th1 hoặc tế bào Th2 bởi các tế bào T giúp đỡ chưa trưởng thành nhận sự kích thích gây biệt hóa bởi các xytokin hoặc chất tương tự. Tế bào Th1 liên quan đến miễn dịch được điều tiết bởi tế bào và tăng cường khả năng phòng vệ sinh học như ngăn ngừa sự lây nhiễm và tính miễn dịch kháng khối u. Tương tự, tế bào Th2 liên quan đến tính miễn dịch thể dịch.

Ngoài ra, nhiều nghiên cứu khác đã được thực hiện đối với chất hoạt hóa miễn dịch để tăng cường khả năng phòng vệ sinh học như ngăn ngừa sự lây nhiễm và tính miễn dịch kháng khối u và điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh lây nhiễm và bệnh ung thư

(xem, ví dụ Tài liệu sáng chế 1, và Tài liệu sáng chế 2).

Trong Tài liệu sáng chế 1, các nghiên cứu được thực hiện ở các cây thuộc chi *Salacia* hoặc các chiết phẩm của chúng và các chất chuyển hóa của các catechin có nguồn gốc từ chè trong Tài liệu sáng chế 2, theo thứ tự. Ngoài ra, như được mô tả trong Tài liệu sáng chế 2 là “tác dụng của các chất chuyển hóa catechin lên hoạt tính tế bào NK (tế bào giết tự nhiên) là chưa biết”, được cho rằng có nhiều tác dụng chưa biết của các thành phần thu được từ các sản phẩm tự nhiên.

Danh mục tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: JP 2010-235544 A

Tài liệu sáng chế 2: JP 2016-160238 A

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch mới thu được từ sản phẩm tự nhiên và phương pháp sản xuất thực phẩm và đồ uống để hoạt hóa miễn dịch.

Giải quyết vấn đề

Theo kết quả từ các nghiên cứu chuyên sâu, các tác giả sáng chế đã nhận thấy rằng mục đích trên có thể đạt được bằng cách sử dụng *Gynura* (chi *Gynura* của họ Asteraceae), nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Tức là, sáng chế đề xuất:

(1) phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch bao gồm: bước sấy khô để làm khô *Gynura procumbens* ở nhiệt độ cao hơn hoặc bằng 0°C và thấp hơn hoặc bằng 40°C; và bước cắt/nghiên mịn để cắt hoặc nghiền mịn *Gynura procumbens* đã được làm khô trong bước sấy khô trong khi vẫn giữ ở nhiệt độ cao hơn hoặc bằng 0°C và thấp hơn hoặc bằng 40°C,

(2) phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch theo (1), trong đó ít nhất một trong số lá hoặc gốc của *Gynura procumbens* được sử dụng làm *Gynura procumbens*,

(3) phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch theo (1) hoặc (2), còn bao gồm bước bổ sung ít nhất một trong số các vitamin, ôliu hoặc chiết phẩm từ ôliu, và *Houttuynia cordata* hoặc chiết phẩm từ *Houttuynia cordata*, và

(4) phương pháp sản xuất thực phẩm và đồ uống để hoạt hóa miễn dịch, bao gồm bước trộn chất hoạt hóa miễn dịch thu được bằng phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) vào thực phẩm hoặc đồ uống.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Theo sáng chế, phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch mới thu được từ sản phẩm tự nhiên và phương pháp sản xuất thực phẩm và đồ uống để hoạt hóa miễn dịch được đề xuất.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 minh họa đồ thị kết quả của nghiên cứu về phản ứng gây miễn dịch.

FIG. 2 minh họa đồ thị kết quả của nghiên cứu về phản ứng gây miễn dịch.

FIG. 3 minh họa đồ thị kết quả của nghiên cứu về phản ứng gây miễn dịch.

FIG. 4 minh họa đồ thị kết quả của nghiên cứu về đáp ứng miễn dịch bẩm sinh.

FIG. 5 minh họa đồ thị kết quả của nghiên cứu về đáp ứng miễn dịch thu được.

FIG. 6 minh họa đồ thị kết quả của nghiên cứu về tác dụng giết tế bào trực tiếp đối với tế bào ung thư.

FIG. 7 minh họa đồ thị thể hiện kết quả của nghiên cứu về hoạt tính gây độc tế bào ở tế bào ung thư thông qua sự hoạt hóa tế bào giết và tế bào giết tự nhiên.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch theo sáng chế và phương

pháp sản xuất thực phẩm và đồ uống để hoạt hóa miễn dịch sẽ được mô tả. Phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch theo sáng chế bao gồm bước sấy khô để làm khô *Gynura* ở nhiệt độ cao hơn hoặc bằng 0°C và thấp hơn hoặc bằng 40°C và bước cắt/nghiền mịn để cắt hoặc nghiền mịn *Gynura* đã được làm khô trong bước sấy khô trong khi vẫn giữ ở nhiệt độ cao hơn hoặc bằng 0°C và thấp hơn hoặc bằng 40°C .

Gynura thuộc chi *Gynura* của họ Asteraceae. Ví dụ về chi *Gynura* bao gồm *Gynura bicolor*, *Gynura cusimbua*, *Gynura divaricata*, *Gynura eliptica*, *Gynura formosana*, *Gynura japonica* (*Gynura segetum*), *Gynura nepalensis*, *Gynura procumbens*, *Gynura pseudochina* và tương tự, và *Gynura procumbens* có thể được sử dụng một cách thích hợp.

Làm *Gynura procumbens*, phần bất kỳ trong số lá, gốc, rễ và phần tương tự có thể được sử dụng, nhưng tốt hơn là lá hoặc gốc được sử dụng, và tốt hơn nữa là lá được sử dụng.

