



(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)



1-0036305

(51)⁷ A23L 5/00; A61K 31/351; A61K 31/352; A61K 31/366; C07D 309/32; A61P 43/00; A61P 9/00; A61P 9/14; C07D 309/28; A23L 33/105; A61K 36/63 (13) B

(21) 1-2018-05092

(22) 14/04/2017

(86) PCT/JP2017/015311 14/04/2017

(87) WO 2017/183581 26/10/2017

(30) 2016-083041 18/04/2016 JP

(45) 25/07/2023 424

(43) 25/04/2019 373A

(73) SUNTORY HOLDINGS LIMITED (JP)

1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203, Japan

(72) KASAJIMA, Naoki (JP); KOMINAMI, Masaru (JP).

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

(54) HỢP CHẤT IRIDOIT VÀ CHẾ PHẨM HOẠT HÓA TIE2 CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm và sản phẩm tương tự có tác dụng hoạt hóa Tie2, tác dụng ức chế sự thấm mạch, tác dụng làm trưởng thành mạch, tác dụng chuẩn hóa mạch, tác dụng làm ổn định mạch, tác dụng làm ổn định mạch bạch huyết và tác dụng tương tự. Chế phẩm này chứa một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nhóm gồm các hợp chất iridoit mới (Hợp chất A, Hợp chất B), Oleanoside A, và Kaempferol.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm hoạt hóa Tie2 và sản phẩm tương tự. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm hoạt hóa Tie2, chế phẩm ức chế sự thấm mạch, chế phẩm làm trưởng thành mạch, chế phẩm chuẩn hóa mạch, chế phẩm làm ổn định mạch và chế phẩm làm ổn định mạch bạch huyết chứa một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nhóm gồm các hợp chất iridoit mới (Hợp chất A và Hợp chất B), Oleanoside A, và Kaempferol làm thành phần hoạt tính. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các hợp chất iridoit mới (Hợp chất A và Hợp chất B), và chế phẩm chứa hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ôliu (*Olea europaea*) là cây trồng thuộc chi Olive của họ Oleaceae, và được trồng rộng rãi ở nhiều nơi như vùng Địa Trung Hải. Quả của cây ôliu được sử dụng phổ biến trên toàn thế giới để chiết dầu ôliu hoặc dùng làm thực phẩm.

Quả của cây ôliu giàu các polyphenol như hydroxytyrosol, acteosit, và oleuropein (Tài liệu không phải sáng chế 1 và 2). Ngoài ra, chất chiết từ ôliu và thành phần polyphenol của nó được báo cáo là có hiệu quả để ức chế chứng xơ cứng động mạch (Tài liệu không phải sáng chế 3), ức chế bệnh cao huyết áp (Tài liệu sáng chế 1), ức chế sự giảm trọng lượng xương (Tài liệu không phải sáng chế 4), và tác dụng tương tự.

Gần đây, đã phát hiện ra rằng sự lão hóa hoặc sự giảm chức năng mạch máu tác động đến các vết nhăn, sự thô ráp da và các tình trạng của da khác, do đó được biết rằng tính tiêu chuẩn của mạch máu là chỉ số hiệu quả để xác định các tình trạng của da. Mạch máu đóng vai trò không chỉ là gửi oxy và chất dinh dưỡng đến các cơ quan trong toàn bộ cơ thể thông qua máu, mà còn lấy các sản phẩm thải ra từ mô và bài tiết chúng ra khỏi cơ thể. Do đó, mạch máu là mô quan trọng của cơ thể người để duy trì các hoạt động sống. Nhìn chung, sự lão hóa hoặc sự rối loạn chức năng mạch máu sẽ dẫn đến không chỉ các tác động đáng kể về sức khỏe đến cơ thể người như gây cứng động mạch, mà cả các dấu hiệu nhận thấy rõ ràng như vết nhăn và chứng phù. Gần đây, đối với sự lão hóa mạch máu, sự hoạt hóa thụ thể tyrosin kinaza Tie2 (Tyrosin kinaza với Ig và miền đồng nhất ECF 2) đã thu hút được sự chú ý. Được biết rằng sự hoạt hóa Tie2 bởi

angiopoietin-1 từ các tế bào thành mạch tạo ra sự kết dính giữa các tế bào nội mô mạch, và góp phần làm ổn định các tế bào nội mô mạch này. Gần đây, các thành phần và thực phẩm có sự hoạt hóa Tie2 đã được tìm thấy và sử dụng trong các chất bổ sung, đồ uống hoặc sản phẩm tương tự với mục đích thẩm mỹ, ngăn ngừa chứng phù hoặc sự tuần hoàn kém, hoặc ứng dụng tương tự (Tài liệu sáng chế 2 đến 4).

Danh mục viện dẫn

Tài liệu sáng chế

PTL 1: Công bố đơn sáng chế Nhật Bản số JP 2005-334022 A

PTL 2: Công bố đơn sáng chế Nhật Bản số JP 2014-097977 A

PTL 3: Công bố đơn sáng chế Nhật Bản số JP 2013-241356 A

PTL 4: Công bố đơn sáng chế Nhật Bản số JP 2011-102272 A

Tài liệu không phải sáng chế

NPL 1: J. Agric. Food Chem., vol.52, pp.479-484, 2004

NPL 2: J. Agric. Food Chem., vol.53, pp.8963-8969, 2005

NPL 3: Atherosclerosis, vol.188, No.1, pp.35-42, 2006

NPL 4: Clin. Nutr., vol.25, No.5, pp.859-868, 2006

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm có tác dụng hoạt hóa Tie2, tác dụng ức chế sự thấm mạch, tác dụng làm trưởng thành mạch, tác dụng chuẩn hóa mạch, tác dụng làm ổn định mạch, tác dụng làm ổn định mạch bạch huyết và tác dụng tương tự.

Giải quyết vấn đề

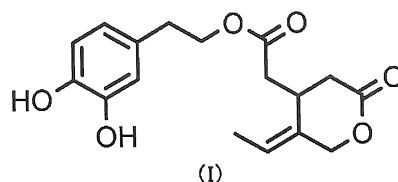
Để giải quyết vấn đề nêu trên, các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu, và đã có phát hiện mới rằng, trong số các thành phần được tách ra từ chất chiết quả ôliu, Oleanoside A và Kaempferol có tác dụng hoạt hóa Tie2, tác dụng ức chế sự thấm mạch, tác dụng làm trưởng thành mạch, tác dụng chuẩn hóa mạch, tác dụng làm ổn định mạch, tác dụng làm ổn định mạch bạch huyết và tác dụng tương tự. Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã tìm ra các hợp chất iridoit mới (Hợp chất A và Hợp chất B) từ

chất chiết quả ôliu, và chỉ ra rằng các hợp chất mới này cũng có tác dụng hoạt hóa Tie2, tác dụng ức chế sự thâm mạch, tác dụng làm trưởng thành mạch, tác dụng chuẩn hóa mạch, tác dụng làm ổn định mạch, tác dụng làm ổn định mạch bạch huyết và tác dụng tương tự, và hoàn thành sáng chế.

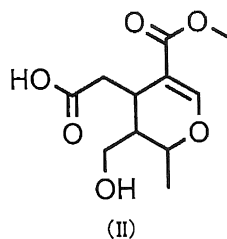
Do đó, các khía cạnh của sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các đối tượng sau.

(1) Chế phẩm hoạt hóa Tie2 chứa một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nhóm gồm hợp chất được biểu diễn bởi công thức (I), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (II), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (III) (Oleanoside A), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (IV) (Kaempferol) và muối của chúng:

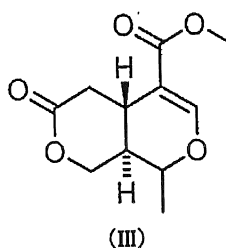
Công thức hóa học 1



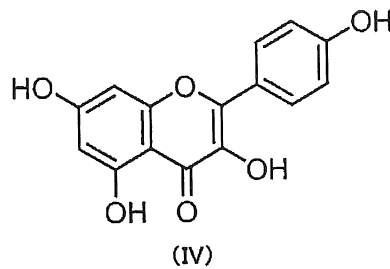
Công thức hóa học 2



Công thức hóa học 3



Công thức hóa học 4



- (2) Chế phẩm ức chế sự thấm mạch chứa một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nhóm gồm hợp chất được biểu diễn bởi công thức (I), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (II), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (III) (Oleanoside A), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (IV) (Kaempferol) và muối của chúng.
- (3) Chế phẩm làm trưởng thành mạch chứa một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nhóm gồm hợp chất được biểu diễn bởi công thức (I), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (II), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (III) (Oleanoside A), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (IV) (Kaempferol) và muối của chúng.
- (4) Chế phẩm chuẩn hóa mạch chứa một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nhóm gồm hợp chất được biểu diễn bởi công thức (I), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (II), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (III) (Oleanoside A), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (IV) (Kaempferol) và muối của chúng.
- (5) Chế phẩm làm ổn định mạch chứa một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nhóm gồm hợp chất được biểu diễn bởi công thức (I), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (II), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (III) (Oleanoside A), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (IV) (Kaempferol) và muối của chúng.
- (6) Chế phẩm làm ổn định mạch bạch huyết chứa một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nhóm gồm hợp chất được biểu diễn bởi công thức (I), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (II), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (III) (Oleanoside A), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (IV) (Kaempferol) và muối của chúng.
- (7) Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ (2) đến (6), trong đó tác dụng gồm ức chế sự thấm mạch, làm trưởng thành mạch, chuẩn hóa mạch, làm ổn định mạch hoặc làm ổn định mạch bạch huyết là do tác dụng hoạt hóa Tie2.
- (8) Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (7), trong đó chế phẩm là thực phẩm.

(9) Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (7), trong đó chế phẩm là chế phẩm đồ uống.

(10) Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (9), trong đó chế phẩm được tạo ra có một hoặc nhiều chức năng được chọn từ nhóm gồm chức năng gây ra bởi việc hoạt hóa Tie2, chức năng gây ra bởi việc ức chế sự thấm mạch, chức năng gây ra bởi việc làm trưởng thành mạch, chức năng gây ra bởi việc chuẩn hóa mạch, chức năng gây ra bởi việc làm ổn định mạch, và chức năng gây ra bởi việc làm ổn định mạch bạch huyết.

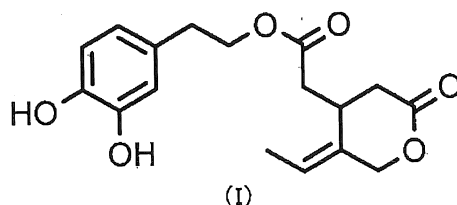
(11) Chế phẩm theo mục (10), trong đó chức năng yêu cầu là một hoặc nhiều chức năng được chọn từ nhóm gồm "ức chế sự thấm mạch tăng cường", "ức chế sự rò ngoại mạch của các yếu tố nội mạch", "cải thiện mạch máu về trạng thái bình thường", "duy trì mạch máu ở trạng thái bình thường", "duy trì các khớp nối tế bào-tế bào nội mô mạch với nhau", "ức chế sự chết tế bào nội mô mạch", và "giữ lại chức năng gom nhanh của dịch mô kẽ".

