



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0037414

(51)^{2020.01} A61K 36/02; A61K 31/715; A61P 31/12; (13) B
A61L 15/58; A61P 11/00; A23L 33/135;
A61K 9/00

-
- (21) 1-2020-01507 (22) 30/08/2018
(86) PCT/US2018/048918 30/08/2018 (87) WO 2019/046621 07/03/2019
(30) 62/552,045 30/08/2017 US
(45) 27/11/2023 428 (43) 25/06/2020 387ASC
(73) FAR EAST BIO-TEC CO., LTD. (TW)
13F, No.3, Yuan Chiu Street, Nan-Gang District, Taipei City, 115, Taiwan
(72) CHIUH, Chuang-Chun (TW); SHIH, Shin-Ru (TW); CHEN, Yi-Hsiang (TW);
CHANG, Gi-Kung (TW); CHEN, Jing-Yun (TW); LIAO, Ya-Chun (TW); HUANG,
Xin-Wen (TW); CHEN, Wei (TW).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)
-

(54) CHẤT CHIẾT ARTHROSPIRA MAXIMA, CHẾ PHẨM DINH DƯỠNG VÀ
DƯỢC PHẨM CHỨA CHẤT CHIẾT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chất chiết *Arthrospira maxima* thể hiện hoạt tính kháng virus với phổ rộng virus, như enterovirus (EV), virus hợp bào hô hấp (RSV), virus herpes ở người (HHV), virus Ebola, virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn (PEDV), và virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV). Cụ thể, sáng chế đề cập đến chất chiết *Arthrospira maxima* được tạo ra từ sinh khối của *A. maxima*. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình điều chế chất chiết *A. maxima*, chế phẩm dinh dưỡng, dược phẩm và băng có tính tương thích sinh học chứa chất chiết *A. maxima* này. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp ức chế quá trình sao chép của virus trong tế bào chủ.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất chiết vi khuẩn lam, quy trình điều chế chất chiết này và sử dụng chất chiết này. Cụ thể, chất chiết vi khuẩn lam thể hiện hoạt tính kháng virus với phổ rộng virus, như enterovirus (EV), virus hợp bào hô hấp (RSV), virus Herpes ở người (HHV), virus Ebola, virus gây dịch tiêu chảy ở lợn (PEDV), và virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi khuẩn lam là vi khuẩn có kích thước hiển vi được phát hiện trong đất và nước ngọt, nước lợ hoặc nước mặn. Vi khuẩn lam thực hiện quá trình quang hợp tạo oxy. Do chúng là sinh vật quang hợp, vi khuẩn lam thủy sinh thường được gọi là tảo xanh. Hiện nay, có hơn 2000 loài đã được mô tả thuộc ngành vi khuẩn lam. Vi khuẩn lam đã được xác định là một nguồn hoạt chất sinh học dồi dào với các hoạt tính chống virus, kháng khuẩn, kháng nấm và chống ung thư. Các hợp chất phân lập được từ vi khuẩn lam thuộc các nhóm polypeptit, amit, alkaloid, axit béo, indol, và lipopeptit. Đã có nhiều nỗ lực để nhận biết các phân đoạn chất chiết hoặc các hợp chất hoạt tính với các tác dụng trị liệu mong muốn.

Spirulina được dùng để chỉ sản phẩm bổ sung cho chế độ ăn được làm từ sinh khối khô của *Arthrospira platensis* và *A. maxima*. *A. maxima* (hoặc *Spirulina maxima*) được tìm thấy ở các vùng nhiệt đới hoặc cận nhiệt đới nơi có các vùng nước mặn và nước kiềm. Ví dụ, nó phổ biến ở hồ Chad, châu Phi và hồ Texcoco, Mexico. Hai loài này đã từng được phân loại vào chi *Spirulina*. Mặc dù theo nguyên tắc phân loại hiện nay, việc sử dụng tên *Spirulina* cho hai chủng này không phù hợp, và có thỏa thuận rằng chi *Arthrospira* bao gồm *A. platensis* và *A. maxima*, vì thế nguyên tắc phân loại lỗi thời này đến nay vẫn còn được sử dụng, và các sản phẩm bổ sung cho chế độ ăn được làm từ chúng vẫn thường được gọi bằng tên phổ biến của chúng, spirulina. Spirulina được sử dụng như một nguồn thực phẩm từ thời Aztec cổ đại. Khi được sử dụng làm sản phẩm bổ sung cho chế độ ăn, spirulina thường được cung cấp dưới dạng bột khô giàu protein và polysaccharit và cũng chứa

nhều chất dinh dưỡng thiết yếu, như các vitamin B và chất khoáng dinh dưỡng (ví dụ, sắt và mangan).

