



(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)



1-0036483

(51)⁷ A61K 36/05; A61P 37/02

(13) B

(21) 1-2016-01780

(22) 18/11/2014

(86) PCT/EP2014/074937 18/11/2014

(87) WO2015/071497 21/05/2015

(30) 13 61293 18/11/2013 FR

(45) 25/07/2023 424

(43) 25/10/2016 343A

(73) AMADEITE (FR)

ZA du Haut Bois, F-56580 Brehan, France

(72) DEMAIS, Hervé (FR); NYVALL COLLÈN, Pi (SE); LE GOFF, Matthieu (FR); LE CHEVILLER, Isabelle (FR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHIẾT PHẨM TỪ TẢO THUỘC BỘ RONG CẢI BIỂN (ULVALES)

(57) Sáng chế đề cập đến chiết xuất tảo thuộc bộ Rong cải biển (*Ulva*), cụ thể chiết xuất tảo lục thuộc chi Rong cải biển (*Ulva*), chứa polysacarit dạng polyanion được sulfat hóa và không được sulfat hóa có khối lượng phân tử nhỏ hơn hoặc bằng 50kDa, không bao gồm polysacarit dạng polyanion được sulfat hóa và không được sulfat hóa có khối lượng phân tử được xác định bằng phương pháp siêu lọc lớn hơn 50kDa, sử dụng để điều hòa đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chiết xuất tảo thuộc bộ Rong cải biển (*Ulvales*), cụ thể chiết xuất tảo lục thuộc chi Rong cải biển (*Ulva*), sử dụng để điều hòa đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật, cụ thể để kích thích đáp ứng miễn dịch liên quan đến bệnh truyền nhiễm. Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng không trong điều trị chiết xuất tảo lục thuộc chi Rong cải biển (*Ulva*) để điều hòa đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Điều hòa đáp ứng miễn dịch là phương pháp quan trọng để điều trị nhiều bệnh. Cụ thể, phương pháp này được sử dụng để cải thiện đáp ứng miễn dịch ở đối tượng bị bệnh truyền nhiễm.

Ngoài ra, kích thích đáp ứng miễn dịch là cơ chế quan trọng theo nhiều khía cạnh. Ví dụ đã biết rằng sữa mẹ giàu IgA, là kháng thể sẽ cho phép trẻ sơ sinh bảo vệ chống lại một số bệnh truyền nhiễm. Các tế bào ruột, cụ thể tế bào biểu mô ruột tiếp xúc với nhiều tác nhân gây bệnh kích thích sản sinh các kháng thể. Sau đó, các kháng thể này sẽ di chuyển đến tuyến vú và sẽ được tìm thấy trong sữa mẹ, nhờ đó tạo ra tác dụng bảo vệ cho trẻ nhỏ. Có nhu cầu về các hợp chất mới có khả năng kích thích phản ứng miễn dịch này. Cụ thể, các tế bào biểu mô ruột là vị trí ưu tiên ở đó các chất kích thích miễn dịch được sử dụng theo đường miệng có thể phát huy tác dụng. Hơn nữa, có nhu cầu về các hợp chất mới có khả năng làm tăng đáp ứng với vaccin, bằng cách kích thích đáp ứng miễn dịch, cụ thể bằng cách bổ sung vào vaccin. Các loài tảo (*Ulvales*, *Clophyta*) là các tảo phát triển mạnh ở vùng thủy triều lên xuống hoặc bãi biển. Các loài tảo này tích tụ thành mảng lớn, được neo giữ bởi khối gắn kết, nhưng một số loài cũng có thể sinh trưởng ở dạng trôi nổi tự do. Tảo *Ulvae* sinh trưởng nhanh và là nguồn tiềm năng để phân phối và hấp thu các chất dinh dưỡng. Sự sinh trưởng của chúng ở cột nước được quan sát ở các vùng nước ven biển giàu dinh dưỡng và vùng nước mặn ở đó *Ulva sp.* tăng sinh dưới dạng “thủy triều xanh” (Flv.vher, 1996). Kết quả của quá trình này là thường xuyên sản sinh sinh khối và các sợi sinh khối sản sinh khí độc trong quá trình tích tụ của chúng (Morand and Briand, 1996). Cho đến nay, sinh khối này có giá trị gia tăng rất thấp và

phương pháp sử dụng chúng, không bao gồm dùng làm phân bón (Mazé et al. 1993, Cuomo et al. 1995), sản xuất khí metan (Briand and Morand, 1997), dùng làm thực phẩm cho người (Pérez, 1997) hoặc nguyên liệu sản xuất giấy (Nicolucci and Monegato 1993) có thể tạo ra khả năng sử dụng các đặc tính đặc trưng của chúng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện thấy rằng chiết xuất tảo thuộc bộ Rong cải biển (*Ulva*les), cụ thể chiết xuất tảo lục thuộc chi Rong cải biển (*Ulva*), có đặc tính điều hòa miễn dịch.

Do đó, sáng chế đề cập đến chiết xuất tảo thuộc bộ Rong cải biển (*Ulva*les), cụ thể chiết xuất tảo lục thuộc chi Rong cải biển (*Ulva*), chứa polysacarit dạng polyanion được sulfat hóa và không được sulfat hóa có khối lượng phân tử nhỏ hơn hoặc bằng 50kDa, sử dụng để điều hòa đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng không trong điều trị chiết xuất tảo thuộc bộ Rong cải biển (*Ulva*les), cụ thể chiết xuất tảo lục thuộc chi Rong cải biển (*Ulva*), chứa polysacarit dạng polyanion được sulfat hóa và không được sulfat hóa có khối lượng phân tử nhỏ hơn hoặc bằng 50kDa, để điều hòa đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến chiết xuất tảo để sử dụng như nêu trên, hoặc mô tả việc sử dụng không trong điều trị chiết xuất tảo như nêu trên, trong đó polysacarit này chứa mannoza và/hoặc arabinoza, tốt hơn nếu polysacarit này chứa mannoza. Còn cụ thể hơn, polysacarit này chứa ít nhất 0,005% khối lượng mannoza và/hoặc ít nhất 0,005% khối lượng arabinoza, tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo, tốt hơn nếu polysacarit này chứa ít nhất 0,005% mannoza. Còn cụ thể hơn, polysacarit này chứa mannoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,005% đến 0,5%, ví dụ nằm trong khoảng từ 0,005% đến 0,20% hoặc nằm trong khoảng từ 0,15% đến 0,5% và/hoặc arabinoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,005% đến 0,5% khối lượng tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo, tốt hơn nếu polysacarit này chứa mannoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,005% đến 0,5%, ví dụ nằm trong khoảng từ 0,005% đến 0,20% hoặc nằm trong khoảng từ 0,15% đến 0,5% khối lượng tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo.

Cụ thể hơn, sáng chế cũng đề cập đến chiết xuất tảo để sử dụng như nêu trên, hoặc mô tả việc sử dụng không trong điều trị chiết xuất tảo như nêu trên, trong đó polysacarit này còn chứa galactosa; và/hoặc glucoza; và/hoặc rhamnoza; và/hoặc xyloza; và/hoặc axit glucuronic.

Cụ thể hơn, polysacarit này chứa galactosa với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,05% đến 0,5% khối lượng; và/hoặc glucoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,005% đến 0,5% khối lượng, cụ thể nằm trong khoảng từ 0,005% đến 0,05% khối lượng hoặc nằm trong khoảng từ 0,05% đến 0,5% khối lượng; và/hoặc; rhamnoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 2% đến 15% khối lượng; và/hoặc xyloza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,1% đến 1% khối lượng; và/hoặc axit glucuronic với hàm lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 7% khối lượng; tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo. Sáng chế cũng đề cập đến chiết xuất tảo thuộc bộ Rong cải biển (*Ulva*les), cụ thể chiết xuất tảo lục thuộc chi Rong cải biển (*Ulva*), sử dụng để điều hòa đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật, được điều chế bằng phương pháp bao gồm các bước sau: a) rửa tảo và làm sạch cát; b) nghiền tảo; c) phân tách pha rắn của hỗn hợp tảo đã nghiền khỏi pha lỏng của nó; d) làm trong pha lỏng; e) siêu lọc dịch trong thu được ở bước d) bằng màng lọc có kích cỡ 50kDa hoặc nhỏ hơn; và f) cô dịch lọc thu được ở bước e), sau đó làm khô.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng không trong điều trị chiết xuất tảo thuộc bộ Rong cải biển (*Ulva*les), cụ thể chiết xuất tảo lục thuộc chi Rong cải biển (*Ulva*), để điều hòa đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật, được điều chế bằng phương pháp bao gồm các bước sau: a) rửa tảo và làm sạch cát; b) nghiền tảo; c) phân tách pha rắn của hỗn hợp tảo đã nghiền khỏi pha lỏng của nó; d) làm trong pha lỏng; e) siêu lọc dịch trong thu được ở bước d) bằng màng lọc có kích cỡ 50kDa hoặc nhỏ hơn; và f) cô dịch lọc thu được ở bước e), sau đó làm khô..

Cụ thể, sáng chế đề cập đến chiết xuất tảo để sử dụng như nêu trên, hoặc mô tả việc sử dụng không trong điều trị chiết xuất tảo như nêu trên, để kích thích đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật, cụ thể ở hệ miễn dịch đường ruột. Thuật ngữ “đặc tính điều hòa miễn dịch” hoặc “điều hòa đáp ứng miễn dịch” được hiểu theo nghĩa thông thường

đã biết trong lĩnh vực này, cụ thể đặc tính bất kỳ có thể kích thích hoặc làm chậm các phản ứng miễn dịch của cơ thể người hoặc cơ thể động vật.

Cụ thể, chiết xuất tảo để sử dụng theo sáng chế, hoặc việc sử dụng không trong điều trị chiết xuất tảo theo sáng chế, có thể làm tăng mức độ biểu hiện của các phân tử liên kết và chemokin, tốt hơn nếu IL8 và/hoặc IL-1 α và/hoặc IL-1- β và/hoặc IL6 và/hoặc TNF- α và/hoặc CCL20.

Do đó, chiết xuất tảo theo sáng chế là hữu ích trong điều trị và/hoặc phòng ngừa các bệnh truyền nhiễm, cụ thể bệnh truyền nhiễm trên lợn được chọn từ: bệnh lây nhiễm virus parvo, bệnh đóng dấu lợn, bệnh viêm mũi truyền nhiễm, bệnh cúm, bệnh lây nhiễm virus circo, bệnh lây nhiễm vi khuẩn *mycoplasma* và bệnh trực khuẩn coli; bệnh truyền nhiễm trên gia cầm được chọn từ: bệnh Marek, bệnh Newcastle, bệnh viêm phế quản truyền nhiễm, bệnh Gumboro, bệnh đậu gà, bệnh lây nhiễm vi khuẩn *mycoplasma*, bệnh thiếu máu truyền nhiễm trên gia cầm, bệnh viêm thanh khí quản truyền nhiễm, hội chứng giảm đẻ ở gà và bệnh cúm gia cầm; bệnh truyền nhiễm trên bò được chọn từ: bệnh tiêu chảy do virus trên bò, bệnh viêm phổi ở bò, bệnh viêm khí quản truyền nhiễm ở bò, bệnh lây nhiễm virus herpes, bệnh lây nhiễm trực khuẩn *clostridium*, bệnh trực khuẩn coli, bệnh lưỡi xanh, bệnh lây nhiễm virus corona, bệnh lây nhiễm virus rota và bệnh lây nhiễm virus *rhinotracheitis*; và bệnh truyền nhiễm trên sinh vật thủy sinh được chọn từ: bệnh hoại tử cơ quan tạo máu do virus *hematopoietic necrosis*, bệnh dịch tả, bệnh nhọt, bệnh hoại tử tuyến tụy và bệnh thiếu máu truyền nhiễm.

Do đó, sáng chế cũng đề cập đến chiết xuất tảo, như được mô tả trong bản mô tả này để sử dụng trong điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh truyền nhiễm, như các bệnh nêu trên.

Cụ thể, chiết xuất tảo theo sáng chế là hữu ích để kích thích miễn dịch, dưới dạng chế phẩm bổ sung kích thích miễn dịch.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chiết xuất tảo để sử dụng như nêu trên, trong đó chiết xuất tảo được sử dụng để bào chế được phẩm để sử dụng theo đường miệng.

Theo một phương án khác của sáng chế, chiết xuất tảo để sử dụng như nêu trên, được sử dụng để bào chế được phẩm để sử dụng theo đường tiêm truyền.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng không trong điều trị chiết xuất tảo như nêu trên, trong đó chiết xuất tảo được sử dụng làm thực phẩm bổ sung để sử dụng theo đường miệng.

Chiết xuất tảo, như được mô tả trong bản mô tả này được mô tả trong đơn patent số FR1261909.

Như nêu trên, chiết xuất tảo theo sáng chế là chiết xuất tảo thuộc bộ Rong cải biển (*Ulva*les), cụ thể chiết xuất tảo lục thuộc chi Rong cải biển (*Ulva*), chứa polysacarit dạng polyanion được sulfat hóa và không được sulfat hóa có khối lượng phân tử nhỏ hơn hoặc bằng 50kDa. Cụ thể hơn, chiết xuất tảo này chứa polysacarit dạng polyanion được sulfat hóa và không được sulfat hóa có khối lượng phân tử nhỏ hơn 40, 30, 20 hoặc 15kDa. Còn cụ thể hơn, chiết xuất tảo này chứa polysacarit dạng polyanion được sulfat hóa và không được sulfat hóa có khối lượng phân tử nhỏ hơn hoặc bằng 15kDa.

Theo một phương án, chiết xuất tảo theo sáng chế chứa polysacarit dạng polyanion được sulfat hóa và không được sulfat hóa có khối lượng phân tử nhỏ hơn hoặc bằng 50kDa, và không chứa polysacarit dạng polyanion được sulfat hóa và không được sulfat hóa có khối lượng phân tử lớn hơn 50kDa.