(12) Sử dụng một hoặc nhiều hợp chất được chọn từ nhóm gồm hợp chất được biểu diễn bởi công thức (I), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (II), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (III) (Oleanoside A), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (IV) (Kaempferol) và muối của chúng, để hoạt hóa Tie2.

(13) Phương pháp hoạt hóa Tie2, sử dụng một hoặc nhiều hợp chất được chọn từ nhóm gồm hợp chất được biểu diễn bởi công thức (I), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (II), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (III) (Oleanoside A), hợp chất được biểu diễn bởi công thức (IV) (Kaempferol) và muối của chúng làm thành phần hoạt tính.

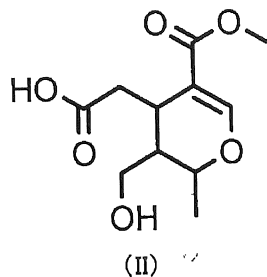
(14) Hợp chất được biểu diễn bởi công thức (I):

Công thức hóa học 5



(15) Hợp chất được biểu diễn bởi công thức (II):

Công thức hóa học 6



- (16) Chế phẩm chứa hợp chất theo mục (14) hoặc (15).
- (17) Chế phẩm chứa hợp chất theo mục (14) và (15).
- (18) Chế phẩm theo mục (16) hoặc (17), trong đó chế phẩm là chế phẩm thực phẩm.
- (19) Chế phẩm theo mục (16) hoặc (17), trong đó chế phẩm là chế phẩm đồ uống.

Hiệu quả của sáng chế

Chế phẩm theo sáng chế, chứa một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nhóm gồm các hợp chất iridoit mới (Hợp chất A và Hợp chất B), Oleanoside A, Kaempferol và muối của chúng làm thành phần hoạt tính, có thể gây ra tác dụng hoạt hóa Tie2, tác dụng ức chế sự thấm mạch, tác dụng làm trưởng thành mạch, tác dụng chuẩn hóa mạch, tác dụng làm ổn định mạch, và tác dụng làm ổn định mạch bạch huyết. Ngoài ra, do các kết nối kẹp chặt của các tế bào nội mô mạch với nhau bởi tác dụng chuẩn hóa mạch hoặc tác dụng tương tự theo sáng chế, dinh dưỡng sẽ đi khắp toàn bộ da thông qua mạch máu sao cho có thể thu được hiệu quả thẩm mỹ như cải thiện độ săn chắc và kết cấu của da và ngăn các vết nhăn. Ngoài ra, vì các khe hở của tế bào nội mô mạch máu hoặc mạch bạch huyết được đóng kín, dòng máu được cải thiện, và nước và sản phẩm thải ra từ mô được gom lại sao cho cũng có thể thu được tác dụng cải thiện và ngăn ngừa nhiều triệu chứng khác nhau như cảm lạnh, cứng cổ, phù, và quần thâm bên dưới mắt.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện cấu trúc hóa học của các hợp chất iridoit mới (Hợp chất A và Hợp chất B), Oleanoside A, và Kaempferol.

Fig.2 thể hiện lưu đồ tinh chế đối với chất chiết quả ôliu.

Fig.3 thể hiện các tín hiệu ^1H -NMR và ^{13}C -NMR của hợp chất iridoit mới (Hợp chất A) và megaritolactonol.

Fig.4 thể hiện kết quả của phân tích NMR hai chiều của hợp chất iridoit (Hợp chất A). Cụ thể, Fig.4 thể hiện kết quả phân tích phổ tương quan dịch chuyển thu được bằng cách thực hiện phân tích NMR hai chiều tương quan dịch chuyển ^1H - ^1H (đo phổ tương quan ^1H - ^1H (COSY)) và phân tích NMR hai chiều tương quan dịch chuyển khoảng dài ^1H - ^{13}C (kết nối dị hạt nhân đa liên kết (HMBC) dò bằng ^1H).

Fig.5 thể hiện tín hiệu ^1H -NMR và ^{13}C -NMR của hợp chất iridoit mới (Hợp chất B) và Oleanoside A.

Fig.6 thể hiện kết quả của phân tích NMR hai chiều của hợp chất iridoit mới (Hợp chất B). Cụ thể, Fig.6 thể hiện kết quả phân tích phổ tương quan dịch chuyển thu được bằng cách thực hiện phân tích NMR hai chiều tương quan dịch chuyển khoảng dài ^1H - ^{13}C (kết nối dị hạt nhân đa liên kết (HMBC) dò bằng ^1H).

Fig.7 thể hiện kết quả so sánh tác dụng hoạt hóa Tie2 của các hợp chất iridoit mới (Hợp chất A và Hợp chất B), Oleanoside A, Kaempferol, hydroxytyrosol và tyrosol với nhóm đối chứng (DMSO).

Fig.8 thể hiện kết quả đánh giá tác dụng ức chế của các hợp chất iridoit mới (Hợp chất A và Hợp chất B) đối với tính thấm mạch tăng cường gây ra bởi yếu tố tăng trưởng nội mô mạch (VEGF) mà là yếu tố thấm mạch.

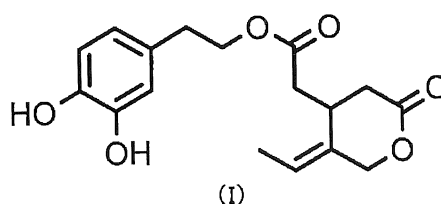
Mô tả chi tiết sáng chế

1. Chế phẩm

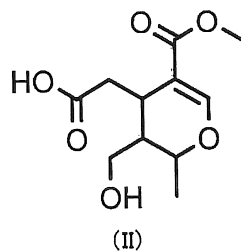
1-1. Chế phẩm

Một khía cạnh của sáng chế là chế phẩm chứa một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nhóm gồm Hợp chất A, Hợp chất B, Oleanoside A, Kaempferol và muối của chúng làm thành phần hoạt tính. Thành phần hoạt tính có trong chế phẩm theo sáng chế là hợp chất được biểu diễn bởi công thức (I) đến (IV):

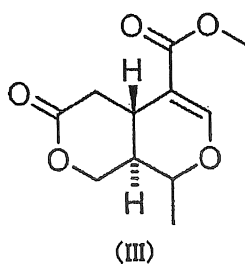
Công thức hóa học 7



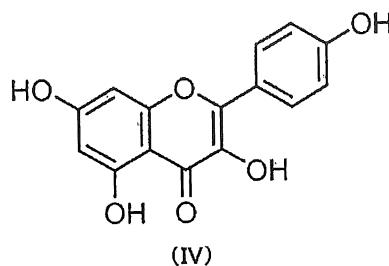
Công thức hóa học 8



Công thức hóa học 9



Công thức hóa học 10



Hợp chất được biểu diễn bởi công thức (I) và (II) là các hợp chất iridoit mới. Hợp chất được biểu diễn bởi công thức (I) có tên IUPAC là 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl(E)-2-(5-etyliden-2-oxotetrahydropyran-4-yl)axetat và trong bản mô tả còn được gọi là "Hợp chất A". Hợp chất được biểu diễn bởi công thức (II) có tên IUPAC là axit 2-(3,4-dihydro-3-hydroxymetyl-5-metoxycacbonyl-2-metyl-2H-pyran-4-yl)axetic và trong bản mô tả còn được gọi là "Hợp chất B". Hợp chất được biểu diễn bởi công thức (III) là Oleanoside A, và hợp chất được biểu diễn bởi công thức (IV) là Kaempferol.

Hợp chất theo sáng chế có thể ở dạng muối được dụng (gồm cả muối vô cơ và muối hữu cơ). "Muối" trong bản mô tả này đề cập đến muối được dụng bất kỳ (gồm cả muối vô cơ và muối hữu cơ). Ví dụ về muối bao gồm, nhưng không giới hạn ở, muối

natri, muối kali, muối canxi, muối magie, muối amoni, muối hydroclorua, sulfat, nitrat, phosphat, và muối axit hữu cơ (như axetat, xitrat, maleat, malat, oxalat, lactat, suxinat, fumarat, propionat, format, benzoat, picrat, benzensulfonat và trifloaxetat). Muối của hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực.

1-2. Tách và tổng hợp các thành phần hoạt tính có trong chế phẩm theo sáng chế

Các thành phần hoạt tính (Hợp chất A, Hợp chất B, Oleanoside A, Kaempferol, và/hoặc muối của chúng) có trong chế phẩm theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách chiết và tách từ các sản phẩm tự nhiên hoặc bằng phương pháp tổng hợp hóa học, mặc dù không bị giới hạn ở các phương pháp này. Khi thành phần hoạt tính có trong chế phẩm theo sáng chế được tạo ra từ các sản phẩm tự nhiên, sản phẩm tự nhiên được sử dụng làm nguyên liệu thô không bị giới hạn cụ thể, nhưng ví dụ, ôliu được ưu tiên sử dụng. Ôliu là cây thuộc họ Oleaceae. Dùng làm nguyên liệu thô chính, quả của cây ôliu được sử dụng, nhưng hỗn hợp của quả với lá, hạt, thân hoặc phần tương tự cũng được sử dụng. Khi quả ôliu được sử dụng làm nguyên liệu thô, nó có thể được dùng ở dạng chưa xử lý hoặc có thể được dùng sau khi làm khô bằng cách làm đông khô hoặc tương tự. Phần còn lại sau khi ép dầu từ quả ôliu cũng có thể được sử dụng làm nguyên liệu thô ở nguyên dạng hoặc ở trạng thái được sấy khô. Ưu tiên sử dụng chỉ nước ép ôliu mà là lớp nước thu được bằng cách tách pha lỏng từ quả ôliu thành lớp nước và lớp dầu làm nguyên liệu thô.