Các virus đường ruột - enterovirus (EV) là một chi của các virus ARN mạch đơn, mạch dương mà được đặt tên theo đường lây nhiễm chúng qua ruột non. Các EV đầu tiên được phân loại thành poliovirus, virus Coxsackie A (CA), virus Coxsackie B (CB), và echovirus, dựa trên cơ chế bệnh sinh của chúng. Các EV được xác định sau đó được đặt tên là Enterovirus theo sau là các số đi kèm, chẳng hạn, EV68, EV69, EV70, EV71. Sự bùng phát đầu tiên của Enterovirus ở người typ 71 (EV71) ở Đài Loan diễn ra vào năm 1998, mà gây ra tổng số 405 trường hợp nghiêm trọng và 80 trường hợp tử vong. Tại Trung Quốc, sự bùng phát dịch EV71 năm 2010, đã gây ra hơn 1,7 triệu trường hợp bị nhiễm, với 27000 bệnh nhân có các biến chứng thần kinh nghiêm trọng và 905 trường hợp tử vong. Việc nhiễm EV71 được biết là gây ra bệnh tay, chân và miệng (hand, foot, and mouth disease - HFMD), và trong giai đoạn từ năm 2011 đến 2014, đã có hàng triệu trường hợp mắc bệnh HFMD được báo cáo ở Trung Quốc. Mỗi năm, hàng trăm trẻ em ở Trung Quốc bị chết vì nhiễm EV71. Theo đó, có nhu cầu cấp thiết trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan để cung cấp vaccine, cũng như các dược chất chống EV71 một cách hiệu quả. Tính đến năm 2014, có ba thử nghiệm lâm sàng giai đoạn III đã hoàn thành ở Trung Quốc, trong khi ở Đài Loan và Sinh-ga-po đã hoàn thành một thử nghiệm giai đoạn I. Hiệu quả bảo vệ của vaccine lớn hơn 90% ở HFMD do EV71, và 80% ở các bệnh liên quan đến EV71. Tuy nhiên, EV71 hiện được chia thành bốn kiểu gen (các kiểu gen A, B, C và D) và còn được chia thành 12 dưới kiểu gen (sub-genotype). Vì thế, hiệu quả bảo vệ giữa các loài của vaccine EV71 có nguồn gốc từ một chủng cụ thể với một kiểu gen duy nhất đối với một virus phổ biến khác là không chắc chắn. Theo quan điểm nêu trên, dược chất kháng EV71 hoặc kháng enterovirus phổ rộng để ngăn ngừa và điều trị EV71 là quan trọng.

Virus hợp bào hô hấp, hoặc RSV, là virus hô hấp thông thường mà thường gây ra triệu chứng nhẹ, giống như cảm lạnh. Ở Mỹ, 60% nữ nhi bị nhiễm trong mùa RSV thứ nhất của chúng, và gần như toàn bộ trẻ em sẽ bị nhiễm virus này trong giai đoạn từ 2 đến 3 tuổi. Trong số những người bị nhiễm RSV, 2- 3% trong số đó sẽ bị viêm tiểu phế quản, cần phải nhập viện. Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu tích cực để phát triển vaccine RSV mới, nhưng hiện tại vẫn chưa có vaccine này. Mặt khác, việc điều trị RSV mới chỉ giới

hạn ở các biện pháp hỗ trợ. Do việc phát triển vacxin RSV thương mại vẫn còn khó nắm bắt, nên được chất kháng RSV phổ rộng để ngăn ngừa và điều trị RSV là quan trọng.

Virut Herpes ở người (HHV) là virut ADN mà lây nhiễm ở người bao gồm virut gây bệnh mụn rộp (herpes simplex viruses) (HSV) 1 và 2 (còn được biết là HHV1 và HHV2), virut gây bệnh thủy đậu-zona (VZV hoặc HHV-3), virut Epstein-Barr (EBV hoặc HHV-4), cytomegalovirut ở người (HCMV hoặc HHV-5), virut herpes 6A và 6B ở người (HHV-6A và HHV-6B), virut Herpes 7 ở người (HHV-7), và virut Herpes đi kèm với sacom Kaposi (KSHV hoặc HHV-8). Nhóm virut này được đặc trưng bởi sự lây nhiễm tiềm ẩn và tái phát. Một số được chất kháng virut được biết là cải thiện các triệu chứng đi kèm với việc nhiễm HHV; tuy nhiên, vẫn chưa có được chất có thể loại bỏ HSV từ vị trí tiềm tàng (ví dụ, noron, tế bào T, tế bào B, hoặc bạch cầu đơn nhân).