Tốt hơn là sử dụng *Gynura* đã được sấy khô sau khi gom, và cắt hoặc nghiền mịn. Bước sấy khô tốt hơn là được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ cao hơn hoặc bằng 0°C và thấp hơn hoặc bằng 40°C , tốt hơn là cao hơn hoặc bằng 0°C và thấp hơn hoặc bằng 36°C , và tốt hơn nữa là cao hơn hoặc bằng 0°C và thấp hơn hoặc bằng 34°C . Tương tự, tốt hơn là tiến hành bước sấy khô tách ẩm ở nhiệt độ thấp.

Khi bước sấy khô được tiến hành ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ nêu trên, được cho là thành phần thể hiện hiệu quả của sáng chế trong số các thành phần chứa trong *Gynura* bị biến đổi hoặc phân hủy, và hiệu quả của sáng chế không thể đạt được. Tương tự, ngay cả khi được làm đông lạnh và bảo quản trước hoặc sau khi cắt hoặc nghiền mịn, hiệu quả của sáng chế không thể đạt được.

Hơn nữa, độ ẩm ở thời điểm sấy khô tách ẩm nhiệt độ thấp tốt hơn nếu là 10% hoặc thấp hơn theo độ ẩm tương đối. Ngoài ra, bước sấy khô tách ẩm nhiệt độ thấp tốt hơn là được tiến hành trong khoảng từ vài giờ đến 50 giờ, và tốt hơn nữa là được tiến hành trong khoảng từ 10 giờ đến 30 giờ.

Ngoài ra, phương pháp cắt hoặc nghiền mịn Gynura có thể được thực hiện bằng phương pháp cắt hoặc nghiền mịn đã biết, nhưng tốt hơn là cắt hoặc nghiền mịn lá của Gynura trong khi vẫn giữ ở khoảng nhiệt độ dưới các điều kiện sấy khô ở trên. Để thực hiện phương pháp này, tốt hơn là sử dụng máy nghiền kiểu làm mát, và ví dụ, máy nghiền bi hoặc máy làm đồng nhất thực hiện nghiền mịn trong khi làm mát, máy nghiền đá loại làm mát bằng nước hoặc thiết bị tương tự có thể được sử dụng.

Từ quan điểm giữ cho trạng thái bảo quản Gynura được tốt, không ưu tiên việc ép Gynura bằng máy ép hoặc thiết bị tương tự và bảo quản nó ở trạng thái chứa hơi ẩm. Tốt hơn là bảo quản Gynura ở trạng thái khô như theo sáng chế.

Gynura được xử lý như được mô tả ở trên có thể được sử dụng làm chất hoạt hóa miễn dịch.

Ôliu hoặc chiết phẩm từ ôliu, hoặc *Houttuynia cordata* hoặc chiết phẩm từ *Houttuynia cordata* có thể được bổ sung vào Gynura được xử lý như được mô tả ở trên. Ngoài ra, các thành phần khác như các vitamin, axit amin, protein, khoáng chất, axit béo và peptit có thể được bổ sung vào chất hoạt hóa miễn dịch chứa Gynura hoặc chiết phẩm từ Gynura theo sáng chế. Vitamin tốt hơn là được bổ sung làm thành phần bổ sung, và ví dụ về các vitamin bao gồm vitamin A, vitamin B, vitamin C, vitamin E hoặc dẫn xuất của các vitamin này.

Tỷ lệ theo trọng lượng của Gynura được xử lý như được mô tả ở trên với lượng tổng của ôliu hoặc chiết phẩm từ ôliu, hoặc *Houttuynia cordata* hoặc chiết phẩm từ *Houttuynia cordata* và các thành phần bổ sung tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50:50 đến 100:0, tốt hơn nữa là từ 70:30 đến 100:0, và còn tốt hơn là từ 80:20 đến 100:0.

Chất hoạt hóa miễn dịch thu được bằng phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch theo sáng chế có thể được trộn vào thực phẩm, đồ uống, và sản phẩm tương tự. Ví dụ về thực phẩm bao gồm bánh mì, mì, kẹo, sản phẩm chế biến từ thịt, sản phẩm chế biến từ cá, thực phẩm đông lạnh, mứt, kem, sản phẩm từ sữa, các loại gia vị, và loại tương tự. Ngoài các thực phẩm thông thường, nó có thể được trộn vào các thực phẩm

dùng cho sức khỏe được chỉ định, thuốc không cần kê đơn, thực phẩm sức khỏe, và chất bổ sung. Ví dụ về đồ uống bao gồm đồ uống không chứa cồn, đồ uống từ sữa, đồ uống chứa cồn, trà, đồ uống từ trà đen, cà phê, đồ uống là nước ép trái cây, đồ uống có ga, nước khoáng, đồ uống từ trái cây và rau, và đồ uống tương tự.

Ngoài ra, thực phẩm hoặc đồ uống được trộn với chất hoạt hóa miễn dịch thu được bằng phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch theo sáng chế có thể ở cùng một dạng như chế phẩm dùng qua đường miệng như viên nén, viên nang, hoặc siro.

Tương tự, khi sản xuất thực phẩm hoặc đồ uống được trộn với chất hoạt hóa miễn dịch thu được bằng phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch theo sáng chế, nếu cần, các chất phụ gia như chất tạo ngọt, chất tạo màu, chất bảo quản, chất làm đặc, chất làm ổn định, chất tạo gel, chất chống oxy hóa, chất màu, chất tẩy trắng, chất nhũ hóa, chất làm trương, chất axit hóa, chất làm sáng và hương; dung môi; và dầu có thể được bổ sung. Một trong số các chất phụ gia này có thể được sử dụng một mình, hoặc hai hoặc nhiều hơn hai trong số các chất phụ gia này có thể được sử dụng kết hợp.