Loại ôliu không bị giới hạn cụ thể, nhưng ví dụ thích hợp về loại này bao gồm Manzanillo, Lucca, Nebadiro Blanco, Mission, Picual, Arubekina, Hojiblanca, Korunikabura, Gorudaru, Moroioro, Frantoio, Kola Tina, và Retchino.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "nước ép ôliu" chỉ chất chiết thu được từ lớp nước được tạo ra bằng cách tách pha lỏng thu được từ chất chiết quả ôliu thành lớp nước và lớp dầu. Chất chiết quả ôliu có thể được chiết từ quả ôliu bằng cách sử dụng, ví dụ, dung môi chứa nước. Ví dụ về dung môi chứa nước bao gồm nước và rượu (ví dụ, etanol). Dùng làm chất chiết quả ôliu, nước ép ôliu hoặc chất chiết bằng dung môi chứa nước có thể được sử dụng ở nguyên dạng, hoặc có thể sử dụng chất chiết thu được bằng cách lọc chúng và cô đặc polyphenol bằng cột hấp phụ sau đó sấy phun. Chất chiết quả ôliu có thể thu được thông qua các bước tách và tinh chế quả ôliu. Ở bước tách quả ôliu,

quả ôliu làm nguyên liệu thô được ép, và tách thành dầu và nước ép quả bằng cách ly tâm để thu được nước ép quả ôliu. Việc ép và ly tâm có thể được tiến hành sử dụng các phương pháp đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ở bước tinh chế, nước ép quả ôliu thu được trong bước tách có thể được lọc và cô để thu được chất chiết, mà có thể được sử dụng làm chất chiết quả ôliu theo sáng chế. Tương tự, sản phẩm lọc thu được bằng cách lọc nước ép ôliu có thể được nạp vào cột đã nhồi đầy nhựa hấp phụ, loại bỏ thành phần không hấp phụ lên nhựa hấp phụ như sacarit, khoáng chất và axit hữu cơ, và sau đó giải hấp bằng dung môi chứa nước (ví dụ, nước, etanol hoặc hỗn hợp của chúng) để thu được chất giải hấp. Chất giải hấp thu được cũng có thể được sử dụng làm chất chiết quả ôliu theo sáng chế. Loại nhựa hấp phụ và dung môi giải hấp được sử dụng trong cột có thể được thiết lập thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này tùy vào loại và dạng quả ôliu được sử dụng, hoặc tương tự.

Việc chiết thành phần hoạt tính có trong chế phẩm theo sáng chế thu được từ nguyên liệu thô có nguồn gốc từ sản phẩm tự nhiên có thể được tiến hành, mặc dù không bị giới hạn ở đó, bằng cách sử dụng dung môi. Dung môi bất kỳ có thể được sử dụng để chiết miễn là thành phần hoạt tính có trong chế phẩm theo sáng chế có thể được chiết, và ví dụ về dung môi bao gồm nước, dung dịch chứa nước như dung dịch đệm, dung môi hữu cơ và tổ hợp của các dung môi này. Ví dụ về dung môi hữu cơ bao gồm các dung môi thường được sử dụng như rượu và keton. Ví dụ về rượu bao gồm rượu thấp (như metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, và isobutanol) và rượu đa chức lỏng (như rượu 1,3-butylen, propylen glycol, và glyxerin). Ưu tiên sử dụng rượu thấp chứa nước hoặc rượu thấp. Ví dụ về keton bao gồm axeton và butanon. Lượng dung môi sử dụng có thể được thiết lập thích hợp, tùy vào lượng nguyên liệu thô cần được xử lý hoặc hàm lượng của hợp chất mục tiêu trong nguyên liệu thô hoặc tương tự, và, có thể ví dụ, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1000 mL, tốt hơn là từ 2,0 đến 500 mL, tốt hơn nữa là từ 5,0 đến 100 mL với mỗi g nguyên liệu thô.

Thành phần hoạt tính có trong chế phẩm theo sáng chế có thể được tinh chế thêm để tăng độ tinh khiết, nếu cần, sau khi chiết từ nguyên liệu thô. Việc tinh chế có thể được thực hiện theo phương pháp bất kỳ, ví dụ, có thể được thực hiện bằng sắc ký. Ví dụ về sắc ký bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sắc ký trao đổi ion, sắc ký kỵ nước, sắc ký ưa nước, và sắc ký lọc gel. Độ tinh khiết của chế phẩm có thể được xác nhận bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao hoặc LC-MS trong đó sắc ký lỏng hiệu năng cao và khối

phổ kế được kết hợp, nhưng phương pháp xác nhận độ tinh khiết không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, cấu trúc hóa học của các thành phần hoạt tính có trong chế phẩm theo sáng chế có thể được phân tích bằng cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), khối phổ, và phương pháp tương tự. Cần lưu ý rằng chế phẩm theo sáng chế không bao gồm bản thân các động vật và thực vật có trong tự nhiên và chưa hề qua xử lý.

Khi thành phần hoạt tính có trong chế phẩm theo sáng chế được tổng hợp hóa học, hợp chất theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng hợp chất có sẵn làm nguyên liệu thô khởi đầu và lựa chọn thích hợp các kỹ thuật hóa hữu cơ đã biết thông thường.

1-3. Chế phẩm hoạt hóa Tie2 hoặc chế phẩm tương tự

Một khía cạnh của sáng chế là chế phẩm hoạt hóa Tie2 chứa một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nhóm gồm Hợp chất A, Hợp chất B, Oleanoside A, Kaempferol và muối của chúng làm thành phần hoạt tính.

"Chế phẩm hoạt hóa Tie2" theo sáng chế chỉ chế phẩm có khả năng chuyển hóa Tie2 thành dạng hoạt tính (Tie2 được phosphoryl hóa) bằng quá trình phosphoryl hóa. Trong việc ổn định cấu trúc mao quản, sự hoạt hóa thụ thể được gọi là Tie2 có trong tế bào nội mô mạch đóng vai trò quan trọng. Tie2 cũng được báo cáo là có mặt trong tế bào nội mô mạch bạch huyết cũng như tế bào nội mô mạch. Tie2 được hoạt hóa bởi angiopoietin-1 được giải phóng từ các tế bào để tăng cường sự kết dính giữa các tế bào nội mô hoặc giữa tế bào nội mô với tế bào thành mạch, do đó Tie2 có liên quan đến việc làm ổn định cấu trúc mạch. Được báo cáo rằng hoạt tính Tie2 giảm, ví dụ, theo tuổi tác, và do đó được chỉ ra rằng máu và mạch bạch huyết cũng trở nên già đi. Chế phẩm hoạt hóa Tie2 theo sáng chế, do tác dụng hoạt hóa Tie2, có thể ngăn sự già hóa máu và mạch bạch huyết và cải thiện mạch.

Khi cấu trúc mạch trở nên không ổn định do sự già hóa mạch máu, các dưỡng chất như thành phần huyết tương rỉ ra từ mạch máu, và các thành phần cần thiết bị ngăn không được đưa đến các vị trí cần đến. Kết quả là, có thể hiểu rằng các vấn đề như sự xuống cấp tình trạng da có thể xảy ra. Chế phẩm hoạt hóa Tie2 theo sáng chế, do tác dụng hoạt hóa Tie2, có thể làm ổn định tế bào nội mô mạch và tạo ra tác dụng ức chế sự thấm mạch. Bằng các kết nối kẹp chặt của các tế bào nội mô mạch, dinh dưỡng lan ra khắp da sao cho có thể thu được các tác dụng thẩm mỹ như cải thiện độ săn chắc và kết

cấu của da và ngăn các nếp nhăn. Ngoài ra, vì các khe hở giữa các tế bào nội mô của máu và mạch bạch huyết được đóng kín, dòng máu được cải thiện, và nước và các sản phẩm thải ra từ mô được gom để cũng có thể thu được tác dụng cải thiện và ngăn ngừa nhiều triệu chứng khác nhau như cảm lạnh, cứng cổ, phù, và quầng thâm dưới mắt. Do đó, sáng chế có thể là chế phẩm hoạt hóa Tie2 chứa một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nhóm gồm Hợp chất A, Hợp chất B, Oleanoside A, Kaempferol và muối của chúng làm thành phần hoạt tính, trong đó chế phẩm có tác dụng ức chế sự thấm mạch, làm trưởng thành mạch, chuẩn hóa mạch, làm ổn định mạch, hoặc làm ổn định mạch bạch huyết.

Phương án khác của sáng chế bao gồm chế phẩm ức chế sự thấm mạch, chế phẩm làm trưởng thành mạch, chế phẩm chuẩn hóa mạch, chế phẩm làm ổn định mạch, chế phẩm làm ổn định mạch bạch huyết, và chế phẩm tương tự. Tốt hơn nếu chế phẩm chứa một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nhóm gồm Hợp chất A, Hợp chất B, Oleanoside A, Kaempferol và muối của chúng làm thành phần hoạt tính.

Theo sáng chế, "ức chế sự thấm mạch" nghĩa là ức chế sự tăng cường tính thấm mạch gây ra bởi VEGF (yếu tố tăng trưởng nội mô mạch) hoặc tương tự. "Làm trưởng thành mạch" nghĩa là tạo ra sự kết dính giữa tế bào nội mô mạch và tế bào thành mạch để tạo thành các kết dính trọng tâm giữa các tế bào nội mô mạch để không dễ dàng gây ra sự rò ngoại mạch của các yếu tố môi trường trong mạch. "Chuẩn hóa mạch" nghĩa là tăng cường sự kết dính các tế bào nội mô với nhau và thúc đẩy sự sắp thành hàng của tế bào thành mạch với tế bào nội mô mạch, nhờ đó mang mạch máu ở trạng thái bất thường như sự mất hoàn toàn tính thấm mạch hoặc sự tăng sinh không kiểm soát được về trạng thái bình thường. "Làm ổn định mạch" nghĩa là tác dụng ức chế các thương tổn đối với các mạch đang có, tách biệt các tế bào nội mô mạch và tách các tế bào nội mô mạch và tế bào thành mạch, và ức chế sự chết tế bào của tế bào nội mô mạch. "Làm ổn định mạch bạch huyết" nghĩa là làm ổn định mạch bạch huyết sao cho tế bào nội mô mạch bạch huyết được định vị và sắp thành hàng một cách thích hợp, và giữ lại chức năng gom nhanh dịch mô kẽ.

1-4. Hàm lượng của các thành phần hoạt tính trong chế phẩm

Hàm lượng của Hợp chất A, Hợp chất B, Oleanoside A, Kaempferol và muối của chúng trong chế phẩm theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là chúng ở các

lượng sao cho có thể thu được hiệu quả mong muốn của sáng chế, xem xét đến dạng liều lượng, phương pháp sử dụng, hoặc tương tự. Ví dụ, khi Hợp chất A được sử dụng làm thành phần hoạt tính, hàm lượng Hợp chất A trong chế phẩm theo sáng chế nằm trong khoảng từ 0,01 đến 99% khối lượng, tốt hơn là từ 0,1 đến 50% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 1 đến 30% khối lượng, còn tốt hơn nữa là từ 10 đến 30% khối lượng tính theo tổng khối lượng của chế phẩm. Khi Hợp chất B được sử dụng làm thành phần hoạt tính, hàm lượng Hợp chất B trong chế phẩm theo sáng chế nằm trong khoảng từ 0,01 đến 99% khối lượng, tốt hơn là từ 0,1 đến 50% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 1 đến 30% khối lượng, còn tốt hơn nữa là từ 10 đến 30% khối lượng tính theo tổng khối lượng của chế phẩm. Khi Oleanoside A được sử dụng làm thành phần hoạt tính, hàm lượng Oleanoside A trong chế phẩm theo sáng chế nằm trong khoảng từ 0,01 đến 99% khối lượng, tốt hơn là từ 0,1 đến 50% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 1 đến 30% khối lượng, còn tốt hơn nữa là từ 10 đến 30% khối lượng tính theo tổng khối lượng của chế phẩm. Khi Kaempferol được sử dụng làm thành phần hoạt tính, hàm lượng Kaempferol trong chế phẩm theo sáng chế nằm trong khoảng từ 0,001 đến 99% khối lượng, tốt hơn là từ 0,01 đến 50% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 0,1 đến 30% khối lượng, còn tốt hơn nữa là từ 1 đến 30% khối lượng tính theo tổng khối lượng của chế phẩm. Trừ khi được quy định khác, "%" khối lượng" như được sử dụng trong bản mô tả nghĩa là % khối lượng/khối lượng (w/w). Khi nhiều thành phần hoạt tính khác nhau có mặt ở dạng muối, hydrat hoặc dạng tương tự, hàm lượng của các thành phần hoạt tính này cần được tính sau khi chuyển hóa thành từng dạng tự do.