Virut Ebola thuộc họ Filoviridae được phân loại thuộc bộ Mononegavirales. Các thành viên virut thuộc bộ Mononegavirales là các virut có vỏ bọc chứa hệ gen ARN mạch đơn, mạch âm, dạng thẳng, không phân đoạn. Do tỷ lệ tử vong, khả năng lây truyền từ người sang người cao, và chưa có vacxin hoặc liệu pháp kháng virut hữu hiệu, nên virut Ebola được phân vào loại yếu tố gây bệnh có độ an toàn sinh học mức 4 (BSL-4). Mặc dù việc chủng ngừa vòng bằng vacxin Ebola đã có vẻ có hiệu quả ở mức độ nào đó, nhưng mức độ hiệu quả này không chắc chắn. Ngoài ra, có nhiều chủng virut Ebola khác lưu hành trên khắp châu Phi và sự đột biến gen trên bộ gen RNA của virut cũng khiến cho việc phát triển vacxin hữu hiệu trở nên khó khăn hơn. Vì thế, điều quan trọng là phải phát triển các tác nhân có hoạt tính kháng Ebola để điều trị và ngăn ngừa nhiễm Ebola để chuẩn bị cho các trường hợp khẩn cấp bùng phát bất ngờ.

Tóm lại, hiện nay tình trạng kỹ thuật có nhu cầu cấp thiết về được chất kháng virut phổ rộng kháng được nhiều loại virut khác nhau, đặc biệt là enterovirut, virut hợp bào hô hấp, virut Ebola, virut gây dịch tiêu chảy ở lợn và virut gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn để ngăn ngừa và/hoặc chữa trị việc lây nhiễm virut. Mặt khác, mặc dù các tính chất sinh học và sinh ký khác nhau của chất chiết Spirulina đã được thông báo hoặc được mô tả chung, nhưng từ trước đến nay chưa có bằng chứng cho thấy hoạt tính kháng virut của chất chiết Spirulina đối với các virut này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Phần sau đây sẽ mô tả sơ lược bản chất của sáng chế nhằm cung cấp các hiểu biết cơ bản về sáng chế cho người đọc. Phần này không bao hàm toàn diện về sáng chế và không nhằm xác định các yếu tố chủ chốt hay có tính quyết định sáng chế, hoặc xác định phạm vi của sáng chế. Mục đích duy nhất của phần này là giới thiệu một số khái niệm được bộc lộ ở đây dưới dạng giản lược để làm tiền đề cho phần mô tả chi tiết hơn sau đây.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chất chiết vi khuẩn lam, cụ thể, chất chiết từ *A. maxima* (dưới đây, chất chiết *Arthrospira maxima* hoặc ngắn gọn là chất chiết AM). Chất chiết AM này được đặc trưng bởi việc có tổng số đường tăng (cụ thể, polysacarit trung tính và/hoặc tích điện dương), mà tương quan dương với hoạt tính kháng virus. Như được mô tả dưới đây, chế phẩm độc đáo từ chất chiết AM theo sáng chế thu được hoạt tính kháng virus mong muốn kháng lại phạm vi rộng các virus. Hơn nữa, dữ liệu thử nghiệm được nêu dưới đây cũng cho thấy rằng chất chiết AM vẫn giữ được hoạt tính kháng virus thỏa đáng khi được xử lý bằng enzym tiêu hóa. Do việc hấp thu qua đường miệng là đường dùng thông thường nhất đối với chất chiết AM, nên hoạt tính kháng virus sau khi xử lý bằng enzym tiêu hóa đề xuất rằng chất chiết AM, khi dùng qua đường ruột (ví dụ, dùng qua đường miệng), có cơ hội cao hơn trong việc tồn tại qua quá trình chuyển hóa qua gan lần thứ nhất và tạo hiệu quả kháng virus *in vivo*.

Theo một số phương án của sáng chế, chất chiết AM chứa ít nhất 25% (% khối lượng) là tổng lượng đường. Ví dụ, chất chiết AM theo sáng chế có thể chứa từ 25 đến 75% (% khối lượng) tổng lượng đường.

Theo một số phương án, chất chiết AM có nguồn gốc từ phân đoạn phân tử lượng lớn có thể thu được bằng cách sử dụng màng lọc có ngưỡng phân tử lượng (MWCO) là 100 KD.

Theo các phương án nhất định, chất chiết AM chứa ít nhất 60% (% khối lượng) polysacarit tích điện dương và/hoặc trung tính dựa trên tổng số đường trong chất chiết. Tuy ý, các chất chiết AM theo sáng chế có thể chứa từ 60 đến 100% (% khối lượng) polysacarit tích điện dương và/hoặc trung tính dựa trên tổng số đường trong chất chiết.