Theo một phương án khác, chiết xuất tảo theo sáng chế chứa polysacarit dạng polyanion được sulfat hóa và không được sulfat hóa có khối lượng phân tử nhỏ hơn hoặc bằng 15kDa, và không chứa polysacarit dạng polyanion được sulfat hóa và không được sulfat hóa có khối lượng phân tử lớn hơn 15kDa.

Dalton (Da) là đơn vị khối lượng được xác định là tương đương với một phần mười hai khối lượng nguyên tử cacbon 12, khối lượng được ước tính từ hỗn hợp của một số đồng vị (chủ yếu là cacbon 12 và cacbon 13 tương ứng có 6 và 7 neutron cộng với 6 proton của nguyên tử cacbon bất kỳ). Với độ chính xác tương đối cao, dalton tương đương với khối lượng của nguyên tử hydro, trị số chính xác là 1,00794 amu (đơn vị khối lượng nguyên tử). Kilodalton (kDa) là tương đương với 1000 Da.

Theo sáng chế, khối lượng theo đơn vị kDa được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này; cụ thể khối lượng của polysacarit dạng polyanion được

sulfat hóa và không được sulfat hóa của chiết xuất tảo có thể được xác định bằng phương pháp siêu lọc trên màng chỉ cho phép lọc các hợp chất có kích cỡ xác định trước.

Cụ thể, polysacarit của chiết xuất tảo theo sáng chế chứa mannoza và/hoặc arabinoza, tốt hơn nếu mannoza. Cụ thể hơn, polysacarit này chứa ít nhất 0,005% khối lượng mannoza và/hoặc ít nhất 0,005% khối lượng arabinoza, tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo, tốt hơn nếu ít nhất 0,01% mannoza và/hoặc ít nhất 0,01% arabinoza. Còn cụ thể hơn, polysacarit này chứa mannoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,50%, ví dụ nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,20% hoặc nằm trong khoảng từ 0,20% đến 0,5% và/hoặc arabinoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,5% khối lượng tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo, tốt hơn nếu polysacarit của chiết xuất tảo theo sáng chế chứa mannoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,03% đến 0,45%, ví dụ nằm trong khoảng từ 0,03% đến 0,15% hoặc nằm trong khoảng từ 0,15% đến 0,45% và/hoặc arabinoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,2%.

Tốt hơn nếu, polysacarit này chứa mannoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,50%, ví dụ nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,20% hoặc nằm trong khoảng từ 0,20% đến 0,5%, tốt hơn nếu mannoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,03% đến 0,45%, ví dụ nằm trong khoảng từ 0,03% đến 0,15% hoặc nằm trong khoảng từ 0,15% đến 0,45%.

Cụ thể, polysacarit này còn chứa galactoza; và/hoặc glucoza; và/hoặc rhamnoza; và/hoặc xyloza; và/hoặc axit glucuronic.

Còn cụ thể hơn, polysacarit này chứa galactoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,05% đến 0,5% khối lượng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,1% đến 0,4%; và/hoặc glucoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,005% đến 0,5% khối lượng, cụ thể nằm trong khoảng từ 0,005% đến 0,05% khối lượng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,03%, hoặc nằm trong khoảng từ 0,05% đến 0,5% khối lượng; và/hoặc rhamnoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 2% đến 15% khối lượng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 5% đến 10%; và/hoặc xyloza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,1% đến 1% khối lượng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,3% đến 0,7%; và/hoặc axit glucuronic

với hàm lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 7% khối lượng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 1% đến 5%; tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo.

Do đó, chiết xuất tảo để sử dụng theo sáng chế có thể chứa mannoza; và/hoặc arabinoza; và/hoặc galactoza; và/hoặc glucoza; và/hoặc rhamnoza; và/hoặc xyloza; và/hoặc axit glucuronic.

Cụ thể hơn, chiết xuất tảo để sử dụng theo sáng chế có thể chứa mannoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,50%, ví dụ nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,20%, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,03% đến 0,15% hoặc nằm trong khoảng từ 0,20% đến 0,5%; và/hoặc arabinoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,5%, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,2%; và/hoặc galactoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,05% đến 0,5%, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,1% đến 0,4%; và/hoặc glucoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,005% đến 0,5% khối lượng, cụ thể nằm trong khoảng từ 0,005% đến 0,05% khối lượng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,03%, hoặc nằm trong khoảng từ 0,05% đến 0,5% khối lượng; và/hoặc rhamnoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 2% đến 15% khối lượng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 5% đến 10%; và/hoặc xyloza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,1% đến 1% khối lượng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,3% đến 0,7%; và/hoặc axit glucuronic với hàm lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 7% khối lượng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 1% đến 5%; tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo.

Còn cụ thể hơn, chiết xuất tảo để sử dụng theo sáng chế có thể chứa 0,09% mannoza; và/hoặc 0,1% arabinoza; và/hoặc 0,3% galactoza; và/hoặc 0,02% glucoza; và/hoặc 8,1% rhamnoza; và/hoặc 0,5% xyloza; và/hoặc 2,6% axit glucuronic; tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo.

Chiết xuất tảo để sử dụng theo sáng chế cũng có thể chứa 0,3% mannoza; và/hoặc 0,2% galactoza; và/hoặc 0,4% glucoza; và/hoặc 7,9% rhamnoza; và/hoặc 0,5% xyloza; và/hoặc 4,9% axit glucuronic; tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo.

Do đó, sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng không trong điều trị chiết xuất tảo theo sáng chế, trong đó chiết xuất tảo này chứa mannoza; và/hoặc arabinoza; và/hoặc galactoza; và/hoặc glucoza; và/hoặc rhamnoza; và/hoặc xyloza; và/hoặc axit glucuronic,

Cụ thể hơn, chiết xuất tảo này chứa mannoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,50%, ví dụ nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,20%, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,03% đến 0,15% hoặc nằm trong khoảng từ 0,20% đến 0,5%; và/hoặc arabinoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,5%, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,2%; và/hoặc galactoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,05% đến 0,5%, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,1% đến 0,4%; và/hoặc glucoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,005% đến 0,5% khối lượng, cụ thể nằm trong khoảng từ 0,005% đến 0,05% khối lượng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,03%, hoặc nằm trong khoảng từ 0,05% đến 0,5% khối lượng; và/hoặc rhamnoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 2% đến 15% khối lượng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 5% đến 10%; và/hoặc xyloza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,1% đến 1% khối lượng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,3% đến 0,7%; và/hoặc axit glucuronic với hàm lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 7% khối lượng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 1% đến 5%; tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo,

Còn cụ thể hơn, chiết xuất tảo này chứa 0,09% mannoza; và/hoặc 0,1% arabinoza; và/hoặc 0,3% galactoza; và/hoặc 0,02% glucoza; và/hoặc 8,1% rhamnoza; và/hoặc 0,5% xyloza; và/hoặc 2,6% axit glucuronic; tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo, hoặc chiết xuất tảo này chứa 0,3% mannoza; và/hoặc 0,2% galactoza; và/hoặc 0,4% glucoza; và/hoặc 7,9% rhamnoza; và/hoặc 0,5% xyloza; và/hoặc 4,9% axit glucuronic; tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo.

Như nêu trên, chiết xuất tảo theo sáng chế là chiết xuất tảo thuộc bộ Rong cải biển (*Ulva*), cụ thể chiết xuất tảo lục thuộc chi Rong cải biển (*Ulva*), được điều chế bằng phương pháp bao gồm các bước sau: a) rửa tảo và làm sạch cát; b) nghiền tảo; c) phân tách pha rắn của hỗn hợp tảo đã nghiền khỏi pha lỏng của nó; d) làm trong pha lỏng; e) siêu lọc dịch trong thu được ở bước d) bằng màng lọc có kích cỡ 50kDa hoặc nhỏ hơn; và f) cô dịch lọc thu được ở bước e), sau đó làm khô.

Theo một phương án, chiết xuất tảo này chứa cacbon với hàm lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 50%; hydro với hàm lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 10%; nitơ với hàm lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 5%; oxy với hàm lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 50%; và lưu huỳnh với hàm lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 15%; tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo.

Còn cụ thể hơn, chiết xuất tảo này chứa cacbon với hàm lượng nằm trong khoảng từ 15% đến 30%; hydro với hàm lượng nằm trong khoảng từ 3% đến 6%; nitơ với hàm lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 3%; oxy với hàm lượng nằm trong khoảng từ 25% đến 40%; và lưu huỳnh với hàm lượng nằm trong khoảng từ 2,5% đến 10%; tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo.

Theo một phương án khác, chiết xuất tảo này chứa cacbon với hàm lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 50%; hydro với hàm lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 10%; nitơ với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,5% đến 5%; oxy với hàm lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 60%; và lưu huỳnh với hàm lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 15%; tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo.

Tốt hơn nếu các nguyên tố hóa học khác có trong chất khô của chiết xuất tảo là các nguyên tố khoáng chất (Ca, K, Na, Mg, Al, Cl, I, P, Fe, v.v).

Cụ thể hơn, chiết xuất tảo theo sáng chế có phổ ^1H NMR được thể hiện trên Fig.1.

Phổ ^1H NMR này được ghi ở nhiệt độ 298°K bằng máy quang phổ Bruker Avance 500 được trang bị đầu dò cryo đảo chiều 5mm TCI $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$. Trước khi phân tích, các mẫu được hòa tan trong nước nặng D_2O 99,97%. Độ dịch chuyển hóa học được tính theo đơn vị ppm dựa trên chuẩn ngoại (axit trimetylsilylpropionic). Tín hiệu HOD không được loại trừ.

Theo một phương án của sáng chế, chiết xuất tảo chứa polysacarit dạng polyanion được sulfat hóa và không được sulfat hóa có khối lượng phân tử nhỏ hơn hoặc bằng 50kDa được điều chế bằng phương pháp bao gồm các bước sau: a) rửa tảo và làm sạch cát; b) nghiền tảo; c) phân tách pha rắn của hỗn hợp tảo đã nghiền khỏi pha lỏng của nó; d) làm trong pha lỏng; e) siêu lọc dịch trong thu được ở bước d) bằng màng lọc có kích cỡ 50kDa hoặc nhỏ hơn; và f) cô dịch lọc thu được ở bước e), sau đó làm khô.

Cụ thể, để áp dụng phương pháp theo sáng chế, ở bước a), tảo được rửa bằng nước tinh khiết.

Tảo được làm sạch cát bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này.

Sau đó, tảo này được nghiền, tốt hơn nếu bằng máy nghiền, ví dụ máy xay hoặc máy băm.

Sau đó, pha rắn của hỗn hợp tảo đã nghiền (bột nhão) được phân tách ra khỏi pha lỏng của nó (dịch lỏng) bằng cách nén hỗn hợp tảo đã nghiền này, ví dụ bằng máy ép đai hoặc máy ép đĩa, hoặc bằng cách ly tâm.

Thuật ngữ “dịch trong” được dùng trong bản mô tả để chỉ dịch bào tương chứa các thành phần có cấu trúc kép ở thành tế bào tảo.

Sau đó, pha lỏng thu được được làm trong, ví dụ bằng thiết bị lắng có tấm lắng, hoặc bằng cách ly tâm, gạn hoặc lọc (ví dụ bằng túi hoặc tấm lọc).

Sau đó, dịch trong thu được được siêu lọc.

Theo một phương án để áp dụng phương pháp theo sáng chế, bước siêu lọc được thực hiện trên màng có kích cỡ bằng 50kDa hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nếu trên màng có kích cỡ bằng 40, 30, 20 hoặc 15kDa. Cụ thể hơn, màng được sử dụng trong sáng chế là màng có kích cỡ bằng 15kDa hoặc nhỏ hơn.

Ví dụ màng này có thể là màng gồm hoặc màng hữu cơ. Cụ thể hơn, màng này là màng gồm.

Sau đó, dịch lọc thu được có thể được cô, ví dụ bằng phương pháp thẩm thấu ngược, phương pháp làm bay hơi hoặc kết tủa, sau đó làm khô, ví dụ bằng phương pháp sấy đông khô hoặc phun sương.

Tùy ý, sau đó chiết xuất thu được có thể được nghiền một lần nữa để thu được bột có kích cỡ hạt đồng đều.

Theo một số khía cạnh, phương pháp được thực hiện một phần ở nhiệt độ phòng. Thuật ngữ “nhiệt độ phòng” được dùng trong bản mô tả để chỉ nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5°C đến 25°C.

Theo một khía cạnh khác, phương pháp được thực hiện một phần ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 4°C đến 10°C để tránh phát triển vi sinh vật.

Theo một phương án để áp dụng phương pháp theo sáng chế, chiết xuất tảo thu được ở bước f) của phương pháp nêu trên được tinh chế, ví dụ bằng phương pháp siêu lọc, cụ thể bằng bộ siêu lọc, tốt hơn nếu để loại bỏ phần khoáng.

Theo một khía cạnh khác, chiết xuất tảo để sử dụng theo sáng chế được điều chế bằng phương pháp như mô tả nêu trên.

Phương pháp này khác biệt so với các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này do không cần bước kết tinh chiết xuất tảo. Phương pháp này cũng khác biệt so với các phương pháp chiết xuất đã biết do không cần sử dụng dung môi, đặc biệt là dung môi hữu cơ, do đó thân thiện hơn với môi trường.