Tỷ lệ thành phần của chất hoạt hóa miễn dịch được trộn vào thực phẩm hoặc đồ uống có thể được điều chỉnh thích hợp theo mục đích sử dụng, nhưng tỷ lệ thành phần của chất hoạt hóa miễn dịch được trộn vào thực phẩm hoặc đồ uống tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 80% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 0,003 đến 50% trọng lượng, và tốt hơn nữa là từ 0,005 đến 30% trọng lượng.

Ngoài ra, chất hoạt hóa miễn dịch thu được bằng phương pháp theo sáng chế là hữu ích trong lĩnh vực y tế cho các ứng dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh lây nhiễm và bệnh ung thư. Chất hoạt hóa miễn dịch theo sáng chế có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc có thể được trộn với chất phụ gia được dùng thông thường và tạo thành chế phẩm. Ngoài ra, ví dụ về dạng sử dụng bao gồm dạng sử dụng sử dụng chất qua miệng như viên nén, hạt, viên nang, viên tròn, bột, chất lỏng, huyền phù, nhũ tương, siro, cồn ngọt hoặc chiết phẩm, dạng sử dụng sử dụng chất ngoài đường tiêu hóa như chất tiêm, dung dịch, thuốc đạn, thuốc mỡ, cao dán, thuốc đắp hoặc thuốc xức ngoài da, và loại tương tự, nhưng nó không bị giới hạn cụ thể và có thể được chọn thích hợp theo

mục đích của việc điều trị và tương tự.

Trong trường hợp viên nén, hạt, viên tròn, viên nang hoặc bột, các chất phụ gia như tá dược, chất gắn kết, chất gây rã, và chất gây trơn có thể được bao gồm. Ví dụ về tá dược bao gồm tinh bột, carboxymetyl xenluloza, đường trắng, dextrin, tinh bột bắp, và tương tự.

Ví dụ về chất gắn kết bao gồm xenluloza kết tinh, carmeloza natri xenluloza kết tinh, metyl xenluloza, hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl xenluloza được thế thấp, hydroxypropyl metyl xenluloza, hydroxypropyl metyl xenluloza phtalat, hydroxypropyl metyl xenluloza axetat suxinat, carmeloza natri, etyl xenluloza, carboxymetyl etyl xenluloza, hydroxyetyl xenluloza, tinh bột lúa mì, tinh bột gạo, tinh bột bắp, tinh bột khoai tây, dextrin, tinh bột hồ hóa sơ bộ, tinh bột hồ hóa sơ bộ một phần, tinh bột hydroxypropyl, pullulan, polyvinyl pyrrolidon, copolyme amino alkyl metacrylat E, copolyme amino alkyl metacrylat RS, copolyme axit metacrylic L, copolyme axit metacrylic, polyvinyl axetal diethylamino axetat, rượu polyvinyl, gôm arabic, bột acacia, aga, gelatin, sen-lắc trắng, tragacan, đường trắng tinh luyện, và macrogol.

Ví dụ về chất gây rã bao gồm xenluloza kết tinh, metylxenluloza, hydroxypropyl xenluloza được thế thấp, carmeloza, carmeloza canxi, carmeloza natri, croscarmeloza natri, tinh bột lúa mì, tinh bột gạo, tinh bột bắp, tinh bột khoai tây, tinh bột hồ hóa sơ bộ một phần, tinh bột hydroxypropyl, tinh bột carboxymetyl natri, và tragacan.

Ví dụ về chất gây trơn bao gồm tinh bột lúa mì, tinh bột gạo, tinh bột bắp, axit stearic, canxi stearat, magie stearat, silic dioxit hydrat hóa, axit silixic khan nhẹ, nhôm silicat tổng hợp, gel nhôm hydroxit khô, bột talc, magie aluminometasilicat, canxi hydro phosphat, canxi hydro phosphat khan, este của sucroza axit béo, sáp, dầu thực vật hydro hóa, và polyetylen glycol.

Ngoài ra, trong trường hợp chất lỏng, siro, huyền phù, nhũ tương hoặc cồn ngọt, ngoài các chất pha loãng thường được sử dụng như nước và dầu thực vật, chất màu, chất làm giảm nhẹ, chất tạo hương vị và chất tương tự có thể được đưa vào làm các chất

phụ gia.

Tương tự, trong trường hợp chất tiêm, các chất phụ gia như huyền phù, nhũ tương và chất hòa tan khi dùng có thể được đưa vào. Hơn nữa, trong trường hợp thuốc mỡ hoặc thuốc đạn, chất béo, dầu béo, lanolin, vazolin, parafin, sáp, nhựa, chất dẻo, bazơ, glycol, rượu cao, nước, chất nhũ hóa và chất tạo huyền phù có thể được đưa vào làm các chất phụ gia. Ngoài ra, trong trường hợp thuốc đắp, glyxerin, nước, polyme tan trong nước, polyme hấp thụ nước và chất tương tự có thể được đưa vào làm các chất phụ gia. Ngoài ra nữa, trong trường hợp thuốc xức ngoài da, dung môi, chất nhũ hóa, chất tạo huyền phù và chất tương tự có thể được đưa vào làm các chất phụ gia.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả bằng các ví dụ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này. Trong các ví dụ này, phần và % là theo trọng lượng trừ khi được quy định khác.

Trong các ví dụ này, đối với *Gynura*, (1) nghiên cứu về phản ứng gây miễn dịch, (2) nghiên cứu về đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và đáp ứng miễn dịch thu được, và (3) nghiên cứu về hoạt tính gây độc tế bào đến tế bào ung thư được tiến hành.

(1) Nghiên cứu về phản ứng gây miễn dịch

(Chuẩn bị mẫu)

Dùng làm mẫu lá *Gynura* để sử dụng cho nghiên cứu phản ứng gây miễn dịch, bốn loại được mô tả dưới đây được chuẩn bị.