Theo các phương án khác nhau của sáng chế, chất chiết AM chứa rhamnoza làm thành phần glycosyl chính. Ví dụ, rhamnoza có thể chiếm ít nhất là 30 % mol tổng các thành phần glycosyl trong chất chiết AM.

Theo một số phương án, liên kết glycosyl chiếm ưu thế nhất của polysacarit trong chất chiết AM là 3-rhap.

Theo một phương án nhất định, AM chứa hàm lượng protein ít hơn 20% (% khối lượng).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến quy trình điều chế chất chiết AM theo (các) khía cạnh được đề cập ở trên của phần mô tả. Bằng cách sử dụng các quy trình chiết độc đáo ở đây, một quy trình có thể tạo ra các chất chiết AM với hàm lượng đường tăng và/hoặc hàm lượng protein giảm, so với các chất chiết thu được bằng các quy trình chiết thông thường.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, quy trình điều chế chất chiết AM bao gồm các bước, chiết sinh khối *Arthrospira maxima* trong nước nóng có nhiệt độ từ 80 đến 120°C để thu được hỗn hợp thô; loại bỏ phần cặn rắn khỏi chất chiết thô để thu được chất chiết bằng nước nóng; và tùy ý, làm khô chất chiết bằng nước nóng này để thu được chất chiết bằng nước nóng dạng bột. Chất chiết bằng nước nóng này giàu hàm lượng đường và chứa ít hàm lượng protein, so với các chất chiết thu được bằng các phương pháp chiết thông thường, như chiết bằng nước lạnh.

Theo một phương án tùy ý khác, quy trình này có thể bao gồm các bước, tiến hành lọc chất chiết bằng nước nóng hoặc dung dịch chứa chất chiết bằng nước nóng dạng bột bằng cách sử dụng màng lọc có giá ngưỡng phân tử lượng là 100 KD để thu được phân đoạn phân tử lượng lớn; và tùy ý làm khô phân đoạn phân tử lượng lớn này để thu được chất chiết phân tử lượng lớn dạng bột. Dữ liệu thử nghiệm được trình bày ở đây chứng tỏ rằng chất chiết phân tử lượng lớn thể hiện hoạt tính kháng virus thậm chí tốt hơn hoạt tính của chất chiết bằng nước nóng, trong khi đó chất chiết phân tử lượng nhỏ không có tác dụng ức chế sự lây nhiễm virus.

Tùy ý, phương pháp chiết theo sáng chế có thể còn bao gồm các bước, cho phân đoạn phân tử lượng lớn hoặc dung dịch chứa chất chiết phân tử lượng lớn dạng bột tiến hành

phương pháp sắc ký trao đổi ion bằng cách sử dụng cột trao đổi anion; thu gom dòng thoát ra chảy qua cột sắc ký trao đổi ion, trong đó dòng thoát ra chứa chất chiết AM giàu polysacarit tích điện dương và/hoặc trung tính; rửa giải cột sắc ký trao đổi ion bằng dung dịch muối và thu gom dịch rửa giải, trong đó dịch rửa giải này chứa chất chiết AM giàu polysacarit tích điện âm; và tùy ý, làm khô dòng thoát ra hoặc dịch rửa giải tương ứng để thu được chất chiết dạng bột giàu polysacarit tích điện dương và/hoặc trung tính và chất chiết dạng bột giàu polysacarit tích điện âm. Chất chiết AM giàu polysacarit tích điện dương và/hoặc trung tính thậm chí có hiệu quả về hoạt tính kháng virus hơn chất chiết phân tử lượng lớn và chất chiết AM giàu polysacarit tích điện âm.

Theo một số phương án, cột trao đổi ion là cột trên cơ sở diethyl aminoethyl (DEAE), cột trên cơ sở aminoethyl bậc bốn (QAE) hoặc cột trên cơ sở trimethylamino etan (TMAE), hoặc các cột tích điện dương khác.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị sự lây nhiễm virus hoặc rối loạn gây ra bởi sự lây nhiễm virus, ở đối tượng có nhu cầu điều trị. Dữ liệu thử nghiệm đã cung cấp bằng chứng rằng chất chiết AM theo các khía cạnh/phương án được đề cập ở trên của sáng chế có hiệu quả kháng lại phạm vi rộng virus, như, virus Enterovirus (EV), virus hợp bào hô hấp (RSV), virus Ebola, virus gây dịch tiêu chảy ở lợn (PEDV), và virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV).

Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp này bao gồm các bước dùng cho đối tượng một lượng hữu hiệu của chất chiết AM theo sáng chế.

Theo các phương án khác, đối tượng là động vật có vú, bao gồm người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế quá trình sao chép của virus của các virus cụ thể trong tế bào chủ.