Thuật ngữ “tảo lục thuộc chi Rong cải biển (*Ulva*)” được dùng trong bản mô tả để chỉ tảo lục thuộc chi Rong cải biển (*Ulva*), thuộc họ Rong cải biển (*Ulvaaceae*), thuộc bộ Rong cải biển (*Ulvales*). Tốt hơn nếu, tảo lục thuộc chi Rong cải biển (*Ulva*) theo sáng chế là các loài hoặc phân loài sau: *Ulva acanthophora*, *Ulva anandii*, *Ulva angusta*, *Ulva arasaki*, *Ulva armoricana*, *Ulva atroviridis*, *Ulva attenuata*, *Ulva beytensis*, *Ulva bifrons*, *Ulva brevistipitata*, *Ulva bulbosa*, *Ulva burmanica*, *Ulva byssoides*, *Ulva californica*, *Ulva chaetomorphoides*, *Ulva clathrata*, *Ulva coccinea*, *Ulva compressa*, *Ulva globata*, *Ulva cornucopiae*, *Ulva cornuta*, *Ulva covelongensis*, *Ulva crassa*, *Ulva crassimembrana*, *Ulva curvata*, *Ulva dactylifera*, *Ulva denticulata*, *Ulva elegans*, *Ulva elminthoides*, *Ulva enteromorpha*, *Ulva erecta*, *Ulva expansa*, *Ulva fasciata*, *Ulva fenestrata*, *Ulva flexuosa*, *Ulva gelatinosa*, *Ulva geminoidea*, *Ulva gigantea*, *Ulva grandis*, *Ulva hendayensis*, *Ulva hookeriana*, *Ulva hopkirkii*, *Ulva indica*, *Ulva intestinalis*, *Ulva intestinaloides*, *Ulva intricata*, *Ulva intybacea*, *Ulva javanica*, *Ulva kylinii*, *Ulva lactuca*, *Ulva lactucaefolia*, *Ulva laetevirens*, *Ulva laingii*, *Ulva linearis*, *Ulva lingulata*, *Ulva linkiana*, *Ulva linza*, *Ulva lippii*, *Ulva litoralis*, *Ulva littorea*, *Ulva*

lobata, Ulva lubrica, Ulva marginata, Ulva micrococca, Ulva myriotrema, Ulva neapolitana, Ulva nematoidea, Ulva ohnoi, Ulva olivacea, Ulva olivaceum, Ulva pacifica, Ulva papenfussii, Ulva paradoxa, Ulva parva, Ulva parvula, Ulva patengensis, Ulva percursa, Ulva pertusa, Ulva phyllosa, Ulva popenguinensis, Ulva porrifolia, Ulva procera, Ulva profunda, Ulva prolifera, Ulva pseudocurvata, Ulva pseudolinza, Ulva pulchra, Ulva purpurascens, Ulva quilonensis, Ulva radiata, Ulva ralfsii, Ulva ranunculata, Ulva reticulata, Ulva rhacodes, Ulva rigida, Ulva rotundata, Ulva rubens, Ulva saifullahii, Ulva scagelii, Ulva scandinavica, Ulva sericea, Ulva serrata, Ulva simplex, Ulva sorensenii, Ulva spinulosa, Ulva stenophylla, Ulva stipitata, Ulva sublittoralis, Ulva subulata, Ulva taeniata, Ulva tenera, Ulva tetragona, Ulva torta, Ulva tuberosa, Ulva umbilicata, Ulva uncialis, Ulva uncinata, Ulva usneoides, Ulva utricularis, Ulva utriculosa, Ulva uvoides, Ulva ventricosa.

Do đó, chiết xuất tảo để sử dụng theo sáng chế có thể được sử dụng trong lĩnh vực thú y, và được bào chế thành thuốc hoặc dược phẩm, để điều hòa đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật, cụ thể để kích thích đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật, và cụ thể hơn để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm, như các bệnh nêu trên, còn cụ thể hơn để kích thích miễn dịch, dưới dạng chế phẩm bổ sung kích thích miễn dịch.

Do đó, sáng chế cũng đề cập đến chiết xuất tảo để sử dụng như mô tả ở trên, trong đó chiết xuất tảo được bào chế thành dược phẩm hoặc thuốc.

Việc sử dụng không trong điều trị chiết xuất tảo theo sáng chế có thể nhằm mục đích để sử dụng cho người hoặc động vật, ví dụ bằng thực phẩm bổ sung có lợi cho sức khỏe mà không có bất kỳ tác dụng thứ cấp để điều hòa đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật, cụ thể để kích thích đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật.

Do đó, sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng không trong điều trị chiết xuất tảo như mô tả ở trên, trong đó chiết xuất tảo được bào chế thành thực phẩm.

Cụ thể, thực phẩm là hữu ích dưới dạng chế phẩm bổ sung kích thích miễn dịch.

Tác dược được dụng được sử dụng để điều chế thuốc hoặc dược phẩm chứa chiết xuất tảo để sử dụng theo sáng chế được chọn theo dạng bào chế và phương pháp sử dụng mong muốn, từ các tá dược thông thường đã biết trong lĩnh vực này.

Theo sáng chế để sử dụng theo đường miệng, ngậm dưới lưỡi, tiêm dưới da, tiêm bắp, tiêm tĩnh mạch, khu trú, tại chỗ, trong khí quản, trong mũi, tiêm qua da hoặc theo đường trực tràng, dưới dạng hỗn hợp với các tá dược được dụng thông thường, cho người và động vật, để điều hòa đáp ứng miễn dịch, cụ thể để phòng ngừa và/hoặc điều trị các bệnh truyền nhiễm, như nêu trên.

Dạng bào chế thích hợp bao gồm dạng bào chế dùng theo đường miệng, như viên nén, viên nang cứng gelatin và viên nang mềm gelatin, thuốc bột, thuốc cốm và dung dịch thuốc hoặc hỗn dịch thuốc, dạng bào chế ngậm dưới lưỡi, qua khoang miệng, trong khí quản, trong mắt, trong mũi bằng cách hít, dạng bào chế dùng khu trú, theo đường tiêm truyền, như tiêm qua da, tiêm dưới da, tiêm bắp hoặc tiêm tĩnh mạch, dạng bào chế dùng theo đường trực tràng và thuốc cấy. Để sử dụng khu trú, có thể sử dụng chiết xuất tảo để sử dụng theo sáng chế ở dạng kem, gel, sáp thơm hoặc thuốc sức.

Khi chế phẩm rắn ở dạng viên nén được bào chế, hoạt chất chính có thể được trộn với chất mang được dụng, như gelatin, tinh bột, lactoza, magie stearat, talc, gôm arabic hoặc tá dược tương tự.

Viên nén cũng có thể được bao bằng saccharoza, dẫn xuất xenluloza, hoặc tá dược thích hợp khác hoặc viên nén có thể được bào chế đặc biệt để có hoạt tính kéo dài hoặc giải phóng chậm và giải phóng liên tục lượng xác định trước của hoạt chất.

Viên nang gelatin có thể được bào chế bằng cách trộn hoạt chất với tác dược pha loãng và nạp hỗn hợp thu được vào vỏ nang cứng gelatin hoặc vỏ nang mềm gelatin.

Theo phương án cụ thể, chiết xuất tảo, thuốc hoặc dược phẩm để sử dụng theo sáng chế được bào chế để sử dụng theo đường miệng. Theo một phương án khác, chiết xuất tảo, thuốc hoặc dược phẩm để sử dụng theo sáng chế được bào chế để sử dụng theo đường tiêm.

Thuốc hoặc dược phẩm chứa chiết xuất tảo để sử dụng theo sáng chế, có thể cũng ở dạng lỏng, ví dụ dung dịch, nhũ tương, hỗn dịch hoặc xirô, và tốt hơn nếu ở dạng thích hợp để sử dụng theo đường miệng hoặc qua mũi. Ví dụ về tá dược lỏng thích hợp bao gồm nước, dung môi hữu cơ, như glycerol hoặc glycol, cũng như hỗn hợp của chúng trong nước theo tỷ lệ phần trăm khác nhau.

Xirô hoặc cốm thuốc hoặc thuốc nhỏ có thể cũng chứa hoạt chất cùng với chất làm ngọt nghèo năng lượng, chất bảo quản, như metylparaben và propylparaben, cũng như chất điều vị và chất màu thích hợp.

Thuốc bột hoặc thuốc cốm phân tán trong nước có thể chứa hoạt chất được chọn với chất phân tán hoặc chất hút ẩm; hoặc chất gây thấm ổn định, như polyvinylpyrrolidon, cũng như chất làm ngọt hoặc chất điều vị.

Nhìn chung, liều lượng hàng ngày của chiết xuất tảo theo sáng chế sẽ là liều lượng hữu hiệu thấp nhất của chiết xuất tảo có khả năng tạo ra tác dụng kích thích miễn dịch.

Thuật ngữ “liều lượng hữu hiệu” được dùng trong bản mô tả để chỉ lượng bất kỳ của chế phẩm cho phép tạo ra tác dụng mong muốn, tức là tác dụng kích thích miễn dịch.

Theo một số khía cạnh, chiết xuất tảo để sử dụng theo sáng chế được sử dụng trong chế phẩm, như nêu trên để sử dụng ở liều lượng trên người nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mg/kg, còn cụ thể hơn nằm trong khoảng từ 0,5 đến 60mg/kg, ví dụ nằm trong khoảng từ 1 đến 20mg/kg hoặc nằm trong khoảng từ 5 đến 30mg/kg, hoặc ở liều lượng trên động vật nằm trong khoảng từ 1 đến 200mg/kg, cụ thể hơn nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/kg, còn cụ thể hơn nằm trong khoảng từ 2 đến 45mg/kg hoặc nằm trong khoảng từ 10 đến 60mg/kg.

Theo một số khía cạnh khác, liên quan đến việc sử dụng không trong điều trị chiết xuất tảo theo sáng chế, chiết xuất tảo thành phẩm có thể được sử dụng trong thực phẩm.

Thuật ngữ “thực phẩm” được dùng trong bản mô tả để chỉ loại thực phẩm dinh dưỡng bất kỳ, như sữa chua hoặc đồ uống, tốt hơn nếu đồ uống sữa, nguyên liệu, chất phụ gia hoặc chất bổ trợ, ở dạng hỗn hợp sơ chế, có tác dụng chữa bệnh hoặc không, để kết hợp vào thực phẩm, thực phẩm đầy đủ hoặc thực phẩm bổ sung, để dùng cho người hoặc động vật.

Theo một số khía cạnh, để sử dụng không trong điều trị thực phẩm chứa chiết xuất tảo, chiết xuất tảo thành phẩm được sử dụng với liều lượng trên người nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mg/kg, còn cụ thể hơn nằm trong khoảng từ 0,5 đến 60mg/kg, ví dụ nằm trong khoảng từ 1 đến 20mg/kg hoặc nằm trong khoảng từ 5 đến 30mg/kg, hoặc ở liều

lượng trên động vật nằm trong khoảng từ 1 đến 200mg/kg, cụ thể hơn nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/kg, còn cụ thể hơn nằm trong khoảng từ 2 đến 45mg/kg hoặc nằm trong khoảng từ 10 đến 60mg/kg.

Theo một số khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều hòa đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật, cụ thể để kích thích đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật bao gồm bước cho người hoặc động vật sử dụng liều lượng hữu hiệu của chiết xuất tảo theo sáng chế.

Cụ thể hơn, phương pháp theo sáng chế kích thích đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật, cụ thể ở hệ miễn dịch đường ruột.

Còn cụ thể hơn, phương pháp theo sáng chế có tác dụng điều hòa biểu hiện các phân tử liên kết và chemokin, tốt hơn nếu IL8 và/hoặc IL-1 α và/hoặc IL1- β và/hoặc IL6 và/hoặc TNF- α và/hoặc CCL20.

Chiết xuất tảo được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng trong thuốc, dược phẩm hoặc thực phẩm, như nêu trên.

Chiết xuất tảo có thể được sử dụng theo các phương pháp sử dụng nêu trên.

Theo một phương án để áp dụng phương pháp theo sáng chế, chiết xuất tảo theo sáng chế được sử dụng trong dược phẩm.

Cụ thể, phương pháp này là hữu ích để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm, như các bệnh nêu trên.

Theo một phương án khác để áp dụng phương pháp theo sáng chế, chiết xuất tảo theo sáng chế được sử dụng trong thực phẩm.

Cụ thể, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều hòa đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật, như nêu trên bao gồm bước cho người hoặc động vật sử dụng liều lượng hữu hiệu của chiết xuất tảo theo sáng chế trong thời gian từ 3 đến 30 ngày, cụ thể từ 10 đến 20 ngày hoặc nằm trong khoảng từ 3 đến 10 ngày, ở liều lượng trên người nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mg/kg, cụ thể hơn nằm trong khoảng từ 0,5 đến 60mg/kg, còn cụ thể hơn nằm trong khoảng từ 1 đến 20mg/kg hoặc nằm trong khoảng từ 5 đến

30mg/kg, hoặc ở liều lượng trên động vật nằm trong khoảng từ 1 đến 200mg/kg, cụ thể hơn nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/kg, còn cụ thể hơn nằm trong khoảng từ 2 đến 45mg/kg hoặc nằm trong khoảng từ 10 đến 60mg/kg.

Theo một phương án để áp dụng phương pháp theo sáng chế, khi kết thúc khoảng thời gian nêu trên, việc sử dụng chiết xuất tảo có thể được lặp lại trong khoảng thời gian tương đương.

Theo một số khía cạnh, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều hòa đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật, như nêu trên bao gồm các bước sau:

a) điều chế chiết xuất tảo theo sáng chế theo phương pháp bao gồm các bước: rửa tảo và làm sạch cát; nghiền tảo; phân tách pha rắn của hỗn hợp tảo đã nghiền khỏi pha lỏng của nó; làm trong pha lỏng; siêu lọc dịch trong thu được ở bước phía trước bằng màng lọc có kích cỡ 50kDa hoặc nhỏ hơn, ví dụ bằng 15kDa hoặc nhỏ hơn; và cô dịch lọc thu được ở bước phía trước, sau đó làm khô; tùy ý bằng bước siêu lọc, ví dụ bằng bộ siêu lọc; và

b) sử dụng cho người hoặc động vật, liều lượng hữu hiệu của chiết xuất tảo theo sáng chế, cụ thể trong thời gian từ 3 đến 30 ngày, cụ thể hơn từ 10 đến 20 ngày hoặc nằm trong khoảng từ 3 đến 10 ngày, ở liều lượng trên người nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mg/kg, còn cụ thể hơn nằm trong khoảng từ 0,5 đến 60mg/kg, ví dụ nằm trong khoảng từ 1 đến 20mg/kg hoặc nằm trong khoảng từ 5 đến 30mg/kg, hoặc ở liều lượng trên động vật nằm trong khoảng từ 1 đến 200mg/kg, cụ thể hơn nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/kg, còn cụ thể hơn nằm trong khoảng từ 2 đến 45mg/kg hoặc nằm trong khoảng từ 10 đến 60mg/kg.