Mẫu A. Lá *Gynura* (*Gynura procumbens*) gom được đưa qua bước sấy khô tách ẩm ở nhiệt độ thấp ở các điều kiện nhiệt độ từ 20 đến 30°C và độ ẩm tương đối thấp hơn hoặc bằng 10%. Lá *Gynura* sau khi đã được tách ẩm và sấy khô ở nhiệt độ thấp được nghiền mịn ở nhiệt độ từ 20 đến 30°C và cho vào nước siêu tinh khiết để thu được mẫu.

Mẫu B. Lá *Gynura* (*Gynura procumbens*) gom được đưa qua máy ép tóc

độ thấp ở nhiệt độ trong phòng (khoảng 25°C), và cả chất lỏng và xơ thu được đều được sử dụng làm mẫu.

Mẫu C. Lá *Gynura* (*Gynura procumbens*) gom được đưa qua máy ép tốc độ thấp ở nhiệt độ trong phòng (khoảng 25°C), và chỉ chất lỏng trong số chất lỏng và xơ thu được được sử dụng làm mẫu.

Mẫu D. Mẫu B được làm đông và sau đó làm tan chảy và được sử dụng làm mẫu.

Tương tự, lá được sử dụng làm mẫu đối với lá cây son trà Nhật Bản, lá *Sasa albo-marginata*, lá *Angelica keiskei* và lá *Houttuynia cordata*.

(Nghiên cứu phản ứng gây miễn dịch)

Các mẫu từ A đến D, các mẫu lá cây son trà Nhật Bản, lá *Sasa albo-marginata*, lá *Angelica keiskei* và lá *Houttuynia cordata* mỗi loại được pha loãng đến 1/10000 và được bổ sung vào tế bào lá lách chuột nhắt, và các thay đổi về lượng xytokin-mARN ở thời điểm đó được nghiên cứu bằng phương pháp PCR định lượng.

Cụ thể hơn, các trường hợp trong đó các thay đổi về lượng xytokin-mARN gồm sáu loại sử dụng (i) không chất phản ứng gây miễn dịch, (ii) 2 µg/mL concanavalin A (ConA) làm chất phản ứng gây miễn dịch, (iii) 1 µg/mL lipopolysaccharit (LPS) được nghiên cứu. Ngoài ra, các trường hợp trong đó (i) đến (iii) được thực hiện mà không bổ sung mẫu (sau đây gọi là “chỉ có kích thích thuốc”) cũng được nghiên cứu.

Ngoài ra, làm các xytokin, sáu loại, IL1a, IFN, TNF, IL4, IL12 và IL2, được nghiên cứu. Kết quả được thể hiện trên các hình từ FIG. 1 đến FIG. 3. Sự chênh lệch so với mức biểu hiện tương đối trên cơ sở mARN (GAPDH) được biểu hiện không đổi trong tế bào được chỉ ra là giá trị Delta Ct (khác về số chu trình PCR). Kết quả được thể hiện trên các hình từ FIG. 1 đến FIG. 3.

Dựa vào các hình từ FIG. 1 đến FIG. 3 được xem là, từ mức độ tăng IL1a, IFN và IL4, trong các mẫu lá *Gynura* (mẫu A đến D), mẫu A được nghiền mịn sau khi sấy khô tách ẩm ở nhiệt độ thấp có thể chiết hiệu quả hoặc giữ thành phần hoạt tính gây

phản ứng miễn dịch. Ngoài ra, từ mức độ tăng IL1a, IFN và IL4, được gợi ý là tác dụng của các mẫu lá *Sasa albo-marginata* và lá *Houttuynia cordata* là mạnh.

(2) Nghiên cứu đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và đáp ứng miễn dịch thu được

(Chuẩn bị mẫu)

Mẫu A được sử dụng cho nghiên cứu về phản ứng gây miễn dịch được sử dụng làm mẫu lá *Gynura* được sử dụng cho nghiên cứu đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và đáp ứng miễn dịch thu được (sau đây gọi là “mẫu lá *Gynura*” trong phần này).

Tương tự, lá *Houttuynia cordata* và lá ôliu được sử dụng làm mẫu. Mẫu cũng được chuẩn bị đối với fucoidan để có nồng độ tương đương với mẫu lá *Gynura*.

(Nghiên cứu đáp ứng miễn dịch bẩm sinh)

Các đại thực bào được phân lập từ chuột nhắt, và mỗi mẫu được pha loãng đến 1/100, 1/1000, 1/10000 và 1/100000, theo thứ tự, được bổ sung vào đó, sau đó bổ sung lượng cố định hạt huỳnh quang, và hỗn hợp được nuôi cấy trong 8 giờ. Sau đó, các đại thực bào đã được nuôi cấy được quan sát bằng kính hiển vi phát huỳnh quang, và lượng hạt huỳnh quang được hấp thụ được số hóa dưới dạng lượng phát huỳnh quang.

Dùng làm mẫu, mẫu lá *Gynura*, lá *Houttuynia cordata*, lá ôliu và fucoidan, và mẫu hỗn hợp của bốn loại được sử dụng. Tương tự, mẫu đối chứng không sử dụng mẫu nào trong số các mẫu này cũng được nghiên cứu.

Khi số hóa, hình ảnh thể hiện trạng thái hấp thụ hạt huỳnh quang thu được bằng cách sử dụng kính hiển vi phát huỳnh quang, và quy trình số hóa được thực hiện dựa trên tổng diện tích của độ sáng huỳnh quang nhất định hoặc lớn hơn trong hình ảnh. Kết quả được thể hiện trên FIG. 4. Trên FIG. 4, lượng huỳnh quang hấp thụ được số hóa cho mỗi lượng bổ sung (tỷ lệ pha loãng) cho mỗi mẫu được thể hiện bằng biểu đồ tần số.