Hàm lượng của Hợp chất A, Hợp chất B, Oleanoside A, Kaempferol và muối của chúng có thể được xác định theo phương pháp đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, hàm lượng của chúng có thể được xác định bằng cách sử dụng LC-MS/MS, HPLC hoặc tương tự, và thiết lập các điều kiện thích hợp tùy vào loại thành phần hoạt tính hoặc tương tự.

1-5. Thành phần khác

Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa, tùy vào dạng, chất phụ gia hoặc thành phần bất kỳ ngoài thành phần hoạt tính. Ví dụ về chất phụ gia và/hoặc thành phần này bao gồm, nhưng không giới hạn cụ thể ở, tá dược, chất gắn kết, chất gây rã, chất gây trơn, chất chống oxy hóa, chất bảo quản, chất che vị, chất che mùi, chất tạo màu, và hương liệu. Ví dụ, axit L-ascorbic, catechin, dextrin, cyclodextrin, canxi cacbonat và

trehaloza có thể được sử dụng. Ngoài ra, chế phẩm có thể chứa thành phần đã biết, như thành phần đã biết là có hiệu quả để ngăn ngừa sự già hóa mạch máu hoặc có hiệu quả cho mục đích thẩm mỹ. Ví dụ về các thành phần này bao gồm thành phần mà tác dụng hoạt hóa Tie2 của nó đã được báo cáo, như chất chiết từ *Quillaja*, *Engelhardtia chrysolepis*, cây bạch quả, con hào, cây nghệ, cây hoa cúc, cây táo ta, cây kỳ tử (wolfberry), hoa cúc (chamomile), *Butcher bloom*, táo gai (hawthorn), khế, *Alpinia zerumbet*, sen, rooibos, chà là Ấn Độ (Indian dates), *Pseudocydonia*, ôi *Psidium*, tiêu lốt, nhân sâm Siberi, gừng xoài (mango ginger), gừng, *Elaeagnus umbellata*, cỏ muối (saltwort), *kalopanax*, cây tiêu bụi (pepperbush), *Tawny daylily*, *Colocasia gigantea*, *staphylea pinnata*, *clerodendrum trichotomum*, Japanese staunton-vine, pepper saw, *Quercus serrata*, *Quercus acutissima*, *Lactuca sativa*, vú sữa (star apple), mã đề (plantain), tỏi rocambole đại, cây thanh mai (bayberry), cây quế, *Gleditsia japonica*, *Polygonatum sibiricum*, *Polygonatum officinale*, *Trichosanthis semen*, *Morinda officinalis*; các thành phần chứa proxyanidin có hiệu quả cải thiện nội mô mạch, như chất chiết từ hạt nho, thông đỏ, vỏ hạt lạc, vỏ hạt vải và thành phần tương tự; và các axit amin như L-xitrullin và L-arginin.

1-6. Sử dụng

Chế phẩm theo sáng chế có thể có các tác dụng sinh lý khác nhau như được mô tả ở trên. Ví dụ, bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế, các tác dụng khác nhau như tác dụng ức chế sự thâm mạch, tác dụng làm trưởng thành mạch, tác dụng chuẩn hóa mạch, tác dụng làm ổn định mạch, tác dụng làm ổn định mạch bạch huyết, và tác dụng hoạt hóa Tie2 có thể được tạo ra, và nhờ đó các tác dụng về thẩm mỹ như cải thiện độ săn chắc và kết cấu da và ngăn ngừa các nếp nhăn, và các tác dụng cải thiện và ngăn ngừa nhiều triệu chứng khác nhau như cảm lạnh, cứng cổ, phù, và quầng thâm bên dưới mắt cũng có thể thu được.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được áp dụng cho cả sử dụng trong điều trị bệnh (sử dụng trong y tế) và sử dụng không phải để điều trị bệnh (sử dụng không phải trong y tế). Ví dụ về loại chế phẩm này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dược chất (dược phẩm), thực phẩm và đồ uống (gồm cả thực phẩm, đồ uống, chế phẩm thực phẩm và đồ uống, chế phẩm thực phẩm, và chế phẩm đồ uống), và mỹ phẩm (chế phẩm mỹ phẩm).

Chế phẩm theo sáng chế có thể được tạo ra theo phương pháp đã biết ở dạng

liều dùng được bào chế theo công thức như chế phẩm rắn như viên nén (gồm cả viên nén được bọc), hạt, thuốc bột, bột, hoặc viên nang, và chế phẩm lỏng như chế phẩm lỏng dùng qua đường miệng, huyền phù, nhũ tương, siro, hoặc đồ uống. Các dạng liều này có thể được uống nguyên trạng hoặc cùng với nước hoặc tương tự. Theo cách khác, chế phẩm theo sáng chế, sau khi thu được ở dạng mà có thể dễ dàng kết hợp (ví dụ, ở dạng bột hoặc dạng hạt), có thể được sử dụng làm nguyên liệu thô, ví dụ, đối với dược phẩm và thực phẩm và đồ uống. Tuy nhiên, dạng chế phẩm của sáng chế không bị giới hạn ở đó. Dạng liều của chế phẩm theo sáng chế đối với mỹ phẩm (chế phẩm mỹ phẩm) cũng có thể được chọn tùy ý tùy theo mục đích. Ví dụ, chế phẩm có thể được sử dụng ở dạng liều như kem, thuốc mỡ, nhũ tương, dung dịch, gel, bột và hạt; và ở các dạng như gói, thuốc xức ngoài da, bột và thổi. Dạng chế phẩm của nó cũng có thể được chọn từ nhiều dạng khác nhau như dạng gốc chứa nước, gốc tan, gốc nhũ hóa, gốc bột, gốc dầu-lỏng, gốc gel, gốc thuốc mỡ, gốc sol khí, gốc hai lớp nước-dầu, và gốc ba lớp nước-dầu-bột. Nói cách khác, trong trường hợp sử dụng mỹ phẩm cơ bản, chế phẩm có sẵn rộng rãi ở dạng như nước rửa mặt, mỹ phẩm cho da dạng nước, mỹ phẩm dạng nước, sữa dưỡng, kem, gel, tinh dầu (chất lỏng làm đẹp), túi, mặt nạ, chất mát-xa, kem nền, thổi son, chất để tắm, dầu gội, dầu xả, dưỡng tóc, thuốc mỡ, bột nhào và sản phẩm dạng tấm (vật thấm hút như sản phẩm vệ sinh, làm sạch và khăn tẩy trang và tương tự). Tuy nhiên, chế phẩm và dạng theo sáng chế không bị giới hạn. Ngoài ra, trong các chế phẩm này, các loại dầu, chất hoạt động bề mặt, chất tạo gel, chất bảo quản, chất chống oxy hóa, dung môi, rượu, nước, chất chelat hóa, chất làm đặc, chất hấp thụ UV, chất làm ổn định nhũ tương, chất biến đổi pH, thuốc màu, hương liệu, và chất tương tự có thể được kết hợp một cách thích hợp.

Ví dụ cụ thể về đồ uống theo sáng chế bao gồm đồ uống từ trà ô long, đồ uống từ trà đen, đồ uống từ trà xanh, nước trái cây ép, nước rau ép, đồ uống dùng trong thể thao, đồ uống đẳng trương, thức uống bổ sung, nước khoáng, nước uống bổ sung, thức uống dinh dưỡng, thức uống làm đẹp, hoặc nhiều đồ uống có cồn khác nhau.

Đồ uống theo sáng chế được xử lý thành đồ uống đóng gói tiệt trùng nhờ các quy trình như quy trình tiệt trùng khi cần. Ví dụ, đồ uống đóng gói tiệt trùng có thể được tạo ra bằng phương pháp gồm bước rót đồ uống vào vật chứa và sau đó đưa đồ uống đã rót qua quy trình tiệt trùng bằng nhiệt hoặc tương tự hoặc phương pháp gồm bước tiệt trùng đồ uống và rót đồ uống đã tiệt trùng vào vật chứa trong môi trường vô trùng.

Loại vật chứa sử dụng cho đồ uống đóng gói không bị giới hạn cụ thể, và ví dụ về vật chứa bao gồm vật chứa bằng nhựa như chai PET, vật chứa bằng giấy như túi giấy, vật chứa bằng thủy tinh như chai thủy tinh, vật chứa bằng kim loại như hộp nhôm và hộp thép, túi nhôm, và vật chứa khác bất kỳ thường dùng cho đồ uống.

Thực phẩm và đồ uống theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và ví dụ về thực phẩm và đồ uống bao gồm thực phẩm sức khỏe, thực phẩm chức năng (gồm cả thực phẩm để sử dụng cho sức khỏe theo chỉ định, thực phẩm có điều kiện để sử dụng cho sức khỏe theo chỉ định, thực phẩm có yêu cầu chức năng dinh dưỡng, và thực phẩm có yêu cầu chức năng), thực phẩm dùng cho chế độ ăn kiêng đặc biệt, và thực phẩm bổ sung dùng cho sức khỏe. Hàm lượng thành phần hoạt tính trong thực phẩm và đồ uống theo sáng chế như được mô tả ở trên đối với chế phẩm.

Thực phẩm và đồ uống theo sáng chế có thể thu được, ví dụ, bằng cách trộn lượng định trước của thành phần hoạt tính vào nguyên liệu thô của thực phẩm và đồ uống đã biết, và tạo ra thực phẩm và đồ uống theo phương pháp sản xuất thực phẩm và đồ uống đã biết. Theo cách khác, thực phẩm và đồ uống theo sáng chế có thể thu được bằng cách bổ sung thành phần hoạt tính vào thực phẩm và đồ uống đã biết thu được sao cho lượng thành phần hoạt tính trở thành lượng định trước. Thực phẩm và đồ uống đã biết có thể chứa thành phần hoạt tính ngay từ đầu. Trong trường hợp đó, thành phần hoạt tính được kết hợp một cách thích hợp để điều chế sao cho lượng thành phần hoạt tính trở thành lượng định trước.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng bằng phương pháp thích hợp tùy vào dạng. Phương pháp sử dụng không bị giới hạn cụ thể miễn là thành phần hoạt tính theo sáng chế có thể được chuyển vào máu tuần hoàn. Ví dụ, chế phẩm theo sáng chế có thể ở dạng chế phẩm rắn dùng qua đường miệng; chế phẩm lỏng dùng qua đường miệng như chất lỏng bên trong và siro; hoặc chế phẩm ngoài đường tiêu hóa như chế phẩm tiêm, chế phẩm bên ngoài, thuốc đạn và chất thấm hút qua da, mặc dù dạng của chế phẩm theo sáng chế không giới hạn ở đó. Như được sử dụng trong bản mô tả, "sử dụng" chỉ tất cả các phương án của việc sử dụng, gồm cả tiêu hóa, nạp vào, uống, và hấp thụ dưới da. Lượng sử dụng chế phẩm theo sáng chế không bị cố định và được thiết lập thích hợp tùy vào dạng, phương pháp sử dụng, mục đích sử dụng, và tuổi tác, cân nặng và triệu chứng của đối tượng sử dụng như người bệnh hoặc động vật mang bệnh.