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các hình vẽ và ví dụ dưới đây, nhưng không chỉ giới hạn ở các hình vẽ và ví dụ này.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện phổ ^1H NMR của chiết xuất tảo theo sáng chế.

Fig.2 là đồ thị thể hiện sắc ký đồ thu được với chiết xuất tảo theo sáng chế được phân tách trên cột Shodex 802 và cột Shodex 803.

Fig.3 là đồ thị thể hiện sắc ký đồ thu được sau khi phân tích dẫn xuất được trimethylsilyl hóa của mẫu chiết xuất tảo theo sáng chế bằng phương pháp sắc ký khí, trong đó Ara: Arabinoza; Gal: Galactoza; Glc: Glucoza ; Xyl: Xyloza; Man: Mannoza; Rha: Rhamnoza, GlcA: Axít glucuronic.

Fig.4 là biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá liều lượng không độc tối đa của chiết xuất tảo EA1 theo sáng chế.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá liều lượng không độc tối đa của chiết xuất tảo EA2 theo sáng chế.

Fig.6 là biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá liều lượng không độc tối đa của chiết xuất tảo EA3 theo sáng chế.

Fig.7 là biểu đồ thể hiện tác dụng của chiết xuất tảo EA1, EA2 và EA3 theo sáng chế đến mức độ biểu hiện của IL8 (được đo bằng phương pháp PCR định lượng).

Fig.8 là biểu đồ thể hiện tác dụng của chiết xuất tảo EA1, EA2 và EA3 theo sáng chế đến mức độ biểu hiện của TNF- α (được đo bằng phương pháp PCR định lượng).

Fig.9 là biểu đồ thể hiện tác dụng của chiết xuất tảo EA1, EA2 và EA3 theo sáng chế đến mức độ biểu hiện của CCL20 (được đo bằng phương pháp PCR định lượng).

Fig.10 là biểu đồ thể hiện tác dụng của chiết xuất tảo EA1 theo sáng chế đến mức độ biểu hiện của IL6 (được đo bằng phương pháp PCR định lượng).

Fig.11 là biểu đồ thể hiện tác dụng của chiết xuất tảo EA1 theo sáng chế đến mức độ biểu hiện của IL1 α (được đo bằng phương pháp PCR định lượng).

Fig.12 là biểu đồ thể hiện tác dụng của chiết xuất tảo EA1 theo sáng chế đến mức độ biểu hiện của IL1 β (được đo bằng phương pháp PCR định lượng).

Fig.13 là biểu đồ thể hiện tác dụng của chiết xuất tảo EA1 theo sáng chế đến mức độ biểu hiện của PPAR γ (được đo bằng phương pháp PCR định lượng).

Fig.14 là biểu đồ thể hiện tác dụng của chiết xuất tảo EA1 theo sáng chế đến mức độ biểu hiện của IL12p35 (được đo bằng phương pháp PCR định lượng).

Fig.15 là biểu đồ thể hiện tác dụng của chiết xuất tảo EA1 và EA3 theo sáng chế được đo bằng ELISA đến mức độ biểu hiện của TNF- α .

Fig.16 là biểu đồ thể hiện tác dụng của chiết xuất tảo EA1 và EA3 theo sáng chế được đo bằng ELISA đến mức độ biểu hiện của IL-8.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Điều chế chiết xuất tảo theo sáng chế

Một tấn nguyên liệu tảo lục tươi thuộc chi Rong cải biển (*Ulva*), được rửa bằng nước tinh khiết và làm sạch cát bằng máy rửa tảo.

Trừ khi có quy định khác, phương pháp điều chế chiết xuất tảo theo sáng chế được thực hiện ở nhiệt độ phòng.

Sau đó, tảo này (1 tấn tảo đã hút khô chứa 8% chất khô) được nghiền thành các hạt mịn bằng máy nghiền (thương hiệu Inotec loại “I175CDI-75D”). Thuật ngữ “hạt mịn” được dùng trong bản mô tả để chỉ các hạt có kích cỡ nằm trong khoảng từ 50nm đến 1000nm, gồm hai loại hạt, loại thứ nhất có kích cỡ nằm trong khoảng từ 50nm đến 200nm, loại thứ hai có kích cỡ nằm trong khoảng từ 600nm đến 1000nm.

Sau đó, hỗn hợp tảo đã nghiền được nén bằng máy ép đai Flottweg loại “B FRU 800 HK” ở tốc độ dòng bằng khoảng 1 tấn/giờ.

Bước này cho phép phân tách pha rắn (bột nhão) khỏi pha lỏng (dịch chiết). Hiệu suất dịch trong thu được bằng 75%.

Sau đó, 750kg dịch chiết thu được được làm trong bằng thiết bị lắng dạng tấm Flottweg loại “AC 2000” để thu được 710kg dịch trong chứa 3,10% chất khô (hiệu suất khối lượng nằm trong khoảng từ 95% đến 98%) và bột nhão (hàm lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 5% khối lượng).

Sau đó, dịch trong này được siêu lọc bằng màng gốm (Tami Industries) có kích cỡ bằng 15kDa để thu được phần qua màng và phần không qua màng. Phần qua màng được giữ lại cho đến khi thu được 640kg dịch lọc (hiệu suất thể tích bằng 91%) chứa 2,2% chất khô.

Sau đó, dịch lọc (phần qua màng) được sấy đông khô, sau khi cô bằng cách làm bay hơi.

Bước cô được thực hiện bằng máy làm bay hơi một nồi (EVA 1000, Pignat) với các thông số sau: tuần hoàn cưỡng bức, tốc độ dòng cấp bằng 10L/giờ, áp suất hơi bằng 1 bar, áp suất chân không bằng 0,3 bar và nhiệt độ bay hơi bằng 90°C.

Bước cô thứ nhất đạt được với tốc độ dòng của nước được bay hơi bằng 8 L/giờ và độ ngọt Brix tăng từ 5,5 (tương đương với hàm lượng chất khô bằng 4,5%) đến 14,7.

Sau đó, dung dịch này được cô lần thứ hai với tốc độ dòng của nước được bay hơi nằm trong khoảng từ 5 đến 6 L/giờ và độ ngọt Brix tăng đến 34. Hàm lượng chất khô của dung dịch được xác định bằng 38,4%.

Sau đó, bước đông khô được thực hiện bằng thiết bị Bioblock (kiểu CHRIST alpha 1-4 LSC) ở nhiệt độ đông khô bằng -80°C là nhiệt độ thấp nhất trong bước này.

Sau đó, bột thu được được nghiền bằng máy nghiền xoay MiniMill thương hiệu Philips. Bột này được nạp vào các phễu nghiền (10g bột trong mỗi phễu nghiền với 4 bi trong zirconia). Toàn bộ thiết bị được quay trong 15 phút ở tốc độ bằng 10 để thu được 14kg bột chiết xuất tảo.

Ví dụ 2: Xác định khối lượng phân tử của polysacarit dạng polyanion được sulfat hóa và không được sulfat hóa của chiết xuất tảo theo sáng chế bằng phương pháp sắc ký lọc gel

Chiết xuất tảo điều chế theo Ví dụ 1 được siêu lọc qua màng có kích cỡ bằng 1000 Da và hòa tan ở nồng độ bằng 0,5g/L trong nước. Sau đó, dung dịch thu được được tiêm vào cột Shodex 802 và cột Shodex 803 được bố trí theo thứ tự (khoảng hoạt động của cột 802: 4×10^3 Da và cột 803: $1,7 \times 10^5$ Da). Dung môi rửa giải được sử dụng là natri nitrat 0,1M chứa 0,2% natri azit ở tốc độ dòng bằng 0,5mL/phút. Quá trình phát hiện được thực hiện bằng khúc xạ kế Wyatt và bộ phận phát hiện tán xạ ánh sáng 18 góc Wyatt. Tỷ lệ dn/dc được thiết lập bằng 0,150mL/g.

Sắc ký đồ được phát hiện bằng khúc xạ kế được thể hiện trên Fig.2.

Kết quả phân tích cho thấy khối lượng phân tử trung bình của polysacarit của chiết xuất tảo theo sáng chế bằng 4,4kDa.

Ví dụ 3: Xác định thành phần của chiết xuất tảo theo sáng chế

Chiết xuất tảo điều chế theo Ví dụ 1 được tinh chế bằng cách siêu lọc bằng bình lọc amicon kết hợp khuấy. Màng xenluloza tái chế có các lỗ lọc có kích cỡ bằng 1000 Da được sử dụng. Mẫu chiết xuất tảo theo sáng chế (572,1mg) được hòa tan trong 150mL nước siêu tinh khiết mili-Q. Nước (5L) được sử dụng để loại bỏ toàn bộ các hợp chất có khối lượng phân tử nhỏ hơn 1000 Da. Phần không qua màng lọc được đông khô để thu được 117mg mẫu. Do đó, hiệu suất siêu lọc bằng 20,5% (khối lượng/khối lượng). Các phân tích sau được thực hiện trên mẫu đã siêu lọc.

Tỷ lệ của các monosacarit có trong polysacarit của chiết xuất tảo theo sáng chế được xác định theo phương pháp Kamerling (Kamerling *et al.*, 1975) được cải tiến bởi Montreuil (Montreuil *et al.*, 1986). Để định tính và định lượng các monosacarit, cần thủy phân polyme này bằng metanol, sao chỉ thu được các monome. Sau đó, các gốc glycosit được trimetylsilyl hóa để làm cho các chất này dễ bay hơi. Do đó, các gốc này được định tính và định lượng bằng phương pháp sắc ký khí ở dạng O-trimetylsilyl-metylglycosit.

Các thuốc thử được sử dụng bao gồm dung dịch metanol/HCl 3N (Supelco); bạc cacbonat; myo-inositol; pyridin; thuốc thử Sylon BFT (BSTFA +TMCS 99:1) (Supelco); và điclometan.

Quy trình phân tích được thực hiện như sau: 400µg chiết xuất tảo theo sáng chế được điều chế như nêu trên và 50µg myo-inositol được nạp vào bể khô trong sự có mặt của 500µL hỗn hợp axit hydrocloric 3N/metanol (Supelco) trong 4 giờ ở nhiệt độ 100°C. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ phòng, metanolysat được trung hòa bằng bạc cacbonat. Các mẫu được ly tâm trong 15 phút ở tốc độ bằng 3000 vòng/phút và dịch nổi được làm bay hơi trong dòng khí nitơ. Sau đó, các hợp chất được hòa tan trong 80µL pyridin và ủ trong 25 phút ở nhiệt độ 80°C với 80µL sylon (BSTFA:TMCS, 99:1, Supelco). Sau khi làm bay hơi từ từ các thuốc thử còn dư trong dòng khí nitơ, các trimetylsilyl-metylglycosit được hòa tan trong 500µL điclometan, sau đó tiêm vào hệ thống sắc ký khí (tiêm vào cột, bộ phận phát hiện FID: ion hóa ngọn lửa). Khí mang là nitơ. Cột loại HP-

5MS (30m, được kính trong bằng 0,25 mm) là cột không phân cực. Chương trình tăng nhiệt độ như sau: 120°C được duy trì trong 1 phút, sau đó tốc độ tăng nhiệt độ bằng 1,5°C/phút lên đến 180°C, tiếp theo tốc độ tăng nhiệt độ bằng 2°C/phút lên đến 200°C.

Mỗi monosacarit được định tính bằng cách so sánh thời gian lưu với chuẩn nội, là các monosacarit tinh khiết được xử lý trong cùng điều kiện. Hệ số đáp ứng được tính toán cho mỗi monosacarit so với chuẩn nội để xác định tỷ lệ phần trăm của mỗi monosacarit có trong polysacarit của chiết xuất tảo theo sáng chế.

Các kết quả thu được được thể hiện trên Bảng 1 và Fig.3.

Bảng 1: Tỷ lệ phần trăm khối lượng của các thành phần của chiết xuất tảo theo sáng chế sau khi phân tích các dẫn xuất được trimetylsilyl hóa bằng phương pháp sắc ký khí, tính theo tổng khối lượng của chiết xuất tảo; trong đó Ara: Arabinoza ; Gal: Galactoza ; Glc: Glucoza ; Xyl: Xyloza ; Man: Mannoza ; Rha: Rhamnoza, GlcA: Axit glucuronic.

Mẫu	% khối lượng của dịch siêu lọc	Hiệu suất siêu lọc	% khối lượng của chiết xuất thô
Ara	0,6	20,50%	0,123
Gal	1,3	20,50%	0,267
Glc	0,1	20,50%	0,021
Xyl	2,45	20,50%	0,502
Man	0,45	20,50%	0,092
Rha	39,6	20,50%	8,118
GlcA	12,9	20,50%	2,645

Ví dụ 4: Đánh giá hoạt tính điều hòa miễn dịch của chiết xuất tảo theo sáng chế

Tác dụng của chiết xuất tảo theo sáng chế được thử nghiệm trên tế bào biểu mô ruột lợn đã biệt hóa IPEC-1.

Các tế bào biểu mô ruột lợn (IPEC-1 - Intestinal Porcine Epithelial Cell-1) là tế bào hồng tràng của lợn con chuyển gen tự nhiên.

Trước tiên, mật độ tối ưu của các tế bào IPEC-1 được nạp vào các giếng của đĩa P6 để đạt được sự hợp lưu trong 3 ngày được xác định. Mật độ tối ưu được xác định bằng $0,2 \times 10^5$ tế bào/cm².