(Nghiên cứu đáp ứng miễn dịch thu được)

Các lympho bào ở lách chuột nhắt (các tế bào T CD4 +) được phân lập, và mỗi mẫu được pha loãng đến 1/100, 1/1000 và 1/10000, theo thứ tự, được bổ sung vào đó,

và sau đó hỗn hợp được nuôi cấy trong 1 tuần. Được chỉ ra rằng các tế bào T được biệt hóa thành tế bào Th1 khi các tế bào T sản xuất IFN- γ , và được biệt hóa thành tế bào Th2 khi các tế bào T sản xuất IL-4, theo thứ tự.

Do đó, sau khi nuôi cấy, các lympho bào sản xuất IFN- γ được chỉ định là Th1 và các lympho bào sản xuất IL-4 được chỉ định là Th2, và sự có mặt của mỗi loại được đo bằng cách sử dụng kháng thể được đánh dấu huỳnh quang. Với mỗi mẫu, tỷ lệ Th1/Th2 được xác định với mỗi tỷ lệ pha loãng từ kết quả đo. Kết quả được thể hiện trên FIG. 5. Với các số liệu về tỷ lệ pha loãng 10000 lần của mẫu hỗn hợp theo FIG. 5, Th1/Th2 bằng 94,5, nhưng sự hiển thị được bỏ qua để dễ quan sát FIG. 5.

Từ FIG. 4 và FIG. 5, được thấy là các mẫu lá *Gynura* ảnh hưởng lớn đến đáp ứng miễn dịch thu được hơn là đáp ứng miễn dịch bẩm sinh. Điều này gợi ý rằng tác dụng kháng khối u có thể được nhận biết khi các tế bào T giết, tế bào giết tự nhiên hoặc tương tự được hoạt hóa, hoặc tác dụng giết của tế bào đối với tế bào khối u được nhận biết.

(3) Nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào trên tế bào ung thư

(Chuẩn bị mẫu)

Mẫu A trong nghiên cứu về phản ứng gây miễn dịch được sử dụng làm mẫu lá *Gynura* được sử dụng trong nghiên cứu về hoạt tính gây độc tế bào trên tế bào ung thư. (Sau đây gọi là “mẫu lá *Gynura*” trong phần này)

Tương tự, lá *Houttuynia cordata* và lá ôliu được sử dụng làm mẫu. Mẫu cũng được chuẩn bị đối với fucoidan để có nồng độ tương đương với mẫu lá *Gynura*.

(Nghiên cứu tác dụng giết tế bào trực tiếp trên các tế bào ung thư)

Tác dụng giết tế bào của tế bào giết khi nuôi cấy tế bào ung thư và bổ sung trực tiếp mỗi mẫu vào đó được nghiên cứu. Ba loại tế bào ung thư được nghiên cứu, và các dòng tế bào ung thư ở chuột nhất tiêu biểu gồm ung thư thể rắn, ung thư hệ máu, và ung thư biểu bì được sử dụng (CT-26; ung thư ruột kết, EL-4; u bạch huyết, B16 mel; u melamin). Dùng làm mẫu, các mẫu lá *Gynura*, lá *Houttuynia cordata*, lá ôliu và fucoidan,

và mẫu hỗn hợp của bốn loại này được sử dụng. Kết quả được thể hiện trên FIG. 6

Tất cả các mẫu không thể hiện tác dụng trên EL-4 và B16 mel, nhưng quan sát được tác dụng nhất định trên CT-26. Tác dụng này là đặc biệt lớn trong các mẫu lá ôliu và lá *Houttuynia cordata*.

(Nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào ung thư thông qua sự hoạt hóa các tế bào giết và tế bào giết tự nhiên)

Nhiều mẫu khác nhau được bổ sung vào các lympho bào được phân lập từ lá lách chuột nhắt và được nuôi cấy trong 1 tuần. Sau đó, tiếp tục nuôi cấy cùng với các lympho bào được nuôi cấy của ba loại tế bào ung thư được nuôi cấy riêng biệt. Ở đây, khi hoạt tính giết được kích ứng, các lympho bào làm tổn thương tế bào ung thư. Để đo mức này, việc đo được thực hiện sử dụng kit thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào (Kit phát hiện độc tính LDH được sản xuất bởi Takara Bio Inc.).

Dùng làm mẫu, các mẫu lá *Gynura*, lá *Houttuynia cordata*, lá ôliu và fucoidan, và mẫu hỗn hợp của bốn loại được sử dụng. Ngoài ra, mẫu đối chứng cũng được sử dụng làm mẫu. Làm tế bào ung thư, CT-26, EL-4 và B16 mel được sử dụng.

Ngoài ra, các lympho bào được phân lập từ các loài có khả năng thích nghi tốt và các loài có khả năng thích nghi không tốt với ba loại tế bào ung thư, theo thứ tự. Việc cảm ứng hoạt tính giết đặc hiệu ung thư có thể được xem là tế bào ung thư bị tổn thương bởi các lympho bào có khả năng thích nghi tốt và tế bào ung thư không bị tổn thương bởi các lympho bào có khả năng thích nghi không tốt. Kết quả được thể hiện trên FIG. 7 dưới dạng tỷ lệ với đối chứng.

Như được thể hiện trên FIG. 7, các mẫu trong đó hoạt tính giết trong các lympho bào có khả năng thích nghi tốt được nhận ra và hoạt tính giết trong các lympho bào có khả năng thích nghi không tốt không được nhận ra là các mẫu lá *Gynura*, lá *Houttuynia cordata* và lá (quả) ôliu. Các tác dụng của chúng thường mạnh đối với CT-26, và tác dụng này được quan sát thấy chỉ ở mẫu lá của *Gynura* trong B16 mel. Ngoài ra, một mẫu có tác dụng mạnh nhất xét về tổng thể là mẫu lá *Gynura*.