Theo các phương án của sáng chế, phương pháp này bao gồm bước cho tế bào chủ tiếp xúc với lượng hữu hiệu của chất chiết AM theo (các) khía cạnh/phương án được đề cập ở trên của sáng chế. Theo các phương án khác, phương pháp này có thể được thực hiện in vitro hoặc in vivo. Tế bào chủ có thể là tế bào động vật có vú.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến chế phẩm dinh dưỡng hoặc dược phẩm để điều trị sự lây nhiễm virus hoặc hội chứng gây ra bởi sự lây nhiễm virus.

Theo một số phương án, chế phẩm dinh dưỡng hoặc dược phẩm chứa lượng hữu hiệu của chất chiết AM và, tùy ý, tá dược được dụng hoặc dinh dưỡng dụng.

Sáng chế cũng đề cập đến vật liệu có khả năng tương thích sinh học, mà chứa chất nền có khả năng tương thích sinh học và chất chiết AM được phân phối trong chất nền có khả năng tương thích sinh học này hoặc qua bề mặt của chất nền có khả năng tương thích sinh học này. Ví dụ, vật liệu có khả năng tương thích sinh học có thể là gel hoặc dung dịch phun, mà chứa chất dẫn có khả năng tương thích sinh học và chất chiết AM được phân phối trong chất dẫn có khả năng tương thích sinh học này. Theo một ví dụ khác, vật liệu có khả năng tương thích sinh học có thể là băng bao gồm lớp nền rắn hấp thu, mà có thể được tẩm gel hoặc dung dịch chứa chất chiết AM. Theo một ví dụ khác, một bề mặt của miếng băng của vật liệu có khả năng tương thích sinh học có thể được phủ lớp dính kết chứa AM được phân phối trong lớp dính kết này.

Các đối tượng cũng được bao gồm trong các khía cạnh khác của sáng chế bao gồm việc sử dụng chất chiết AM trong sản xuất thuốc để điều trị sự lây nhiễm virus hoặc hội chứng do lây nhiễm virus, cũng như chất chiết AM để sử dụng trong điều trị sự lây nhiễm virus hoặc hội chứng gây ra bởi sự lây nhiễm virus.

Nhiều dấu hiệu và ưu điểm của sáng chế sẽ trở nên được hiểu rõ hơn khi tham khảo phần mô tả chi tiết dưới đây kèm theo phần mô tả văn tắt hình vẽ.

Mô tả văn tắt các hình vẽ

Sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn khi đọc phần mô tả chi tiết dưới đây cùng với các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig. 1. là sơ đồ minh họa quy trình điều chế các chất chiết AM khác nhau theo các phương án khác nhau của sáng chế;

Fig. 2A đến Fig. 2C là sắc ký đồ thể hiện sự phân bố phân tử lượng của polysacarit trong các chất chiết AM theo một ví dụ thực hiện của sáng chế;

Fig. 3A và Fig. 3B là các sắc ký đồ thể hiện điện tích của các thành phần cấu thành trong các chất chiết AM theo một ví dụ thực hiện của sáng chế;

Fig. 4A và Fig. 4B thể hiện sơ đồ và các kết quả của thử nghiệm thời gian bổ sung theo một ví dụ thực hiện của sáng chế;

Fig. 4C và Fig. 4D thể hiện sơ đồ và các kết quả của thử nghiệm thời gian loại bỏ theo một ví dụ thực hiện của sáng chế;

Fig. 4E thể hiện kết quả của thử nghiệm tạo thành vết tan theo một ví dụ thực hiện của sáng chế; và

Fig. 5A và Fig. 5B thể hiện hiệu quả trị liệu của SHD1 trên chuột nhắt ICR bị nhiễm EV71/MP4 theo một ví dụ thực hiện của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phần mô tả chi tiết được nêu dưới đây cùng với các hình vẽ kèm theo nhằm mục đích mô tả các ví dụ và không dự định là các dạng duy nhất mà các ví dụ này có thể được xây dựng hoặc được sử dụng ở đó. Phần mô tả này nêu vai trò của phần ví dụ và trình tự các bước thực hành và thực hiện các ví dụ này. Tuy nhiên, các vai trò và trình tự giống hoặc tương tự có thể được thực hiện bởi các ví dụ khác.