Sau đó, liều lượng không độc tối đa của chiết xuất tảo theo sáng chế được nghiên cứu để xác định liều lượng tối đa không ức chế tăng sinh tế bào IPEC-1.

Hai chiết xuất tảo theo sáng chế được điều chế theo Ví dụ 1 (được gọi tắt là EA1 và EA2).

Chiết xuất tảo thứ ba EA3 cũng được điều chế theo Ví dụ 1, nhưng được tiếp tục tinh chế.

Để tinh chế, chiết xuất EA3 được siêu lọc bằng bộ lọc siêu nhỏ PALL có các lỗ lọc có kích cỡ bằng 1kDa. Sau đó, chiết xuất này được đông khô.

Ba chiết xuất này được hòa tan trong 28mL môi trường DMEM/F12 đầy đủ. Sau đó, 50mL dung dịch 1% được điều chế, tức là 0,5g chiết xuất được hòa tan trong 50mL. Sau đó, các dung dịch này được khử trùng bằng cách lọc qua màng lọc có kích cỡ 0,2 μ m.

Sau đó, các dung dịch này được pha loãng trong các ống Falcon dung tích 50mL để thử nghiệm các chiết xuất tảo ở nồng độ khác nhau như được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

Điều chế dung dịch chứa chiết xuất tảo					
	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0,01%
Độ pha loãng mong muốn		2	5	2	5
Độ pha loãng thu được		2	5	2	5
Thể tích của dung dịch pha loãng ở bước trước đó		19	9,5	18	6
Thể tích môi trường	48	19	37,8	18	24
Tổng thể tích	48	38	47,3	36	30
Thể tích còn lại	29,0	28,5	29,3	30,0	30,0

Sau đó, các tế bào được điều chế bằng quy trình sau:

1. Điều chế 28mL hỗn dịch tế bào ở mật độ bằng $0,07 \times 10^6$ tế bào/mL đối với mỗi liều lượng cần thử nghiệm tức là $1,96 \times 10^6$ tế bào/liều lượng,
2. Trypsin hóa,
3. Các tế bào được rửa bằng PBS không chứa Ca và Mg,
4. Kết tủa ATV Trypsin (2mL/F175, hoặc 0,4mL/giếng P6) để phân ly và phân tách các tế bào,
5. Ủ trong 5 phút ở nhiệt độ 37°C,
6. Hòa tan trong môi trường nuôi cấy,

7. Đếm bằng xanh Trypane,
8. Chuẩn bị 6 ống Falcon dung tích 15 mL chứa 2,23 mL,
9. Ly tâm, và
10. Hòa tan các hạt tế bào từ mỗi ống vào 28mL mỗi dung dịch chiết xuất cần thử nghiệm và chuyển vào ống Falcon dung tích 50 mL.

Quá trình nuôi cấy được thực hiện bằng cách bổ sung 3mL/giếng mỗi hỗn dịch trong các đĩa, sau đó ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ.

Thành phần của các giếng khác nhau được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3

Liều lượng g/100mL	Thể tích mL/giếng	Lượng chiết mg/giếng	Mật độ tế bào trên 1 giếng	Lượng chiết/tế bào		
				mg	µg	ng
0	3	0	$2,1 \times 10^5$	0	0,0000	0,0
0,01	3	0,3	$2,1 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-6}$	0,0014	1,4
0,05	3	1,5	$2,1 \times 10^5$	$7,1 \times 10^{-6}$	0,0071	7,1
0,1	3	3	$2,1 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-5}$	0,0143	14,3
0,5	3	15	$2,1 \times 10^5$	$7,1 \times 10^{-5}$	0,0714	71,4
1	3	30	$2,1 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-4}$	0,1429	142,9

Sau đó, các giếng nuôi cấy được quan sát và chụp ảnh tùy ý.

Các tế bào được thu nhận và đếm theo quy trình sau:

1. Chuẩn bị đĩa 6 giếng,
2. Loại bỏ dịch nổi,
3. Rửa bằng 1mL PBS không chứa Ca và Mg,
4. Kết tủa 0,4mL/giếng ATV trypsin,
5. Ủ trong 5 phút ở nhiệt độ 37°C cho đến khi phân tách các tế bào,
6. Bổ sung 0,6mL môi trường nuôi cấy,
7. Trộn kỹ, và

8. Sử dụng xanh Trypane Blue ở nồng độ 0,4%, (50 μ L tế bào + 50 μ L xanh Trypane 0,4%), sau đó đếm tế bào bằng huyết cầu kế do Malassez cung cấp ở tổng cộng 100 ô hình chữ nhật.

Các kết quả trên Fig.4-Fig.6 cho thấy liều lượng không độc tối đa của EA1 và EA2 bằng 0,1% và liều lượng không độc tối đa của EA3 bằng 0,5%.

Các tế bào IPEC-1 đã biệt hóa được kích thích bằng chiết xuất tảo EA1, EA2 và EA3 theo sáng chế trong 4 giờ ở nhiệt độ 37°C (khoảng 10 ngày sau khi hợp lưu) ở ngày thứ 15 (D15).

Ba liều lượng (MD (liều lượng tối đa), MD/10, MD/100) được thử nghiệm bằng cách so sánh với LPS của vi khuẩn (mẫu đối chứng dương) và môi trường biệt hóa (mẫu đối chứng âm).

Dung dịch chứa chiết xuất tảo EA1, EA2 và EA3 theo sáng chế thu được bằng phương pháp theo ví dụ 1 được điều chế với 0,1% môi trường DMEM/F12 đầy đủ. Cụ thể, 0,02g chiết xuất được hòa tan trong 20 mL môi trường và các dung dịch được khử trùng bằng cách lọc qua màng lọc có kích cỡ 0,2 μ m. Sau đó, các dung dịch được pha loãng liên tiếp như được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4

Điều chế dung dịch chứa chiết xuất tảo			
	MD	MD/10	MD/100
	0,1%	0,01%	0,001%
Độ pha loãng mong muốn		10	10
Độ pha loãng thu được		10	10
Thể tích của dung dịch pha loãng ở bước trước đó		2	2
Thể tích môi trường		18	18
Tổng thể tích	20	20	20
Thể tích còn lại	18	18	20

Lượng chiết xuất tảo tính trên một tế bào được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5

Liều lượng	Thể tích	Lượng chiết	Mật độ tế bào	Lượng chiết/tế bào		
				mg	μ g	ng
0,001	2	0,02	4,0x10 ⁵	5,0x10 ⁻⁸	0,00005	0,05
0,01	2	0,2	4,0x10 ⁵	5,0x10 ⁻⁷	0,0005	0,5
0,1	2	2	4,0x10 ⁵	5,0x10 ⁻⁶	0,0050	5,0

Sau đó, dung dịch LPS (SIGMA O111:B4) được điều chế (liều lượng: $50\text{ng}/10^5$ tế bào).

200ng LPS/giếng với thể tích bằng 2 mL được bổ sung vào. Dung dịch LPS ở các nồng độ khác nhau được điều chế được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6

Điều chế dung dịch LPS			
	1mg/mL	1000ng/mL	100ng/mL
Độ pha loãng mong muốn		1000	10
Độ pha loãng thu được		1000	200
Thể tích của dung dịch pha loãng ở bước trước đó		0,001	0,1
Thể tích môi trường	1	0,999	19,9
Tổng thể tích	1	1000	20,0
Thể tích còn lại (mL)	1	1	20

Trong các đĩa, 2mL môi trường cần thử nghiệm được bổ sung vào mỗi bộ lọc và 3mL. Sau đó, toàn bộ hỗn hợp được ủ trong 4 giờ ở nhiệt độ 37°C trong điều kiện 5% CO_2 .

Sau đó, các tế bào IPEC-1 đã được xử lý được thu nhận để phân tích theo quy trình sau:

1. Các giếng được rửa hai đến ba lần bằng 1mL nước muối sinh lý,
2. Các tế bào được hòa tan trong 350 μL dung dịch đệm RA1 (Macherey-Nagel kit), và
3. Chuyển vào các ống Eppendorf đánh số từ từ 1 đến 15.

Sau đó, các ARN được chiết tách bằng kit Macherey-Nagel NucleoSpin ARN II, Ref 740955,250, Batch 1211/004 theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Sau đó, ARN thu được được phiên mã thành ADN bằng phản ứng phiên mã ngược theo quy trình sau:

1. Đối mỗi mẫu, thể tích cần để xử lý 1 μg được tính toán,
2. Bổ sung thể tích này vào mỗi giếng của băng được đặt trên khay lạnh,
3. Bổ sung nước QSP 9 μL theo thể tích yêu cầu,

4. Bổ sung 1,3 μ L oligo dT bắt cặp 100 μ M mẫu 3154325 Eurogentec,
5. Ủ trong 10 phút ở nhiệt độ 65°C trên hệ thống GeneAmp PCR 9700 (USER Khalid),
6. Trong quá trình ủ, điều chế hỗn hợp trong ống hình nón dung tích 1,5 mL (đối với một mẫu) trên nước đá:
 - i. 4 μ L dung dịch đệm 5X,
 - ii. 2 μ L dNTP 20 mM (Eurogentec),
 - iii. 1,9 μ L nước milliQ,
 - iv. Ở thời điểm cuối, bổ sung 0,8 μ L enzym MuMLV 25U/ μ L (ME-0125-400) (Eurogentec),
7. Trên mỗi mẫu bổ sung 8,7 μ L hỗn hợp đến thể tích cuối cùng bằng 20 μ L,
8. Đặt băng lên khay lạnh,
9. Ủ trong 90 phút ở nhiệt độ 37°C để polyme hóa và 5 phút ở nhiệt độ 93°C để bất hoạt enzym ở thời điểm kết thúc phản ứng trên hệ thống GeneAmp PCR 9700, và
10. Bảo quản lạnh đông ở nhiệt độ -20°C trong hộp ADN(1)MO.

Sau đó, các mẫu được phân tích bằng phương pháp PCR định lượng (phần mềm kiểm định một biến ANOVA, độ khác biệt được xác định bằng phép kiểm định phi tham số Dunnet).

Tác dụng của chiết xuất EA1 đến mức độ biểu hiện của IL8, TNF- α , CCL20, IL6, IL1- α , IL1- β , PPAR γ và IL12p35 được thử nghiệm.

Tác dụng của chiết xuất EA2 và EA3 đến mức độ biểu hiện của IL8, TNF- α và CCL20 được thử nghiệm. Các kết quả được thể hiện trên Fig.7-Fig.14.

Các chiết xuất này làm tăng mức độ biểu hiện của ARN thông tin của các cytokin khác nhau được thử nghiệm.

Hoạt tính kích thích miễn dịch của chiết xuất tảo theo sáng chế cũng được đánh giá bằng cách nghiên cứu hoạt tính kích thích các yếu tố miễn dịch bằng phương pháp ELISA trên tế bào IPEC-1 đã biệt hóa.

Hai kit có bán trên thị trường được sử dụng là bộ kit porcine Duo CXCL8/IL8 (mã số: DY535) và bộ kit porcine Duo TNF- α (mã số: DY690B) do R&D Systems cung cấp. Cả hai kit này được thực hiện theo cùng quy trình bằng cách sử dụng kháng thể bắt giữ, kháng thể, hệ thống phát hiện và các protein chuẩn đặc hiệu với mỗi interleukin.

Quá trình nuôi cấy tế bào và ủ với chiết xuất EA1 và EA3 để sản sinh các cytokin

Các tế bào IPEC-1 ($0,25 \times 10^5$ tế bào/cm²) được nuôi cấy trên các đĩa nuôi cấy trong 3 ngày cho đến khi thu được sự hợp lưu tế bào. Tiếp theo, huyết thanh bào thai bê được thay bằng dexamethason ở nồng độ bằng 10^{-7} M để biệt hóa tế bào trong thời gian từ 10 đến 14 ngày. Ba giếng nuôi cấy được ủ trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C trong sự có mặt của chiết xuất EA1 và EA3. Các mẫu đối chứng là các mẫu nuôi cấy tế bào không chứa chiết xuất tảo. Các dịch nổi nuôi cấy nằm trên và nằm dưới các đĩa nuôi cấy được thu nhận và bảo quản ở nhiệt độ -80°C trong ống Eppendorf cho đến khi thử nghiệm.

Phân tích hàm lượng của IL8 và TNF- α bằng phương pháp ELISA

Các kháng thể bắt giữ (kháng thể của chuột kháng IL-8 hoặc kháng TNF- α) được pha loãng đến tỷ lệ bằng 1/180 trong PBS được cố định ở lượng bằng 100 μ L/giếng qua đêm ở nhiệt độ phòng. Ba quy trình rửa được thực hiện để loại bỏ các kháng thể không gắn kết bằng 400 μ L/giếng PBS chứa 0,05% Tween (dung dịch đệm rửa). Tiếp theo, bước bão hòa được thực hiện để phong bế các vị trí gắn kết không đặc hiệu, nhờ đó ngăn ngừa được sự gắn kết của các protein cần thử nghiệm với chất dẻo. Cụ thể, 300 μ L/giếng dung dịch đệm PBS chứa 1% albumin huyết thanh bò (Bovine Serum Albumin - BSA) được bổ sung vào. Các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó rửa ba lần với 400 μ L/giếng dung dịch đệm rửa. Các protein chuẩn (IL8 tái tổ hợp và TNF- α tái tổ hợp) được pha loãng hai lần bằng dung dịch đệm PBS chứa 1% BSA để thu được các nồng độ theo thứ tự 4000, 2000, 1000, 500, 250, 12 pg/mL. Thể tích của 100 μ L dịch nổi tinh khiết và mẫu protein chuẩn được bổ sung vào mỗi giếng, sau đó ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa ba lần với 400 μ L/giếng dung dịch đệm, các đĩa được ủ trong sự có

mặt của 100 μ L/giếng các kháng thể phát hiện được bắt cặp với biotin được pha loãng đến tỷ lệ bằng 1/180 trong dung dịch đệm pha loãng chứa 2% huyết thanh dê đã được loại bỏ thể. Sau khi ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng, các đĩa được rửa ba lần với dung dịch đệm rửa, sau đó ủ với 100 μ L phức hợp Streptavidin-HRP trong 20 phút ở nhiệt độ phòng tránh ánh sáng. Sau khi rửa ba lần bằng dung dịch đệm rửa, các giếng được ủ với 100 μ L cơ chất (thể tích/thể tích thuốc thử A và B) trong 20 phút ở nhiệt độ phòng trong bóng tối. Phản ứng HRP-cơ chất được dừng bằng 50 μ L/giếng dung dịch dừng và mật độ quang (OD - optical density) được đo ở bước sóng 450nm bằng máy ELISA do Labsystems Multiskan RC cung cấp.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.15 và Fig.16.