Trong mẫu hỗn hợp gồm bốn loại, fucoidan dẫn đến việc ức chế tác dụng của các mẫu khác.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch, phương pháp này chủ yếu bao gồm các bước:

bước sấy khô để làm khô tách ẩm ở nhiệt độ thấp *Gynura procumbens* ở nhiệt độ cao hơn hoặc bằng 0°C và thấp hơn hoặc bằng 40°C và ở độ ẩm tương đối thấp hơn hoặc bằng 10%; và

bước cắt/nghiền mịn để cắt hoặc nghiền mịn *Gynura procumbens* đã được làm khô trong bước sấy khô trong khi vẫn giữ ở nhiệt độ cao hơn hoặc bằng 0°C và thấp hơn hoặc bằng 40°C.

2. Phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch theo điểm 1, trong đó ít nhất một trong số lá hoặc gốc của *Gynura procumbens* được sử dụng làm *Gynura procumbens*.

3. Phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước bổ sung ít nhất một trong số các vitamin, ôliu hoặc chiết phẩm từ ôliu, và *Houttuynia cordata* hoặc chiết phẩm từ *Houttuynia cordata*.

4. Phương pháp sản xuất thực phẩm và đồ uống để hoạt hóa miễn dịch, bao gồm bước trộn chất hoạt hóa miễn dịch thu được bằng phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch theo điểm 1 vào thực phẩm hoặc đồ uống.

5. Thuốc chứa chất hoạt hóa miễn dịch thu được từ phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch theo điểm 1.

6. Phương pháp sản xuất chất hoạt hóa miễn dịch theo điểm 1, trong đó bước làm khô tách ẩm ở nhiệt độ thấp được tiến hành bằng cách sử dụng máy nghiền mịn loại làm mát.

Fig. 1.

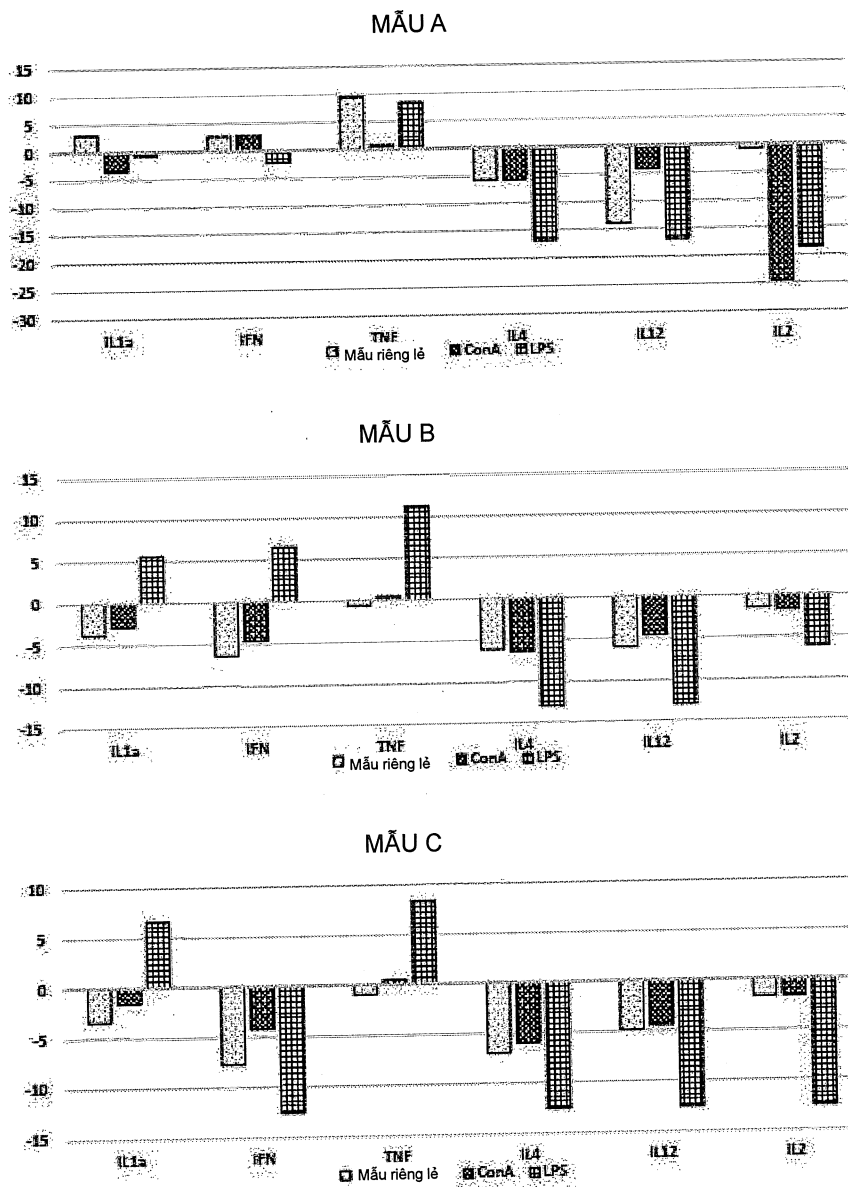


Fig. 2.