Ngoài ra, lượng hiệu quả ở người của chế phẩm theo sáng chế không bị cố định và không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, trong trường hợp người có cân nặng 50kg, lượng hiệu quả ở người của chế phẩm theo sáng chế mỗi ngày nằm trong khoảng từ 0,1mg đến 400mg (từ 0,002mg/kg đến 8mg/kg), tốt hơn là từ 1mg đến 300mg (từ 0,02mg/kg đến 6mg/kg), tốt hơn nữa là từ 10mg đến 200mg (0,2mg/kg đến 4mg/kg). Việc sử dụng chế phẩm theo sáng chế có thể được thực hiện, trong phạm vi lượng hấp thụ mong muốn, một lần hoặc vài lần một ngày. Ngoài ra, thời gian sử dụng có thể được thiết lập. Như được sử dụng trong bản mô tả, lượng hiệu quả ở người theo sáng chế chỉ lượng hấp thụ chế phẩm theo sáng chế cho hiệu quả có lợi ở người, trong đó loại thành phần hoạt tính có trong chế phẩm không bị giới hạn cụ thể.

Đối tượng sử dụng chế phẩm theo sáng chế tốt hơn nếu là người, nhưng có thể là động vật nuôi như bò, ngựa, hoặc dê; động vật cảnh như chó, mèo, hoặc thỏ; hoặc động vật phòng thí nghiệm như chuột nhắt, chuột, chuột lang hoặc khỉ. Khi chế phẩm được sử dụng cho động vật không phải người, lượng sử dụng mỗi ngày đối với chuột nhắt (khoảng 20g) là, ví dụ, từ 0,002mg/kg đến 8mg/kg, tốt hơn là từ 0,02mg/kg đến 6mg/kg, tốt hơn nữa là từ 0,2mg/kg đến 4 mg/kg, trong khi lượng này thay đổi tùy vào hàm lượng thành phần hoạt tính trong chế phẩm và tình trạng như trạng thái, cân nặng, giới tính và tuổi tác của đối tượng sử dụng. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm với một hoặc nhiều chức năng được tạo ra bởi tác dụng ức chế sự thấm mạch, làm trưởng thành mạch, chuẩn hóa mạch, làm ổn định mạch, làm ổn định mạch bạch huyết, hoặc hoạt hóa Tie2. Ví dụ về yêu cầu hoặc yêu cầu chức năng bao gồm, nhưng không giới hạn cụ thể ở, "ức chế sự thấm mạch tăng cường", "ức chế sự rò ngoại mạch của các yếu tố nội mạch", "cải thiện mạch máu về trạng thái bình thường", "duy trì mạch máu ở trạng thái bình thường", "duy trì các kết nối tế bào-tế bào nội mô mạch với nhau", "ức chế sự chết tế bào nội mô mạch", và "giữ lại chức năng gom nhanh dịch mô kẽ", và yêu cầu khác bất kỳ có thể được xem là tương đương với các yêu cầu này. Trong bản mô tả này, yêu cầu như yêu cầu và yêu cầu chức năng nêu trên có thể được đề xuất với chính chế phẩm hoặc với vật chứa hoặc bao gói của chế phẩm.

2. Sử dụng để hoạt hóa Tie2

Một khía cạnh của sáng chế là sử dụng một hoặc nhiều hợp chất được chọn từ nhóm gồm Hợp chất A, Hợp chất B, Oleanoside A, Kaempferol và muối của chúng để

ức chế sự thấm mạch, làm trưởng thành mạch, chuẩn hóa mạch, làm ổn định mạch, làm ổn định mạch bạch huyết, hoặc hoạt hóa Tie2, tốt hơn nếu là hoạt hóa Tie2.

Việc sử dụng theo sáng chế dẫn đến sự hoạt hóa Tie2, sao cho cũng có thể thu được tác dụng ức chế sự thấm mạch, tác dụng làm trưởng thành mạch, tác dụng chuẩn hóa mạch, tác dụng làm ổn định mạch, tác dụng làm ổn định mạch bạch huyết và tác dụng tương tự. Việc sử dụng theo sáng chế là cho người hoặc động vật không phải người, và có thể dùng để điều trị bệnh hoặc không điều trị bệnh. Như được sử dụng trong bản mô tả, "không điều trị bệnh" là khái niệm không bao gồm hoạt động y tế, nghĩa là, điều trị trên cơ thể người bằng liệu pháp.

3. Phương pháp hoạt hóa Tie2

Một khía cạnh của sáng chế là phương pháp hoạt hóa Tie2 bằng cách sử dụng một hoặc nhiều hợp chất được chọn từ nhóm gồm Hợp chất A, Hợp chất B, Oleanoside A, Kaempferol và muối của chúng làm thành phần hoạt tính. Cụ thể, một khía cạnh của sáng chế là phương pháp hoạt hóa Tie2 bao gồm việc cho đối tượng cần sự hoạt hóa Tie2 sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của thành phần hoạt tính. Đối tượng cần sự hoạt hóa Tie2 là như được mô tả ở trên đối với chế phẩm.

Một khía cạnh của sáng chế là phương pháp ức chế sự thấm mạch, làm trưởng thành mạch, chuẩn hóa mạch, làm ổn định mạch hoặc làm ổn định mạch bạch huyết bằng cách sử dụng một hoặc nhiều hợp chất được chọn từ nhóm gồm Hợp chất A, Hợp chất B, Oleanoside A, Kaempferol và muối của chúng làm thành phần hoạt tính.

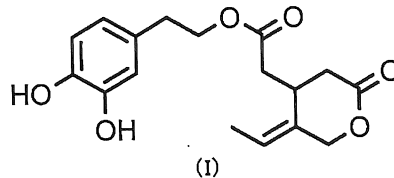
Như được sử dụng trong bản mô tả, "lượng có hiệu quả điều trị" nghĩa là lượng mà, khi một hoặc nhiều hợp chất được chọn từ nhóm gồm Hợp chất A, Hợp chất B, Oleanoside A, Kaempferol và muối của chúng được dùng cho đối tượng, sự hoạt hóa Tie2 có thể nhận được ở đối tượng này so với đối tượng không được sử dụng thành phần này. Lượng hiệu quả cụ thể không bị cố định và được điều chỉnh thích hợp tùy vào dạng liều, phương pháp sử dụng, mục đích sử dụng, và tuổi tác, cân nặng và triệu chứng của đối tượng.

Trong phương pháp theo sáng chế, thành phần hoạt tính được sử dụng ở nguyên dạng hoặc ở dạng chế phẩm sao cho lượng thành phần hoạt tính là lượng có hiệu quả điều trị.

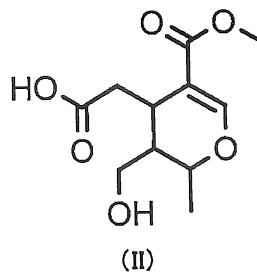
4. Hợp chất iridoit mới

Một khía cạnh của sáng chế là hợp chất iridoit mới được biểu diễn bởi công thức (I) hoặc (II).

Công thức hóa học 11



Công thức hóa học 12



Hợp chất được biểu diễn bởi công thức (I) có tên IUPAC là 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl(E)-2-(5-ethyliden-2-oxotetrahydropyran-4-yl)axetat và trong bản mô tả này còn được gọi là "Hợp chất A". Hợp chất được biểu diễn bởi công thức (II) có tên IUPAC là axit 2-(3,4-dihydro-3-hydroxymetyl-5-metoxycacbonyl-2-metyl-2H-pyran-4-yl)axetic và trong bản mô tả này còn được gọi là "Hợp chất B".

Hợp chất theo sáng chế có thể ở dạng muối được dụng (gồm cả muối vô cơ và muối hữu cơ). Như được sử dụng trong bản mô tả, "muối" chỉ muối được dụng bất kỳ (gồm cả muối vô cơ và muối hữu cơ) như được mô tả ở trên, và không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ về muối bao gồm, muối natri, muối kali, muối canxi, muối magie, muối amoni, hydroclorua, sulfat, nitrat, phosphat, và muối axit hữu cơ (như axetat, xitrat, maleat, malat, oxalat, lactat, suxinat, fumarat, propionat, format, benzoat, picrat, benzensulfonat và trifloaxetat). Muối của hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực.

4-1. Phương pháp sản xuất hợp chất iridoit mới

Hợp chất iridoit mới (Hợp chất A, Hợp chất B) theo sáng chế có thể được tạo ra

bằng cách chiết và tách từ các sản phẩm tự nhiên hoặc bằng phương pháp tổng hợp hóa học, mặc dù không bị giới hạn cụ thể ở đó. Khi các hợp chất này được tạo ra từ các sản phẩm tự nhiên, sản phẩm tự nhiên được sử dụng làm nguyên liệu thô không bị giới hạn cụ thể, nhưng, cụ thể, tốt hơn là ôliu được sử dụng. Ôliu là cây thuộc họ Oleaceae. Dùng làm nguyên liệu thô chính, quả ôliu được sử dụng, nhưng hỗn hợp của quả với lá, hạt, thân hoặc phần tương tự cũng được sử dụng. Khi quả ôliu được sử dụng làm nguyên liệu thô, nó có thể được sử dụng ở dạng thô hoặc có thể được sử dụng sau khi sấy khô bằng cách sấy khô lạnh hoặc tương tự. Phần còn lại sau khi ép dầu từ quả ôliu cũng có thể được sử dụng làm nguyên liệu thô ở nguyên dạng hoặc ở trạng thái khô. Tốt hơn nếu sử dụng, làm nguyên liệu thô, một mình nước ép ôliu mà là lớp nước thu được bằng cách tách pha lỏng thu được từ quả ôliu thành lớp nước và lớp dầu. "Ôliu" và "nước ép ôliu" là như được nêu ở trên đối với chế phẩm.