Để thuận tiện, một số thuật ngữ nhất định được sử dụng trong bản mô tả, phần ví dụ và các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo được nêu dưới đây. Trừ khi được quy định khác trong bản mô tả này, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong sáng chế sẽ có nghĩa như thường được hiểu và được sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Trừ khi được yêu cầu khác bởi ngữ cảnh, nên hiểu rằng các thuật ngữ ở dạng số ít sẽ bao gồm các dạng số nhiều của các thuật ngữ này và các thuật ngữ ở dạng số nhiều cũng sẽ bao gồm dạng số ít của nó. Cụ thể, như được sử dụng trong phần mô tả và trong phần yêu cầu bảo hộ, các dạng số ít “một” bao gồm các dạng số nhiều trừ khi ngữ cảnh chỉ rõ theo cách khác. Tương tự, như được sử dụng trong phần mô tả và phần yêu cầu bảo hộ, các thuật ngữ “ít nhất là một” và “một hoặc nhiều” có nghĩa giống nhau và bao gồm một, hai, ba, hoặc nhiều hơn ba.

Tuy nhiên, các khoảng và các thông số bằng số thiết lập phạm vi rộng của sáng chế là các giá trị xấp xỉ, các giá trị bằng số nêu trong các ví dụ cụ thể được ghi lại chính xác đến mức có thể. Tuy nhiên, giá trị bằng số bất kỳ, vốn có các sai số nhất định tất yếu do độ lệch chuẩn trong các phép đo thử nghiệm tương ứng của chúng. Tương tự, như được sử

dụng ở đây, thuật ngữ “khoảng” thường có nghĩa là trong phạm vi 10%, 5%, 1%, hoặc 0,5% của giá trị hoặc khoảng cho trước. Theo một cách khác, thuật ngữ “khoảng” có nghĩa là trong phạm vi sai số chuẩn chấp nhận được của giá trị trung bình khi được xem xét bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ngoài các ví dụ vận hành/thực hiện, hoặc trừ khi được chỉ rõ một cách chính xác theo cách khác, tất cả các khoảng bằng số, các lượng, các giá trị, và tỷ lệ phần trăm, như lượng vật liệu, khoảng thời gian, nhiệt độ, điều kiện vận hành, tỷ lệ giữa các lượng, và dạng tương tự của chúng được bộc lộ ở đây nên được hiểu là được thay đổi trong tất cả các trường hợp bởi thuật ngữ “khoảng”. Do đó, trừ khi có chỉ dẫn ngược lại, các thông số bằng số được nêu trong sáng chế và các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo là các giá trị xấp xỉ và có thể thay đổi nếu muốn. Ít nhất, mỗi thông số bằng số ít nhất là nên được hiểu theo số con số có ý nghĩa được thông báo và bằng cách áp dụng các kỹ thuật làm tròn thông thường. Các khoảng được thể hiện ở đây là từ đầu mút này đến đầu mút khác hoặc giữa hai đầu mút. Tất cả các khoảng được bộc lộ ở đây đều bao gồm các đầu mút, trừ khi được quy định khác.

Thuật ngữ “điều trị” và “việc điều trị” như được sử dụng ở đây có thể để chỉ các biện pháp ngăn ngừa (ví dụ, dự phòng), chữa trị hoặc làm thuyên giảm. Cụ thể, thuật ngữ “điều trị” như được sử dụng ở đây để việc áp dụng hoặc sử dụng chất chiết AM theo sáng chế hoặc được phẩm chứa chất chiết này cho đối tượng, là người có tình trạng y tế, triệu chứng kèm theo tình trạng y tế này, bệnh hoặc rối loạn thứ phát theo tình trạng y tế, hoặc bản chất với tình trạng y tế này, nhằm mục đích làm thuyên giảm, cải thiện, làm dịu, trì hoãn sự khởi phát của, ức chế sự tiến triển của, làm giảm sự nghiêm trọng của, và/hoặc làm giảm tỷ lệ mắc một hoặc nhiều triệu chứng hoặc dấu hiệu của các bệnh, rối loạn, và/hoặc tình trạng bệnh lý cụ thể này một phần hoặc hoàn toàn. Việc điều trị có thể được sử dụng cho đối tượng không thể hiện các dấu hiệu của bệnh, rối loạn, và/hoặc tình trạng bệnh lý, và/hoặc cho đối tượng thể hiện các dấu hiệu sớm của bệnh, rối loạn và/hoặc tình trạng bệnh lý, nhằm mục đích làm giảm nguy cơ phát triển bệnh lý đi kèm với bệnh, rối loạn và/hoặc tình trạng bệnh lý này. Theo sáng chế, bệnh, rối loạn và/hoặc tình trạng bệnh lý được dự định bao hàm sự lây nhiễm virus gây ra bởi các virus cụ thể và bệnh, rối loạn và/hoặc tình trạng bệnh lý đi kèm hoặc có nguồn gốc từ sự lây nhiễm virus này. Theo các phương án ưu tiên, chất chiết AM theo sáng chế có thể được sử dụng để ức chế quá trình sao chép của

virut cả in vitro và in vivo. Do đó, phương pháp điều trị theo sáng chế cung cấp biện pháp để về cơ bản diệt trừ tác nhân gây bệnh lây nhiễm trong sinh vật chủ sao cho tác nhân gây bệnh này không còn phát hiện được trong sinh vật chủ.