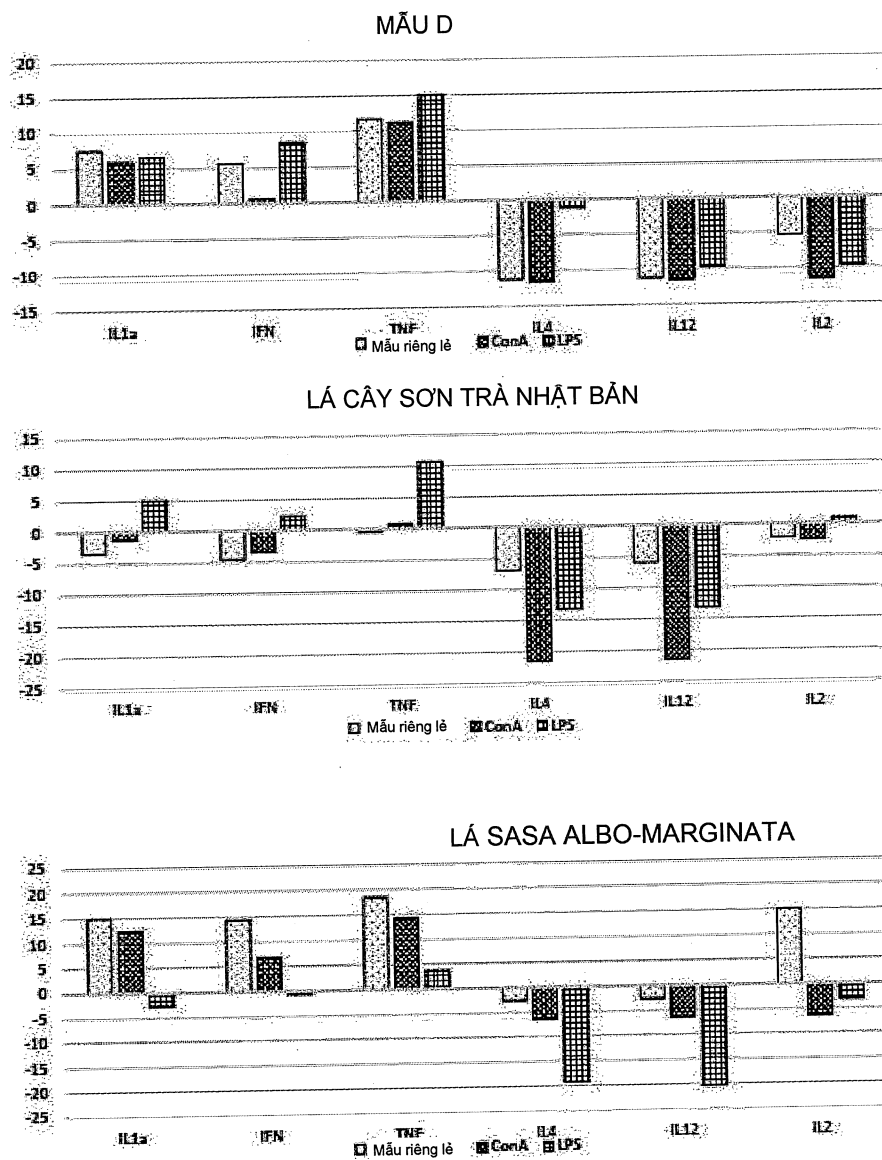


Fig. 3.

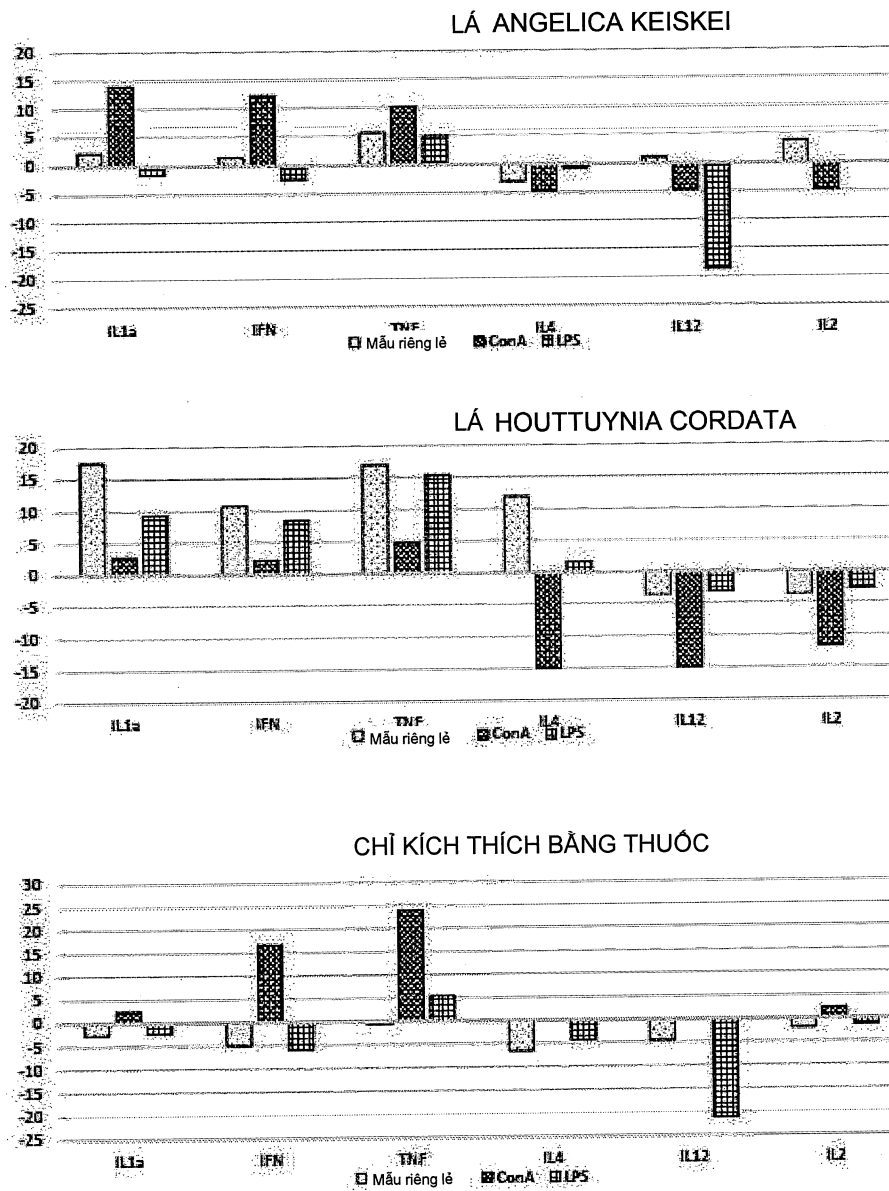


Fig. 4.