Các chiết xuất tảo theo sáng chế có tác dụng làm tăng mức độ biểu hiện của các cytokin được thử nghiệm khác nhau.

Do đó, tác dụng kích thích miễn dịch của chiết xuất tảo theo sáng chế được kiểm chứng bằng cách sử dụng chiết xuất tảo này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chiết xuất tảo thuộc bộ Rong cải biển (*Ulva*les), cụ thể chiết xuất tảo lục thuộc chi Rong cải biển (*Ulva*), chứa polysacarit dạng polyanion được sulfat hóa và không được sulfat hóa có khối lượng phân tử nhỏ hơn hoặc bằng 50kDa, không bao gồm polysacarit dạng polyanion được sulfat hóa và không được sulfat hóa có khối lượng phân tử được xác định bằng phương pháp siêu lọc lớn hơn 50kDa, sử dụng để điều hòa đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật.
2. Chiết xuất tảo để sử dụng theo điểm 1, trong đó polysacarit này chứa mannoza và/hoặc arabinoza, tốt hơn nếu polysacarit này chứa mannoza.
3. Chiết xuất tảo để sử dụng theo điểm 2, trong đó polysacarit này chứa ít nhất 0,005% khối lượng mannoza và/hoặc ít nhất 0,005% khối lượng arabinoza, tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo.
4. Chiết xuất tảo để sử dụng theo điểm 3, trong đó polysacarit này chứa mannoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,50% và/hoặc arabinoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 0,5% khối lượng tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo.
5. Chiết xuất tảo để sử dụng theo theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó polysacarit này còn chứa galactoza; glucoza; rhamnoza; xyloza; và axit glucuronic.
6. Chiết xuất tảo để sử dụng theo điểm 5, trong đó polysacarit này chứa galactoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,05% đến 0,5% khối lượng; glucoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,005% đến 0,5% khối lượng; rhamnoza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 2% đến 15% khối lượng; xyloza với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,1% đến 1% khối lượng; và axit glucuronic với hàm lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 7% khối lượng; tính theo tổng khối lượng chất khô có trong chiết xuất tảo.
7. Chiết xuất tảo thuộc bộ Rong cải biển (*Ulva*les), cụ thể chiết xuất tảo lục thuộc chi Rong cải biển (*Ulva*), sử dụng để điều hòa đáp ứng miễn dịch ở người hoặc động vật; được điều chế bằng phương pháp bao gồm các bước sau: a) rửa tảo và làm sạch cát; b) nghiền tảo; c) phân tách pha rắn của hỗn hợp tảo đã nghiền khỏi pha lỏng của nó; d) làm

trong pha lỏng; e) siêu lọc dịch trong thu được ở bước d) bằng màng lọc có kích cỡ 50kDa hoặc nhỏ hơn; và f) cô dịch lọc thu được ở bước e), sau đó làm khô.

8. Chiết xuất tảo để sử dụng theo theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chiết xuất tảo này có tác dụng biểu hiện các phân tử liên kết và chemokin, tốt hơn nếu IL-8 và/hoặc IL-1 α và/hoặc IL1- β và/hoặc IL-6 và/hoặc TNF- α và/hoặc CCL20.

9. Chiết xuất tảo để sử dụng theo theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, dưới dạng chế phẩm bổ sung kích thích miễn dịch.

10. Chiết xuất tảo để sử dụng theo theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chiết xuất tảo này được bào chế thành dược phẩm hoặc thực phẩm.

11. Chiết xuất tảo để sử dụng theo điểm 10, trong đó chiết xuất tảo này được sử dụng ở liều lượng trên người nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mg/kg hoặc ở liều lượng trên động vật nằm trong khoảng từ 1 đến 200mg/kg.

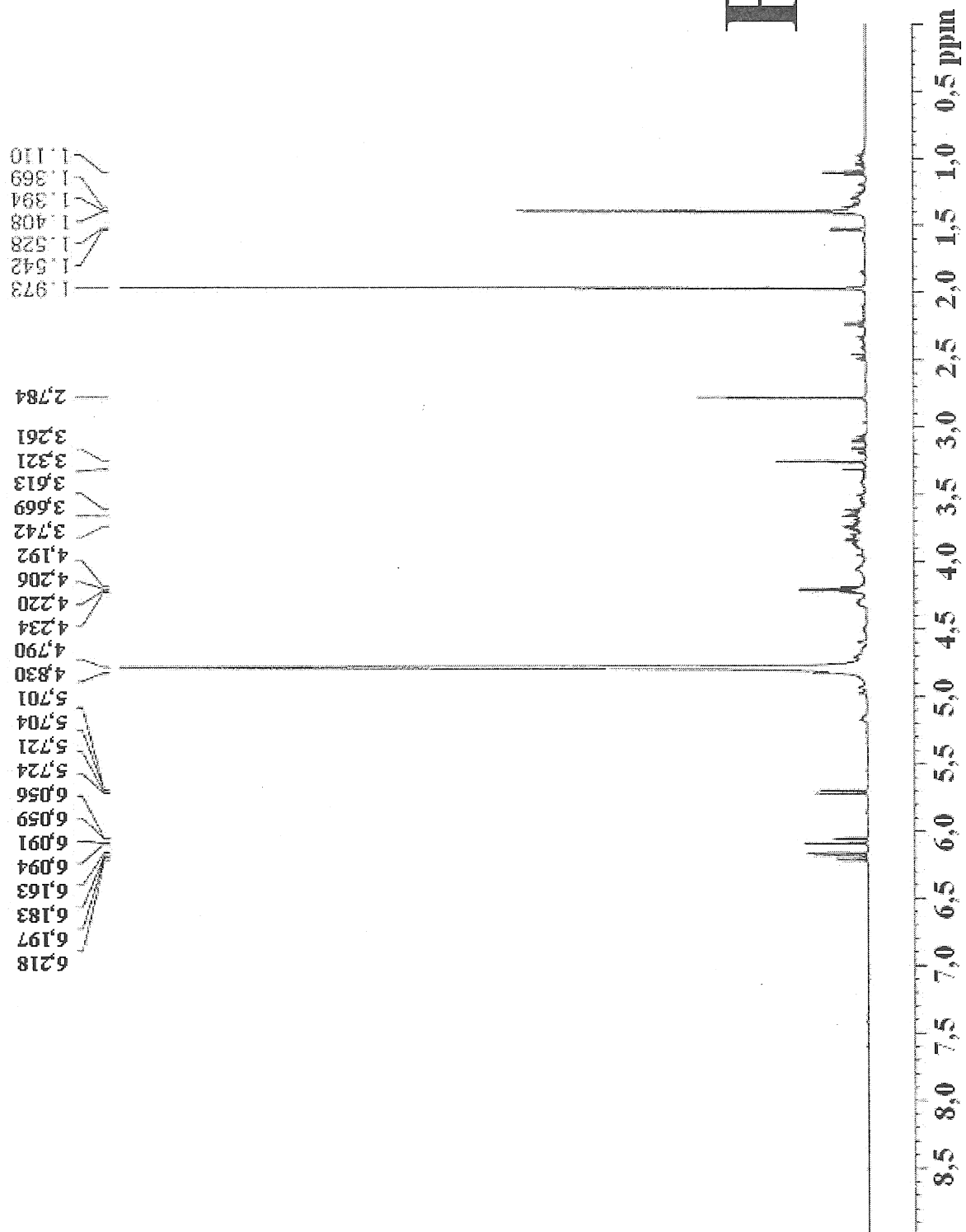
12. Chiết xuất tảo để sử dụng theo theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó polysacarit dạng polyanion được sulfat hóa và không được sulfat hóa có khối lượng phân tử nhỏ hơn hoặc bằng 15kDa.

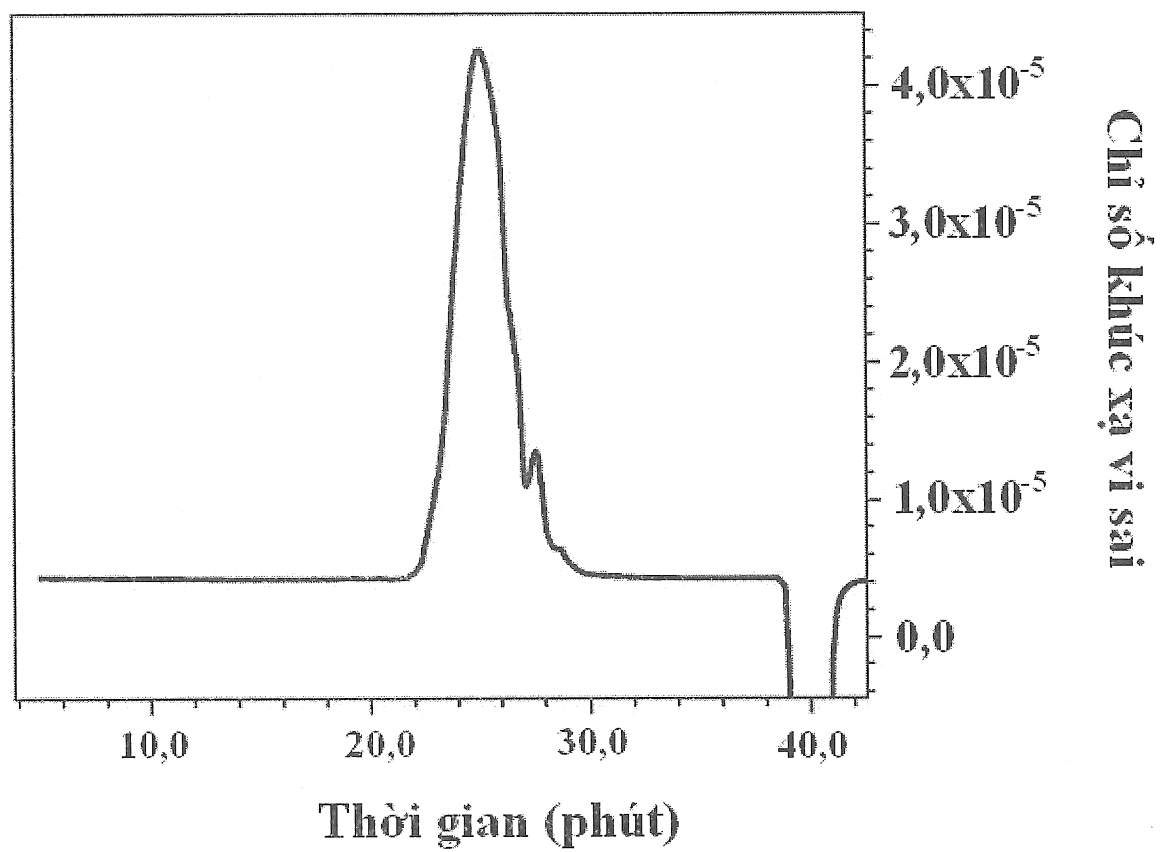
13. Chiết xuất tảo để sử dụng theo theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó chiết xuất tảo này được điều chế bằng phương pháp bao gồm các bước sau: a) rửa tảo và làm sạch cát; b) nghiền tảo; c) phân tách pha rắn của hỗn hợp tảo đã nghiền khỏi pha lỏng của nó; d) làm trong pha lỏng; e) siêu lọc dịch trong thu được ở bước d) bằng màng lọc có kích cỡ 50kDa hoặc nhỏ hơn; và f) cô dịch lọc thu được ở bước e), sau đó làm khô;