Việc chiết hợp chất iridoit mới theo sáng chế từ nguyên liệu thô thu được từ sản phẩm tự nhiên (ví dụ, chất chiết quả ôliu) có thể được tiến hành, mặc dù không bị giới hạn ở đó, bằng cách sử dụng dung môi. Dung môi bất kỳ có thể được sử dụng để chiết miễn là thành phần hoạt tính có trong chế phẩm theo sáng chế có thể được chiết, và ví dụ về dung môi bao gồm nước, dung dịch nước như dung dịch đậm, dung môi hữu cơ và kết hợp các dung môi này. Ví dụ về dung môi hữu cơ bao gồm các dung môi thường được sử dụng như rượu và axeton. Ví dụ về rượu bao gồm rượu thấp (như metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, và isobutanol) và rượu đa chức lỏng (như rượu 1,3-butylen, propylen glycol, và glyxerin). Ưu tiên sử dụng rượu thấp chứa nước hoặc rượu thấp. Lượng dung môi sử dụng có thể được điều chỉnh thích hợp, tùy vào lượng nguyên liệu thô cần được xử lý hoặc hàm lượng hợp chất mục tiêu trong nguyên liệu thô hoặc tương tự, và, có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1000 mL, tốt hơn là từ 2,0 đến 500 mL, tốt hơn nữa là từ 5,0 đến 100 mL mỗi g nguyên liệu thô.

Hợp chất iridoit mới theo sáng chế có thể được tinh chế thêm để tăng độ tinh khiết, nếu cần, sau khi chiết từ nguyên liệu thô. Việc tinh chế có thể được thực hiện theo phương pháp bất kỳ, ví dụ, có thể được thực hiện bằng sắc ký. Ví dụ về sắc ký bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sắc ký trao đổi ion, sắc ký kỵ nước, sắc ký ưa nước, và sắc ký lọc gel. Độ tinh khiết của chế phẩm có thể được xác nhận bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao hoặc LC-MS trong đó sắc ký lỏng hiệu năng cao và khối phổ kế được kết hợp, mặc dù phương pháp xác nhận độ tinh khiết không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, cấu trúc hóa

học của hợp chất iridoit mới theo sáng chế có thể được phân tích bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), đo khối phổ, và phương pháp tương tự.

Khi hợp chất iridoit mới theo sáng chế được tổng hợp hóa học, hợp chất mong muốn có thể được tạo ra bằng cách sử dụng hợp chất sẵn có làm nguyên liệu thô khởi đầu và lựa chọn thích hợp các kỹ thuật hóa hữu cơ thường đã biết.

4-2. Chế phẩm

Một khía cạnh của sáng chế là chế phẩm chứa Hợp chất A và/hoặc Hợp chất B. Như được mô tả ở trên, Hợp chất A và Hợp chất B, mà là hợp chất iridoit mới theo sáng chế, có các tác dụng sinh lý khác nhau. Ví dụ, Hợp chất A và Hợp chất B có tác dụng hoạt hóa Tie2, tác dụng ức chế sự thấm mạch, tác dụng làm trưởng thành mạch, tác dụng chuẩn hóa mạch, tác dụng làm ổn định mạch, tác dụng làm ổn định mạch bạch huyết, và tác dụng tương tự. Do đó, theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế là chế phẩm có tác dụng hoạt hóa Tie2, tác dụng ức chế sự thấm mạch, tác dụng làm trưởng thành mạch, tác dụng chuẩn hóa mạch, tác dụng làm ổn định mạch, hoặc tác dụng làm ổn định mạch bạch huyết. Ngoài ra, các phương án về chế phẩm bao gồm, nhưng không giới hạn ở, được phẩm (chế phẩm được), thực phẩm và đồ uống (gồm cả thực phẩm, đồ uống, chế phẩm thực phẩm và đồ uống, chế phẩm thực phẩm, và chế phẩm đồ uống), và mỹ phẩm (chế phẩm mỹ phẩm).

Như được mô tả ở trên, Hợp chất A và/hoặc Hợp chất B có trong chế phẩm theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách chiết và tách từ sản phẩm tự nhiên hoặc bằng cách tổng hợp hóa học, mặc dù không bị giới hạn cụ thể ở đó. Khi thành phần hoạt tính có trong chế phẩm theo sáng chế được tạo ra từ các sản phẩm tự nhiên, sản phẩm tự nhiên được sử dụng làm nguyên liệu thô không bị giới hạn cụ thể, nhưng, ví dụ, tốt hơn nếu ôliu được sử dụng. Phương pháp tách và tổng hợp Hợp chất A và/hoặc Hợp chất B cũng như được mô tả ở trên. Cần lưu ý rằng chế phẩm theo sáng chế không bao gồm chính động vật và thực vật có trong tự nhiên và chưa hề qua xử lý và bản thân các chất chiết của chúng không có các thành phần khác được kết hợp vào.

Hàm lượng Hợp chất A và/hoặc Hợp chất B trong chế phẩm theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, nhưng, ví dụ, hàm lượng Hợp chất A trong chế phẩm theo sáng chế nằm trong khoảng từ 0,01 đến 99% khối lượng, tốt hơn là từ 0,1 đến 50% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 1 đến 30% khối lượng, còn tốt hơn nữa là từ 10 đến 30% khối lượng

tính theo tổng khối lượng của chế phẩm, và hàm lượng Hợp chất B trong chế phẩm theo sáng chế nằm trong khoảng từ 0,01 đến 99% khối lượng, tốt hơn là từ 0,1 đến 50% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 1 đến 30% khối lượng, còn tốt hơn nữa là từ 10 đến 30% khối lượng tính theo tổng khối lượng của chế phẩm. Các thành phần khác có thể được kết hợp vào chế phẩm theo sáng chế như được mô tả ở trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả cụ thể hơn dựa vào các ví dụ. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1: Xác định cấu trúc của Hợp chất A và Hợp chất B.

1-1. Điều chế chất chiết quả ôliu

Quả ôliu được ép và tách thành dầu và nước quả ép bằng cách ly tâm. Nước ép ôliu thu được được lọc và đưa đến cột kiểu hấp phụ để loại bỏ thành phần không được hấp phụ lên nhựa hấp phụ như sacarit, chất khoáng và axit hữu cơ, và sản phẩm giải hấp thu được bằng rượu chứa nước được cô và đem đi sấy phun để thu được chất chiết quả ôliu. Sau đó, chất chiết từ quả thu được (500g) được đưa qua bước sắc ký cột sử dụng Dia ion HP20 (lượng nhựa: 10L, dung môi giải hấp: etanol:nước (0:100 → 70:30)) để phân đoạn chất chiết quả ôliu. Mỗi phân đoạn thu được là như sau (Fr.1: 179g, Fr.2: 120g, Fr.3: 85g, Fr.4: 71g, Fr.5: 26g). Trong số các phân đoạn từ phân đoạn 1 đến phân đoạn 5, phân đoạn trong đó hoạt tính Tie2 được quan sát thấy, phân đoạn 4 (chất giải hấp etanol 50%, 20 g), được đưa qua bước sắc ký cột sử dụng Toyopearl HW-40C (lượng nhựa: 500mL, dung môi giải hấp; metanol:nước (10:90 → 70:30) → axeton:nước (70:30)) để phân đoạn Fr.4 thành 19 phân đoạn (Fr.4a đến Fr.4s). Trong số các Fr.4a đến Fr.4s, phân đoạn trong đó hoạt tính Tie2 được quan sát thấy, Fr.4k, được đưa qua bước HPLC điều chế ở điều kiện phân tích 1 dưới đây để phân đoạn tiếp thành sáu phân đoạn (Fr.4ka đến 4kf). Trong số các Fr.4ka đến Fr.4kf, các phân đoạn trong đó hoạt tính Tie2 cao nhất quan sát được, Fr.4kb và Fr.4kd, được tinh chế sử dụng HPLC điều chế ở các điều kiện phân tích 2 và 3 dưới đây để tách Hợp chất A (46,2mg), Hợp chất B (19,5mg) và Oleanoside A (98,1mg). Fr.4r, là phân đoạn khác trong đó hoạt tính Tie2 quan sát được cũng được đưa qua HPLC điều chế ở điều kiện phân tích 4 dưới đây để tách Kaempferol (3,7mg). Fig.2 thể hiện lưu đồ tinh chế chất chiết quả ôliu.

Điều kiện phân tích 1

Dò: 220nm

Tốc độ dòng: 15 mL/phút

Cột: Capcell Pack C18 TYPE AQ $\phi 3,0 \times 25,0$ cm (SHISEIDO)

Pha động: CH₃CN:H₂O (32:68)

Nhiệt độ cột: nhiệt độ trong phòng 25°C

Điều kiện phân tích 2

Dò: 220nm

Tốc độ dòng: 10 mL/phút

Cột: TSK-Gel Amide-80 $\phi 2,15 \times 30,0$ cm (TOSOH)

Pha động: CH₃CN:H₂O (0 phút, 100:0 → 15 phút, 100:0 → 20 phút, 80:20 → 35 phút, 80:20)

Nhiệt độ cột: nhiệt độ trong phòng 25°C

Điều kiện phân tích 3

Dò: 220nm

Tốc độ dòng: 10 mL/phút

Cột: COSMOSIL Cholester $\phi 2,0 \times 25,0$ cm (nacalai tesque)

Pha động: CH₃CN:H₂O (20:80)

Nhiệt độ cột: nhiệt độ trong phòng 25°C

Điều kiện phân tích 4

Dò: 280 nm

Tốc độ dòng: 15 mL/phút

Cột: Capcell Pack C18 TYPE AQ $\phi 3,0 \times 25,0$ cm (SHISEIDO)

Pha động: CH₃CN:H₂O (27:73)

Nhiệt độ cột: nhiệt độ trong phòng 25°C

1-2. Phân tích cấu trúc của Hợp chất A

Hợp chất A thu được dưới dạng chất dầu không màu, và từ kết quả của phương pháp ion hóa phun điện độ phân giải cao-khối phổ (HRESI-MS), được cho thấy rằng Hợp chất A có công thức phân tử là $C_{17}H_{20}O_6$. Ngoài ra, từ mẫu phổ UV ($\lambda_{\max}$ 282) của hợp chất, được cho là hợp chất có vòng benzen trong phân tử. Sau đó, từ tập hợp các tín hiệu mẫu ABX [δ_H : 6,62 (1H, dd, $J=2,0, 8,0$ Hz), 6,74 (1H, d, $J=2,0$ Hz), 6,82 (1H, d, $J=8,0$ Hz)] được quan sát trong cộng hưởng từ hạt nhân 1H (1H -NMR) và 8 mẫu pic (δ_c : 34,6, 66,0, 115,5, 116,4, 121,3, 130,7, 143,5, 143,6) được quan sát trong ^{13}C -NMR, được gợi ý rằng hợp chất có hydroxytyrosol. Ngoài ra, trong 1H -NMR, quan sát được một tín hiệu từ metyl, ba tín hiệu từ metylen, một tín hiệu từ methin, và một proton olefin. Trong ^{13}C -NMR, quan sát được, đối với các đơn vị khác ngoài hydroxytyrosol, một tín hiệu từ metyl, ba tín hiệu từ metylen, hai tín hiệu từ methin, và ba tín hiệu từ cacbon bậc bốn. Sau đó, nhằm mục đích làm rõ các dạng liên kết này, các phép đo phổ tương quan 1H - 1H (1H - 1H COSY), liên kết đa lượng từ dò bằng 1H (HMQC), và kết nối đa liên kết dò bằng 1H (HMBC) được thực hiện. Với phân tích chi tiết của các phép đo, được cho biết là cấu trúc của đơn vị này thuộc về hợp chất đặc trưng bởi iridoit. Dựa vào phân tích chi tiết của các dữ liệu phổ tập trung vào NMR hai chiều, tham khảo các trường hợp tách iridoit từ ôliu đã được báo cáo, biết được rằng cấu trúc của đơn vị iridoit trong đó cấu trúc này được tìm thấy như được mô tả ở trên là cấu trúc trong đó nhóm hydroxyl ở vị trí 3 của megaritolactonol được chuyển thành nhóm carboxyl.