Thuật ngữ “đối tượng” và “bệnh nhân” được sử dụng thay cho nhau trong bản mô tả này và được dự định để có nghĩa là động vật bao gồm người mà có thể điều trị bằng chất chiết AM, được phẩm, và/hoặc phương pháp theo sáng chế. Thuật ngữ “đối tượng” hoặc “bệnh nhân” được dự định để chỉ cả giới tính nam và nữ trừ khi một giới tính được chỉ rõ cụ thể.

Thuật ngữ “áp dụng” và “sử dụng” được sử dụng thay đổi cho nhau trong bản mô tả này để có nghĩa là việc sử dụng chất chiết AM theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế cho đối tượng có nhu cầu điều trị.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” như được sử dụng ở đây để chỉ lượng chất chiết AM theo sáng chế mà đủ để thu được đáp ứng trị liệu mong muốn. Lượng hữu hiệu của một chất không nhất thiết là phải chữa khỏi bệnh hoặc tình trạng bệnh lý nhưng sẽ cung cấp việc điều trị cho bệnh hoặc tình trạng bệnh lý sao cho sự khởi phát của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý được trì hoãn, bị cản trở hoặc được ngăn ngừa, hoặc các triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý được cải thiện. Lượng hữu hiệu này có thể được chia thành một, hai, hoặc nhiều hơn hai liều ở dạng thích hợp để được dùng tại một, hai hoặc nhiều hơn hai lần trong khoảng thời gian định trước. Lượng hữu hiệu và thích hợp cụ thể sẽ thay đổi phụ thuộc vào các yếu tố như tình trạng bệnh lý cụ thể được điều trị, điều kiện sinh lý của bệnh nhân (ví dụ, khối lượng cơ thể, tuổi tác, hoặc giới tính của bệnh nhân), loại động vật có vú hoặc động vật được điều trị, khoảng thời gian điều trị, bản chất của liệu pháp đồng thời (nếu có), và dạng bào chế cụ thể được sử dụng và cấu trúc của thành phần hoạt tính hoặc dẫn xuất của nó. Lượng hữu hiệu có thể được biểu diễn, ví dụ, là tổng khối lượng của chất chiết AM (ví dụ, theo gam, milligam hoặc microgam) hoặc tỷ lệ khối lượng của chất chiết AM với khối lượng cơ thể, ví dụ, là milligam trên mỗi kilogam (mg/kg).

Cụm từ “tá dược dinh dưỡng dụng hoặc dược dụng” như được sử dụng ở đây có nghĩa là nguyên liệu, thành phần hoặc chất dẫn, như chất độn lỏng hoặc rắn, chất làm loãng, chất mang, dung môi hoặc vật liệu bao nang, được tham gia vào việc mang hoặc

vận chuyển các chất theo sáng chế từ một cơ quan, hoặc bộ phận của cơ thể, đến một cơ quan, hoặc bộ phận khác của cơ thể đó. Mỗi tá dược cần phải "có thể chấp nhận được" theo nghĩa tương thích với các thành phần khác của chế phẩm. Chế phẩm dinh dưỡng hoặc dược phẩm chứa chất chiết AM theo sáng chế kết hợp với một hoặc nhiều thành phần chấp nhận được về mặt dinh dưỡng hoặc dược dụng. Tá dược này có thể là dạng chất làm loãng, kem dạng rắn, bán rắn hoặc nang. Các sản phẩm dinh dưỡng và dược phẩm cũng là một đối tượng nữa của sáng chế. Thông thường, lượng chất chiết AM nằm trong khoảng từ 0,1 đến 95% khối lượng của sản phẩm, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,2 đến 20% khối lượng với sản phẩm sử dụng ngoài đường tiêu hóa và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 50% khối lượng với các sản phẩm sử dụng qua đường miệng. Để sử dụng lâm sàng theo các phương pháp của sáng chế, chế phẩm dinh dưỡng hoặc dược phẩm theo sáng chế được bào chế thành các dạng bào chế thích hợp cho các đường dùng dự định, như dùng qua đường miệng

Như được sử dụng ở đây thuật ngữ "sinh khối" có nghĩa là sinh khối thu được từ môi trường nuôi cấy chứa *A. maxima*. Thuật ngữ này bao gồm các sinh vật sống và chết, cũng như sinh khối làm sẵn, được làm khô, đông lạnh hoặc hoạt động trước đó.