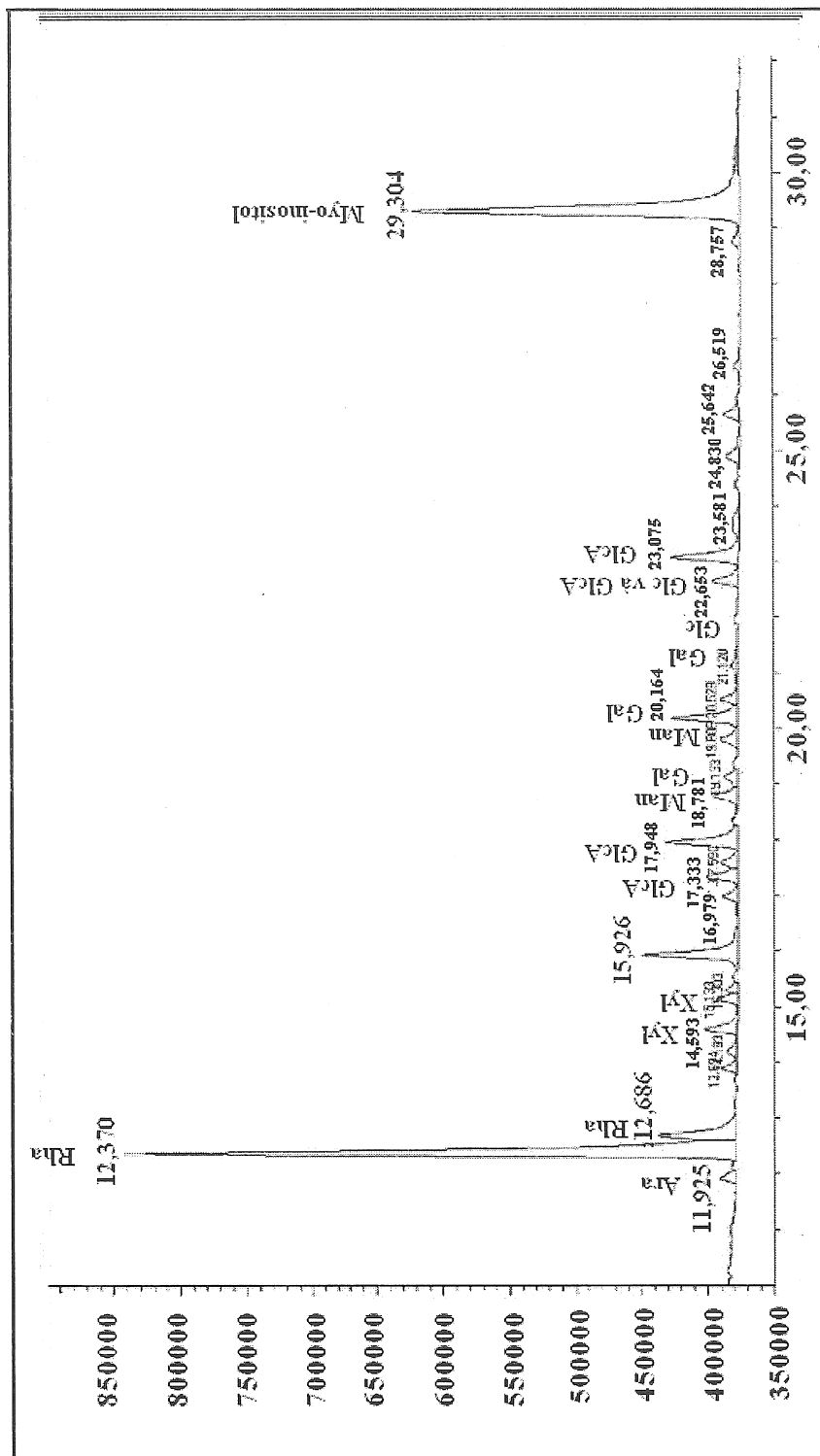
14. Chiết xuất tảo để sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm 7 hoặc 13, trong đó dịch trong thu được ở bước d) của phương pháp điều chế được siêu lọc qua màng có kích cỡ bằng 15kDa hoặc nhỏ hơn.

15. Chiết xuất tảo để sử dụng theo theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7, 13 hoặc 14, trong đó chiết xuất tảo thu được ở bước f) của phương pháp điều chế được tinh chế, tốt hơn nếu bằng phương pháp siêu lọc.

Fig.1



**Fig.2**



Aba: Arabinoza; Gal: Galactoza; Glc: Glucoza; Xyl: Xyloza; Man: Mannoza; Rha: Rhamnoza; GlcA: Axit glucuronic