Trong phân tích HMBC sau đó để nghiên cứu dạng liên kết của mỗi đơn vị, được xác nhận mối tương quan của proton ở vị trí 8' của đơn vị hydroxytyrosol với cacbon carbonyl ở vị trí 3 của megaritolactonol. Theo kết quả này, biết chỉ ra rằng các đơn vị này được nối bằng liên kết este giữa vị trí 8' của hydroxytyrosol và vị trí 3 của megaritolactonol. Từ các dữ liệu phổ này, cấu trúc của Hợp chất A được xác định. Các tín hiệu 1H -NMR và ^{13}C -NMR của Hợp chất A và megaritolactonol được thể hiện trên Fig.3. Ngoài ra, kết quả của phép phân tích NMR hai chiều của Hợp chất A (phân tích phổ tương quan 1H - 1H (COSY) và phân tích kết nối đa liên kết dị hạt nhân dò bằng 1H (HMBC)) được thể hiện trên Fig.4.

1-3. Phân tích cấu trúc của Hợp chất B

Hợp chất B thu được dưới dạng chất dầu không màu. Trong 1H -NMR, quan sát được một tín hiệu từ nhóm metyl, hai tập hợp tín hiệu từ nhóm metylen, ba tín hiệu từ

nhóm methin, một tín hiệu từ nhóm metoxy, và một tín hiệu từ olefin. Trong ^{13}C -NMR, tổng cộng tín hiệu 11 cacbon của hai tín hiệu từ nhóm methyl (δ_c : 19,4, 51,5), hai tín hiệu từ nhóm metylen (δ_c : 38,2, 62,3), bốn tín hiệu từ nhóm methin (δ_c : 29,6, 45,0, 74,1, 156,2), và ba tín hiệu từ cacbon bậc bốn (δ_c : 108,5, 169,3, 174,3) được quan sát thấy. Từ kết quả của ^1H -NMR và ^{13}C -NMR mô tả ở trên, và vì không thể quan sát được sự hấp thụ UV, hợp chất này được gọi ý là iridoit. Sau đó, để xác nhận các dạng liên kết này, NMR hai chiều (^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC) được phân tích để làm rõ cấu trúc của hợp chất. Cấu trúc thể hiện bởi phân tích trên là cấu trúc tương tự với các Oleanoside đã được báo cáo là một trong số các thành phần của quả ôliu. Bằng cách so sánh dữ liệu phổ của chúng, được xác nhận rằng có mối tương quan tốt giữa chúng ngoại trừ các tín hiệu của các vị trí 6, 7, và 8. Ngoài các kết quả này, dựa vào kết quả đối với hợp chất này mà tương quan HMBC từ metylen ở vị trí 8 với carbonyl cacbon ở vị trí 7 không được xác nhận và trọng lượng phân tử thu được bằng MS, cấu trúc của Hợp chất B được xác định. Các tín hiệu ^1H -NMR và ^{13}C -NMR của Hợp chất B và Oleanoside A được thể hiện trên Fig.5. Ngoài ra, kết quả của phân tích NMR hai chiều của Hợp chất B (phân tích phổ tương quan ^1H - ^1H (COSY) và phân tích kết nối đa liên kết dị hạt nhân dò bằng ^1H (HMBC)) được thể hiện trên Fig.6. Oleanoside A và Kaempferol được nhận diện bằng cách so sánh các giá trị được mô tả trong tài liệu.

Ví dụ 2: Đánh giá tác dụng hoạt hóa Tie2

Hợp chất A và Hợp chất B được hòa tan trong môi trường tăng sinh tế bào nội mô mạch (do KURABO INDUSTRIES LTD. sản xuất, Humedia-EG2) ở nồng độ cuối là $10\mu\text{g/mL}$ để điều chế mẫu thử nghiệm. Ngoài ra, angiopoietin-1 được hòa tan trong Humedia-EG2 ở nồng độ 500ng/mL để điều chế mẫu thử nghiệm được sử dụng làm đối chứng dương.

Sau đó, tế bào nội mô tĩnh mạch rốn của người bình thường (HUVEC) được cấy đến tỷ lệ hợp dòng được gieo vào đĩa 96 lỗ ở mật độ $2,0 \times 10^4$ tế bào/ $0,1\text{ mL}$ /lỗ và được nuôi cấy qua đêm với Humedia-EG2. Sau khi nuôi cấy qua đêm, HUVEC được trao đổi môi trường với $0,1\text{ mL}$ môi trường cơ sở tế bào nội mô (do KURABO INDUSTRIES LTD. sản xuất, Humedia-EB2) ba giờ trước khi kích thích tế bào (bổ sung mẫu thử nghiệm), và được cấy lại. Sau đó, cho $0,1\text{ mL}$ mẫu thử nghiệm vào các lỗ, và tiến hành ủ trong 20 phút. Sau khi ủ, lượng Tie2 được phosphoryl hóa trong tế bào được đo sử

dụng kit thử nghiệm miễn dịch (do R&D Systems, Inc. sản xuất, Human Phospho-Tie2 (Y992) Immunoassay) theo protocol. Ngoài ra, dùng làm đối chứng âm, trong dimethyl sulfoxit (DMSO) mà được dùng để hòa tan mẫu thử nghiệm, lượng Tie2 được phosphoryl hóa cũng được đo theo cùng một cách. Sau đó, tỷ lệ hoạt hóa Tie2 được tính theo phương trình dưới đây để đánh giá tác dụng phosphoryl hóa.

Tỷ lệ hoạt hóa Tie2 (%) = giá trị đo được của Tie2 được phosphoryl hóa khi bổ sung mẫu thử nghiệm/giá trị đo được của Tie2 được phosphoryl hóa trong mẫu đối chứng âm) $\times 100$

Kết quả được thể hiện trong bảng 1 và trên Fig.7. Như được thể hiện trong bảng 1 và trên Fig.7, tác dụng hoạt hóa Tie2 được xác nhận ở Hợp chất A, Hợp chất B, Oleanoside A và Kaempferol.

Bảng 1

Mẫu thử nghiệm Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Tỷ lệ hoạt hóa Tie2 (%) (Đối chứng=100)	
	Hợp chất A	Hợp chất B
10	105 $\pm$ 5,6	115 $\pm$ 1,6

Giá trị trung bình $\pm$ S.E., n=3.

Ví dụ 3: Tác dụng ức chế sự thấm mạch của Hợp chất A và Hợp chất B

Dung dịch DMSO (25 μM) chứa Hợp chất A hoặc B được điều chế trong Ví dụ 1 được sử dụng làm mẫu thử nghiệm, và được đánh giá bằng phân tích Miles đối với tác dụng ức chế sự thấm mạch tăng cường gây ra bởi yếu tố tăng trưởng nội mô mạch (VEGF) mà là yếu tố thấm mạch. Tất cả các protocol cho các quy trình trên động vật được thông qua bởi Ethics Committee of Animal Experiment theo Internal Regulations on Animal Experiments tại Suntory, dựa trên Law for the Humane Treatment and Management of Animals (Luật số 105, 1/10/1973, được sửa đổi ngày 30/5/2014).

3-1. Phương pháp thử nghiệm

Chuột nhắt cái Balb/c tám tuần tuổi được nuôi sơ bộ trong một tuần hoặc lâu hơn, và sau đó đánh giá ở n = 6 sau khi thiết lập tám vị trí dùng liều cho mỗi con (bốn chỗ bên trái và phải của đường kẻ giữa lưng).

100 μ L thuốc nhuộm xanh Evans 1% được điều chế trong nước muối được sử dụng trong tĩnh mạch ở điều kiện gây mê, và 15 phút sau, 15 μ L hỗn hợp gồm VEGF (nồng độ cuối là 300ng/ml) và mỗi mẫu thử nghiệm ở lượng tương đương được đưa vào da lưng của con chuột. Ở thời điểm 40 phút sau khi sử dụng qua đường trong da, thuốc nhuộm rò rỉ bên trong da được chiết bằng 500 μ L formamit, và lượng thuốc nhuộm được định lượng với độ hấp thụ ở 620nm. Cũng được cung cấp là vị trí mà cả VEGF và mẫu thử nghiệm đều không được đưa vào và vị trí chỉ đưa VEGF vào. Sự khác biệt đáng kể được xác định bằng thử nghiệm đa so sánh Dunnett.

3-2. Kết quả

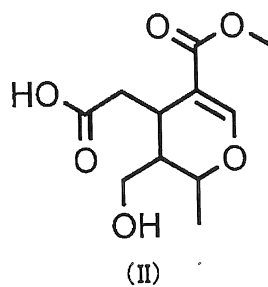
Lượng thuốc nhuộm xanh Evans rò rỉ được thể hiện trên Fig.8. Tỷ lệ ức chế sự thấm mạch bởi mẫu thử nghiệm là 89% đối với Hợp chất A và 139% đối với Hợp chất B. Từ các kết quả trên, tác dụng ức chế sự thấm mạch được xác nhận với cả Hợp chất A và Hợp chất B.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế tạo ra chế phẩm và sản phẩm tương tự có tác dụng hoạt hóa Tie2, tác dụng ức chế sự thấm mạch, tác dụng làm trưởng thành mạch, tác dụng chuẩn hóa mạch, tác dụng làm ổn định mạch, tác dụng làm ổn định mạch bạch huyết và tác dụng tương tự. Do đó, sáng chế tạo ra chế phẩm mới và sản phẩm tương tự có các hoạt tính sinh học được ưu tiên, và chế phẩm này có thể được sử dụng cho thực phẩm và đồ uống hoặc sản phẩm tương tự.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất được biểu diễn bởi công thức (II):



2. Chế phẩm chứa hợp chất theo điểm 1.
3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm là chế phẩm thực phẩm.
4. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm là chế phẩm đồ uống.