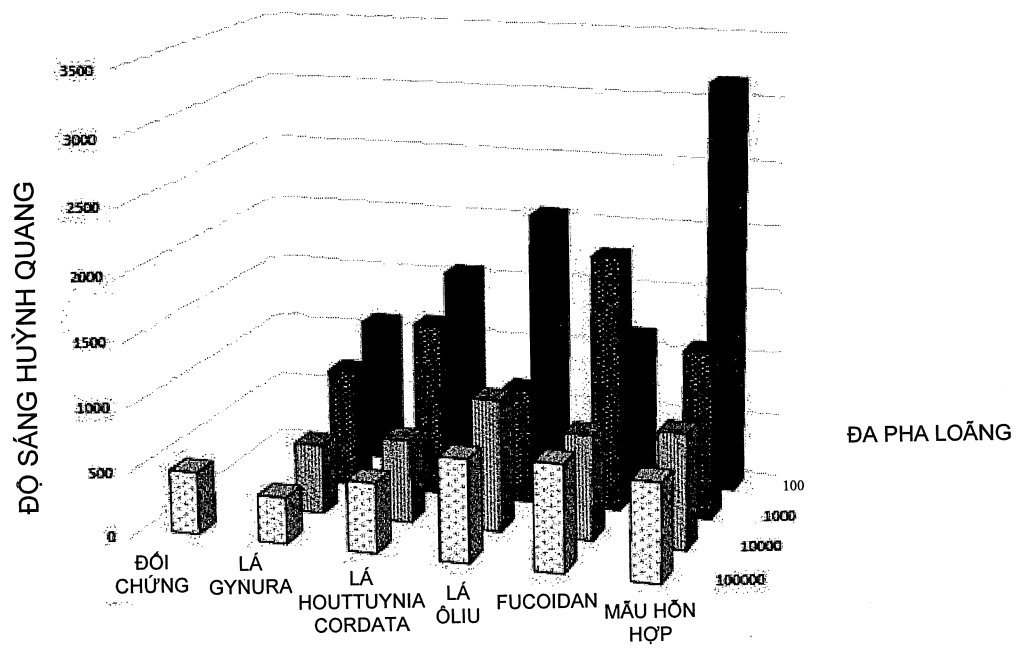


Fig. 5

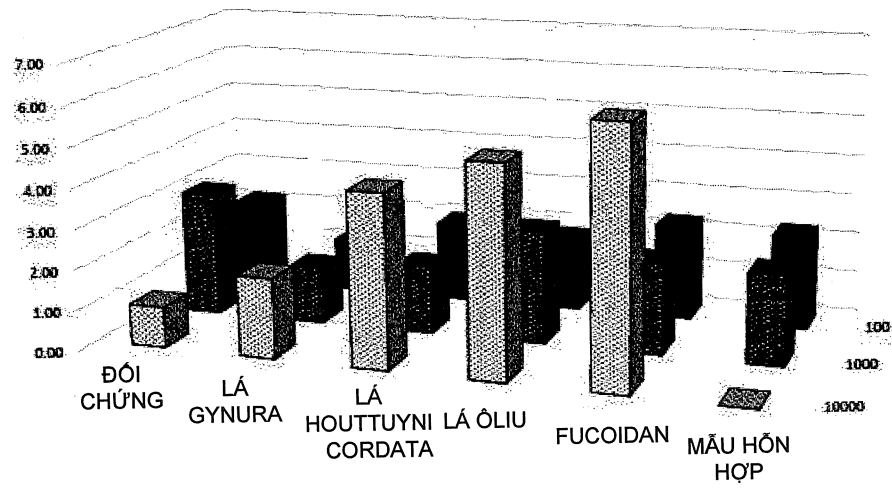


Fig. 6.

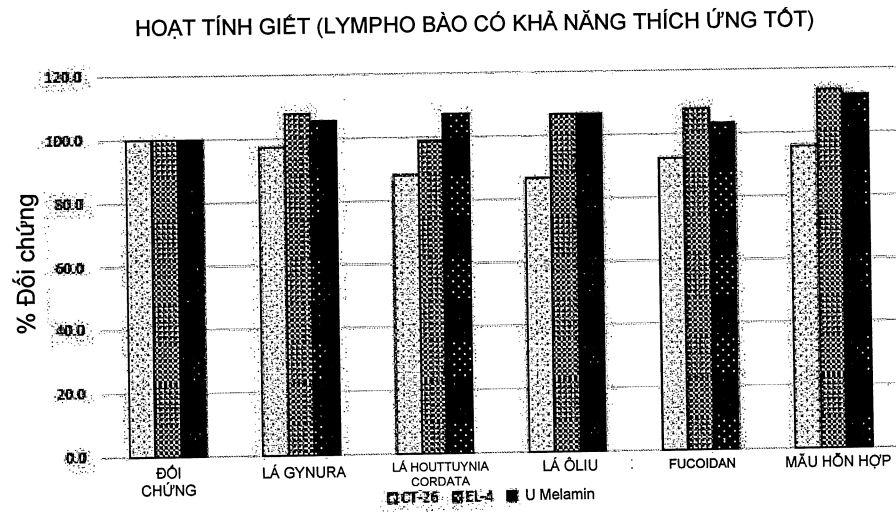


Fig. 7