Fig.3

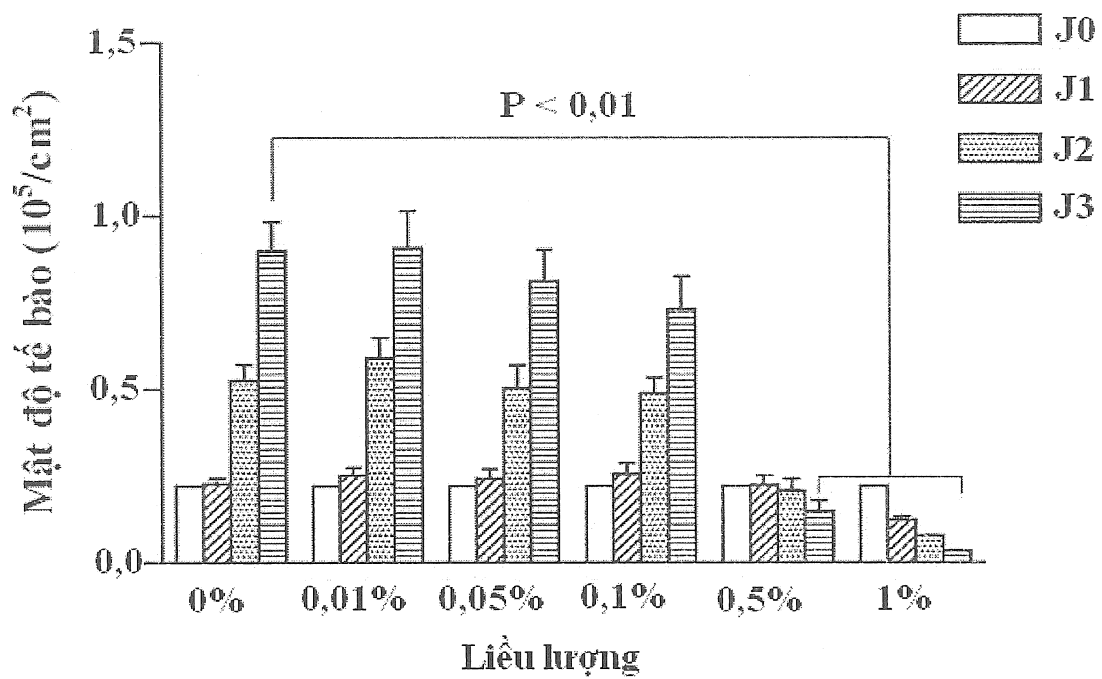


Fig.4

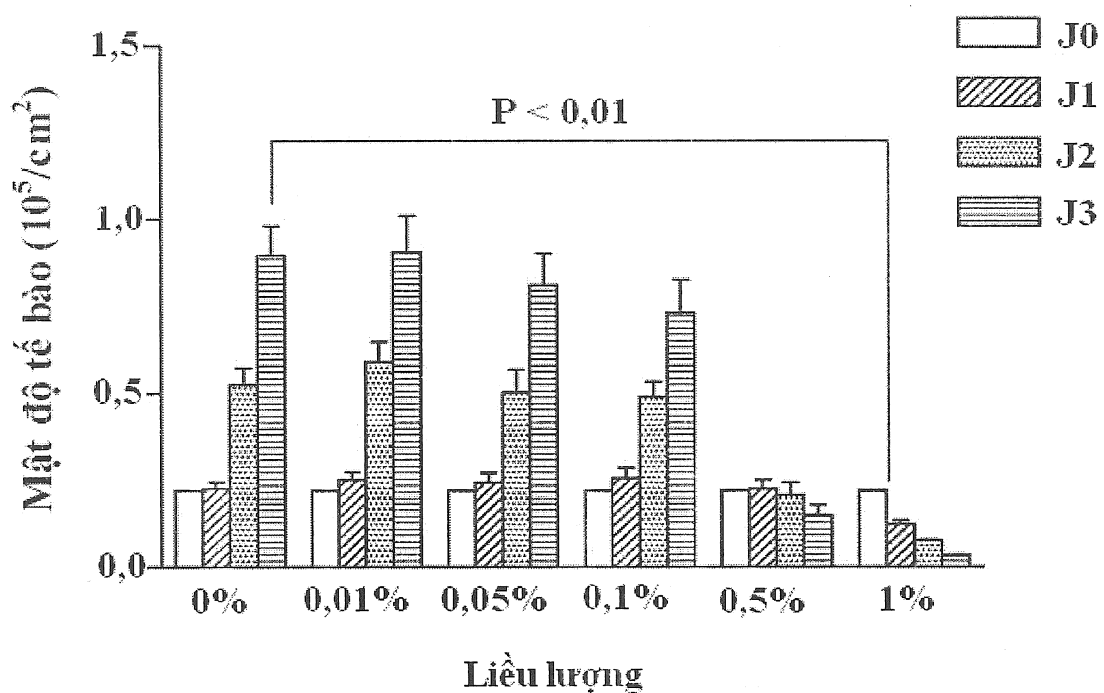


Fig.5

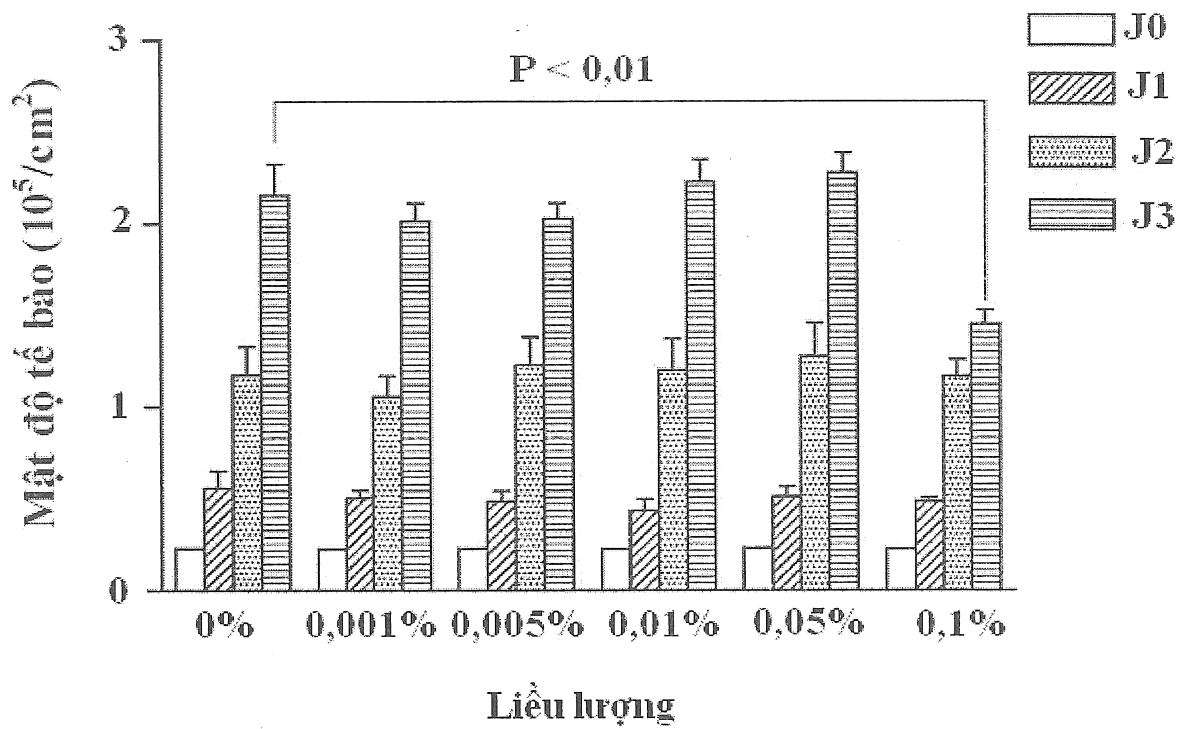


Fig.6

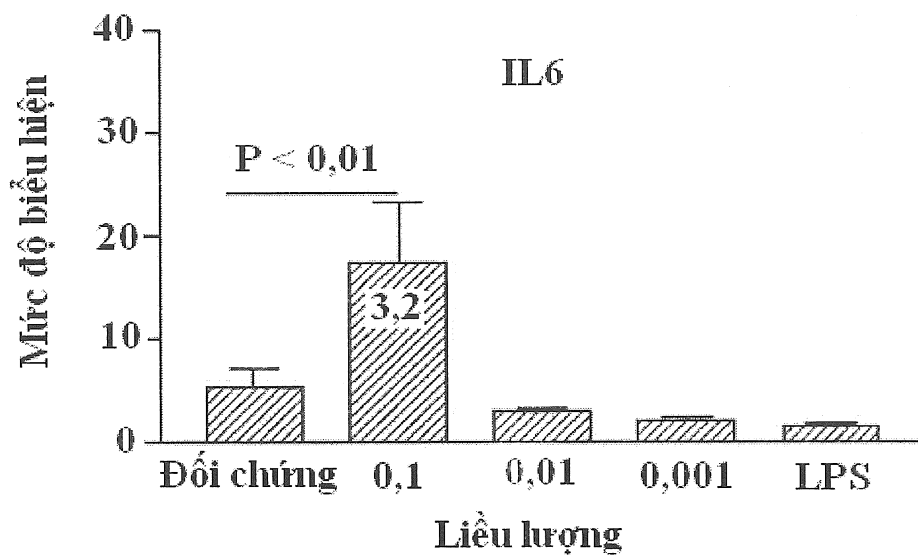


Fig.10

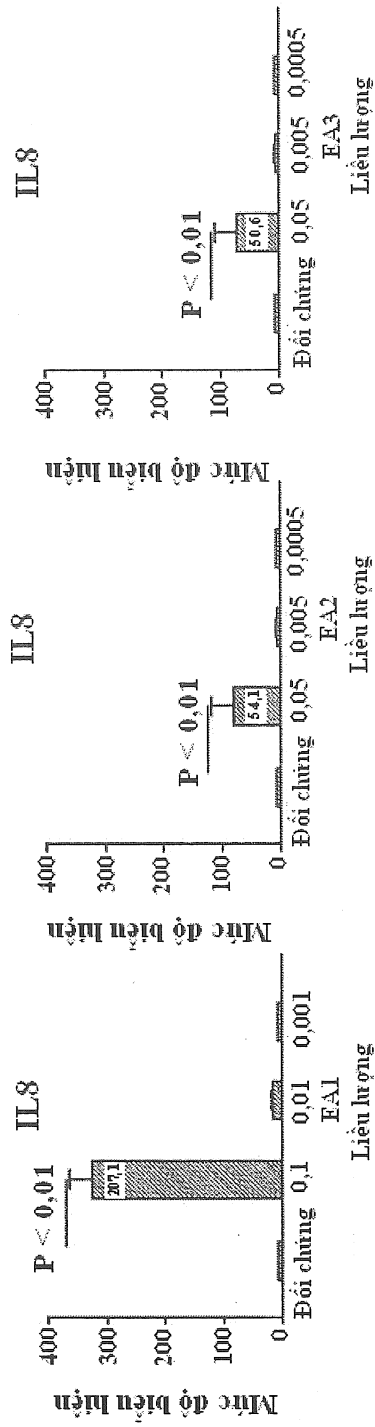


Fig.7

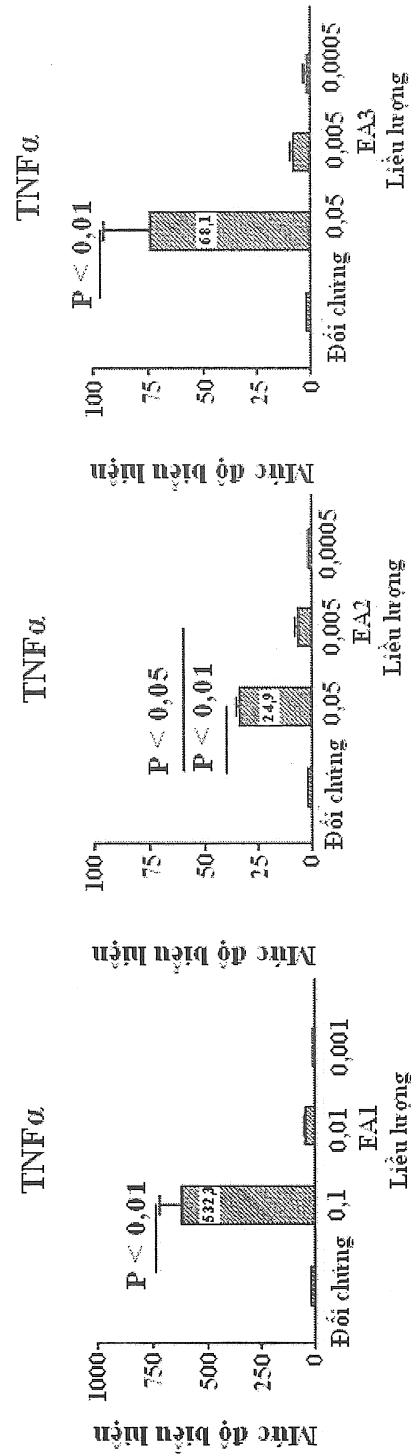
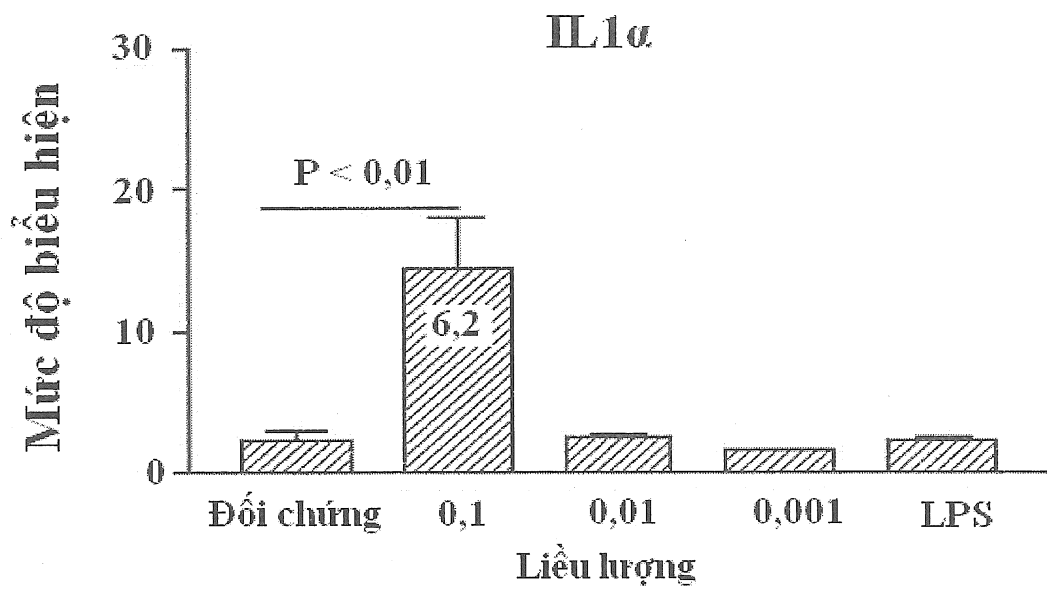
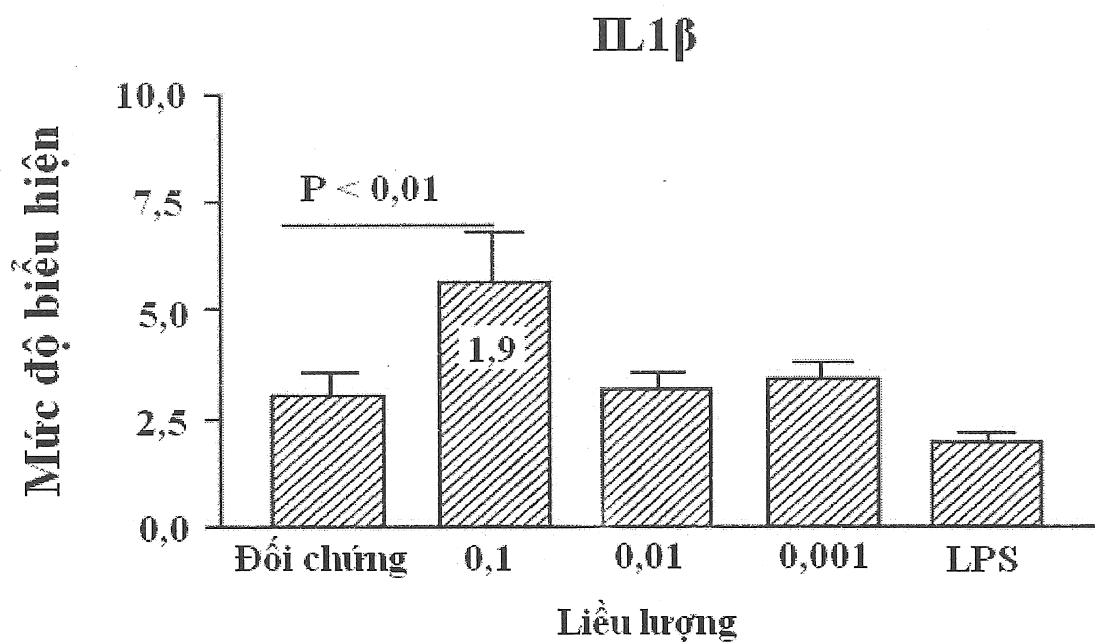
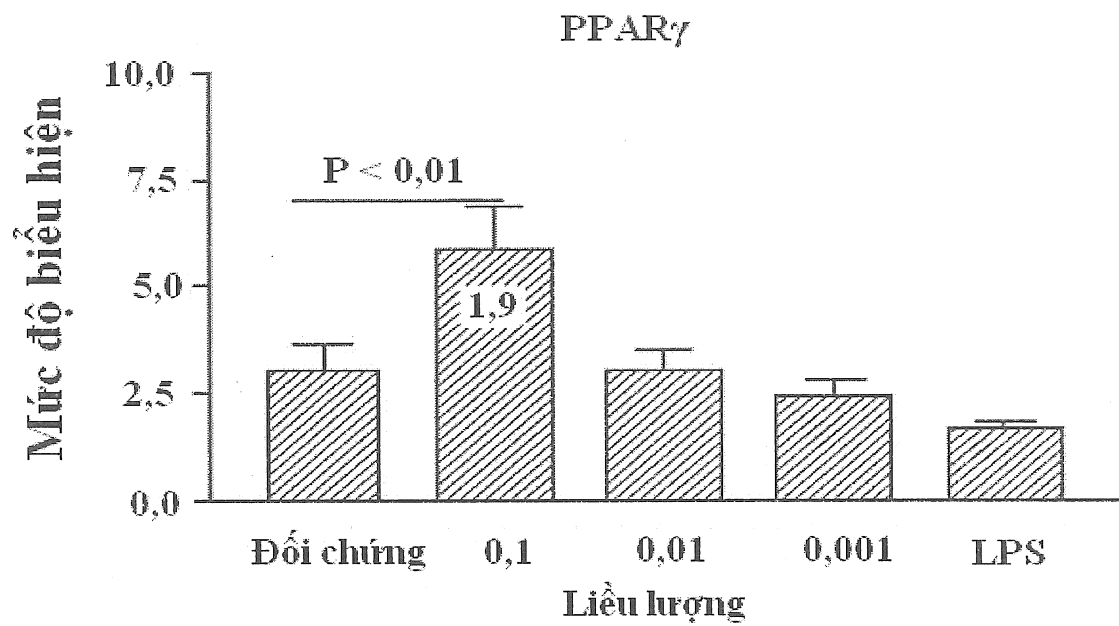
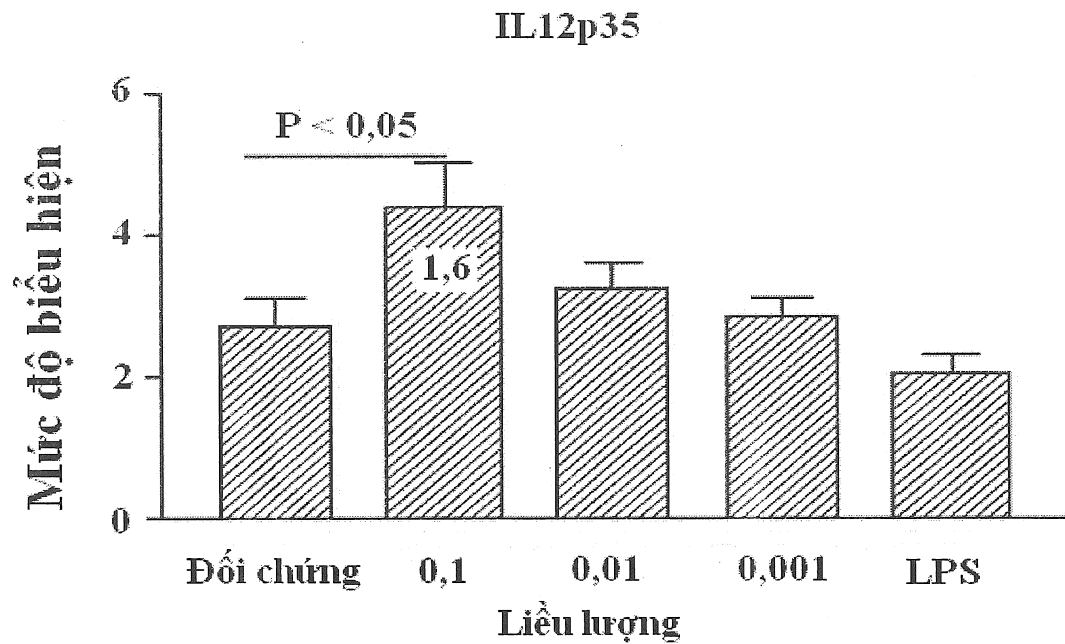


Fig.8

**Fig.11****Fig.12**

**Fig.13****Fig.14**

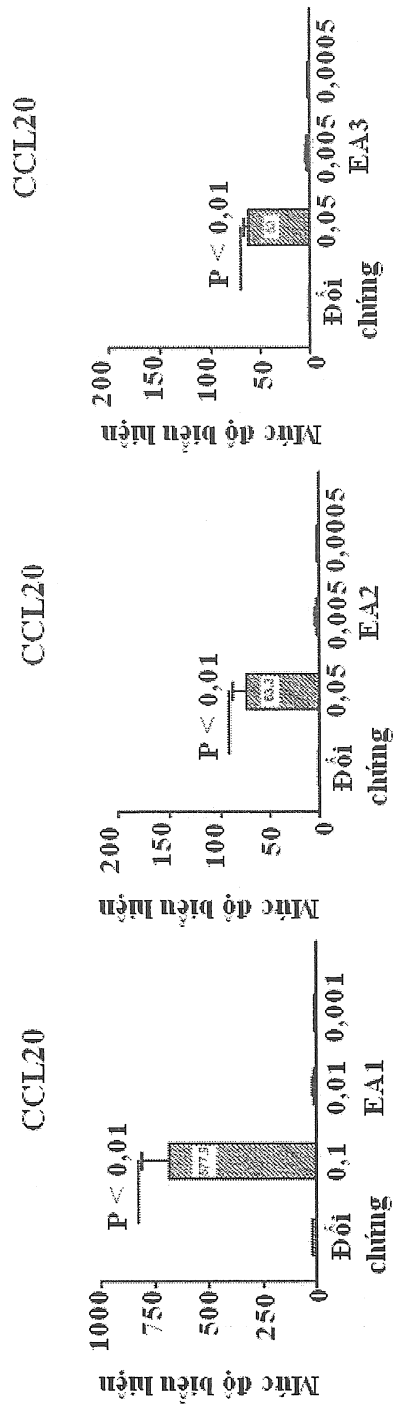


Fig.9

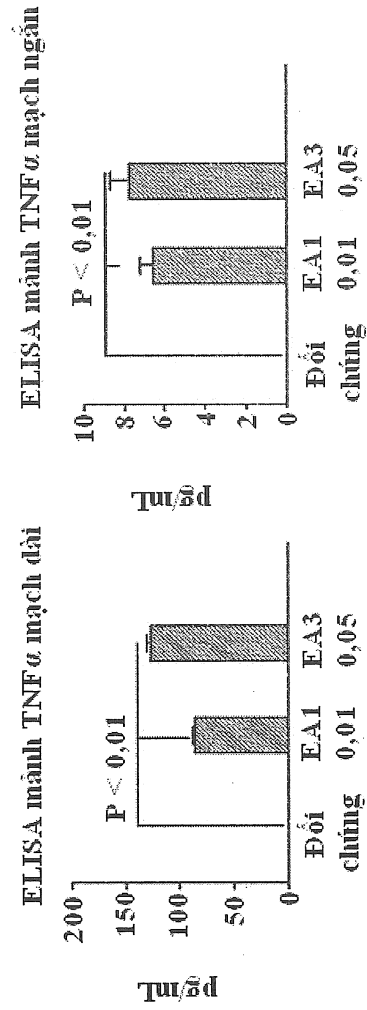


Fig.15