Fig. 1

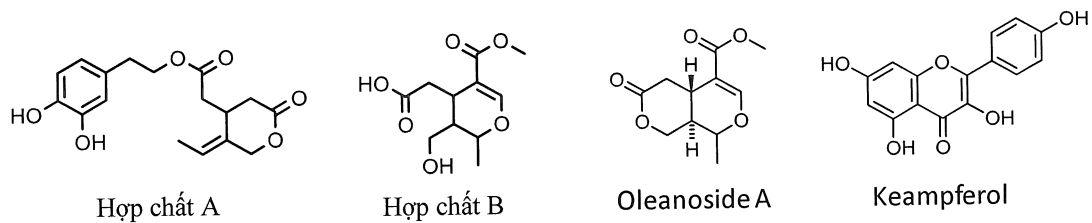


Fig. 2

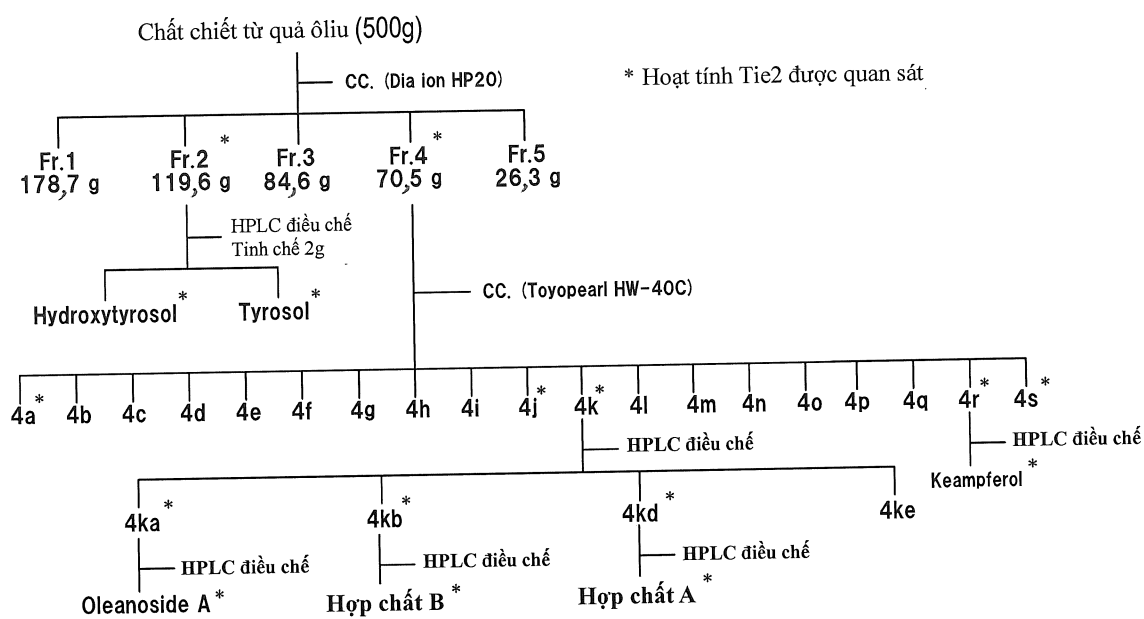
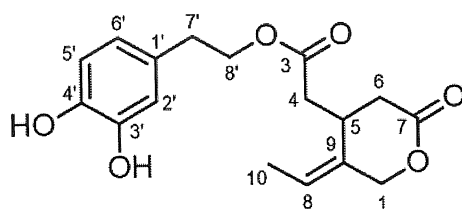
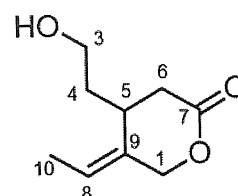


Fig. 3

Vị trí	Hợp chất A		Megaritolactonol	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	4,65 (1H, d, $J=13,0$ Hz) 4,72 (1H, d, $J=13,0$ Hz)	72,4	4,58 (1H, d, $J=12,9$ Hz) 4,77 (1H, d, $J=12,9$ Hz)	72,2
3		170,9	3,72 (2H, t, $J=6,3$ Hz)	60,1
4	2,34 (1H, dd, $J=11,0, 13,0$ Hz) 2,54 (1H, m)	38,9	1,66 (1H, m) 1,86 (1H, m)	37,1
5	3,35 (1H, m)	29,7	3,14 (1H, m)	29,6
6	2,53 (1H, m) 2,65 (1H, dd, $J=6,0, 16,0$ Hz)	34,9	2,58 (1H, dd, $J=5,9, 15,9$ Hz) 2,72 (1H, dd, $J=6,5, 15,9$ Hz)	35,5
7		174,4		172,5
8	5,63 (1H, q, $J=7,0$ Hz)	124,7	5,62 (1H, q, $J=7,0$ Hz)	124,2
9		131,8		133,4
10	1,69 (3H, d, $J=7,0$ Hz)	13,7	1,71 (3H, d, $J=6,8$ Hz)	13,6
1'		130,7		
2'	6,74 (1H, d, $J=2,0$ Hz)	116,4		
3'		143,5		
4'		143,6		
5'	6,82 (1H, d, $J=8,0$ Hz)	115,5		
6'	6,62 (1H, dd, $J=2,0, 8,0$ Hz)	121,3		
7'	2,82 (2H, m)	34,6		
8'	4,14 (1H, m) 4,84 (1H, m)	66,0		
Đo được trong CDCl ₃				



Hợp chất A



Megaritolactonol

Fig. 4

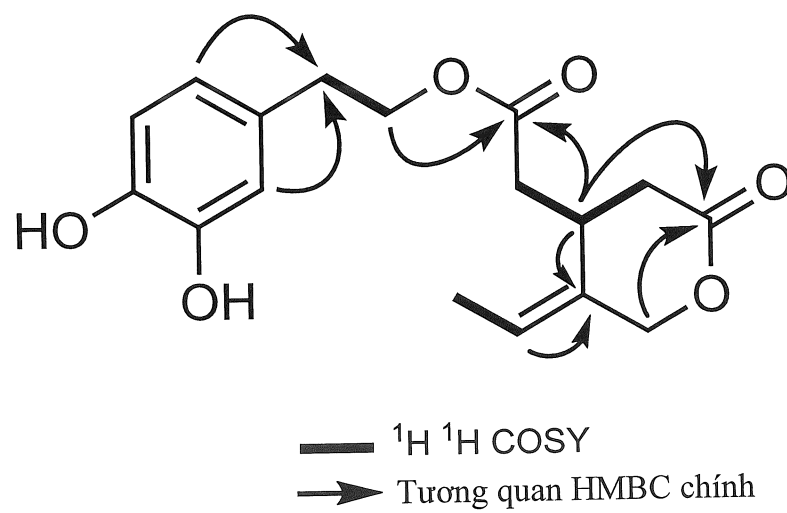
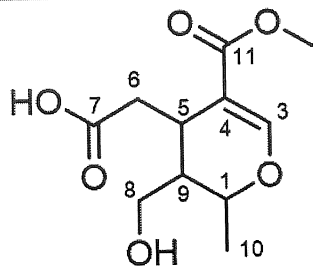
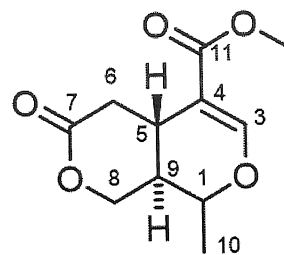


Fig. 5

Vị trí	Hợp chất B ^{*1}		Oleanoside A ^{*2}	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	4,26 (1H, quin, $J=6.2$ Hz)	74,1	3,86 (1H, m)	73,6
3	7,55 (1H, d, $J=1.1$ Hz)	156,2	7,59 (1H, d, $J=1.6$ Hz)	156,1
4		108,5		107,3
5	2,82 (1H, m)	29,6	2,70 (1H, m)	31,3
6	2,69 (2H, m)	38,2	2,12 (1H, dd, $J=18.3, 12.6$ Hz)	35,6
			3,60 (1H, dd, $J=18.3, 4.8$ Hz)	
7		174,3		169,1
8	3,48 (1H, dd, $J=11.4, 4.8$ Hz)	62,3	4,03 (1H, dd, $J=12.1, 10.8$ Hz)	69,8
	3,58 (1H, dd, $J=11.4, 6.4$ Hz)		4,48 (1H, dd, $J=5.0, 10.8$ Hz)	
9	1,74 (1H, m)	45,0	1,82 (1H, m)	40,7
10	1,36 (3H, d, $J=6.2$ Hz)	19,4	1,36 (3H, d, $J=6.3$ Hz)	18,2
		169,3		166,4
-OMe	3,68 (3H, s)	51,5	3,72 (3H, s)	51,2
*1 Đo được trong metanol- d_6				
*2 Đo được trong $CDCl_3$				



Hợp chất B



Oleanoside A

Fig. 6

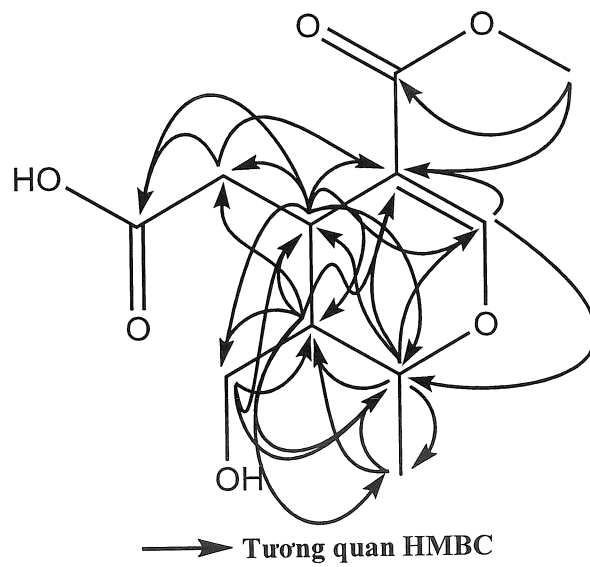


Fig. 7

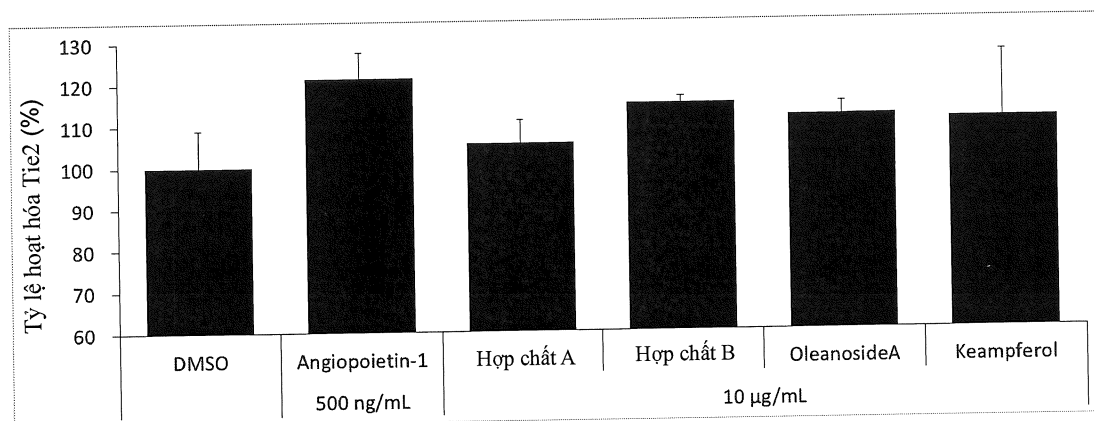


Fig. 8