Sáng chế này được dựa trên, ít nhất là một phần, việc phát hiện ra rằng chất chiết *A. maxima* (chất chiết AM) có thể ức chế sự lây nhiễm virus gây ra bởi phạm vi rộng các virus, như, EV, RSV, HHV, virus Ebola, PEDV, và PRRSV. Theo quan điểm trên, sáng chế đề xuất các phương pháp điều trị sự lây nhiễm virus gây ra bởi các virus cụ thể. Một số phương án của sáng chế đề cập đến các phương pháp điều trị rối loạn gây ra bởi việc lây nhiễm virus này. Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng chất chiết AM này trong điều trị lây nhiễm virus, cũng như trong sản xuất thuốc nhằm mục đích điều trị này. Thuốc (tức là, dược phẩm) tất nhiên, là đối tượng được bao hàm trong phạm vi của sáng chế.

Theo một số phương án của sáng chế, chất chiết AM giàu hàm lượng đường. Ví dụ, chất chiết AM chứa ít nhất 25% (% khối lượng) tổng lượng đường, như 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, và 80% (% khối lượng) tổng số đường dựa trên tổng khối lượng của chất chiết AM. Dữ liệu thử nghiệm được nêu dưới đây chứng tỏ rằng chất chiết AM giàu đường này hữu hiệu trong việc ức chế quá trình sao chép của virus của một loạt các virus, trong khi đó chất chiết AM thông thường với hàm lượng đường ít không thể hiện hoạt tính kháng virus ở mức cao như vậy.

Chất chiết AM theo sáng chế cũng độc đáo ở chỗ nó bao gồm lượng protein giảm, khi được so sánh với chất chiết AM thông thường. Theo các phương án khác của sáng chế, mức protein của chất chiết AM nhỏ hơn 20% (% khối lượng), như 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, và 20% (% khối lượng) dựa trên tổng khối lượng của chất chiết AM.

Theo một số phương án khác, chất chiết AM là chất chiết AM phân tử lượng lớn có nguồn gốc từ phân đoạn phân tử lượng lớn có thể thu được từ các phương pháp tách theo kích thước phân tử. Theo một số phương án tùy ý, phân đoạn phân tử lượng lớn có thể thu được bằng cách lọc chất chiết AM giàu đường bằng màng lọc có ngưỡng phân tử lượng (MWCO) là 100 KD. Thông thường, MWCO, trong ngữ cảnh màng lọc, để chỉ phân tử lượng của phân tử nhỏ nhất (theo Dalton) trong đó tỷ lệ % xác định được (ví dụ, 80, 85, 90 hoặc 95%) của phân tử được giữ lại bởi màng lọc trong quá trình lọc (hoặc thẩm tách). Vì thế, phân đoạn phân tử lượng lớn chứa lượng các thành phần có phân tử lượng lớn hơn 100 KD được tăng lên, so với phân đoạn phân tử lượng thấp. Dữ liệu thử nghiệm được trình bày dưới đây chỉ ra rằng chất chiết AM phân tử lượng lớn theo sáng chế tạo ra hiệu quả kháng virus thỏa đáng hơn, so với chất chiết bằng nước nóng giàu đường hoặc chất chiết AM phân tử lượng thấp.

Theo các phương án khác, chất chiết AM phân tử lượng lớn còn được tinh chế thêm bằng cách sử dụng các phương pháp tách theo điện tích. Ví dụ, chất chiết AM phân tử lượng lớn được tiến hành phương pháp sắc ký trao đổi anion sao cho các thành phần trong chất chiết được tách thêm dựa trên điện tích của phân tử. Phương pháp sắc ký trao đổi anion thu được phân đoạn giàu polysaccharit tích điện dương và/hoặc trung tính và phân đoạn khác giàu polysaccharit tích điện âm. Dữ liệu thử nghiệm được bao gồm dưới đây chứng tỏ rằng chất chiết AM với phần lớn là polysaccharit tích điện dương và/hoặc trung tính có hiệu quả hơn trong việc ức chế quá trình sao chép của các virus cụ thể, so với chất chiết AM phân tử lượng lớn và chất chiết AM chứa chủ yếu là polysaccharit tích điện âm.

Theo các phương án khác của sáng chế, chất chiết AM phân tử lượng lớn chứa ít nhất 60% (% khối lượng) polysaccharit tích điện dương và/hoặc trung tính dựa trên tổng số đường trong chất chiết. Ví dụ, polysaccharit tích điện dương và/hoặc trung tính có thể chiếm từ 60 đến 100 (% khối lượng) tổng số đường trong chất chiết. Ví dụ, chất chiết AM có thể chứa

60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, hoặc 100 (% khối lượng) polysacarit tích điện dương và/hoặc trung tính dựa trên tổng lượng đường.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, rhamnoza là thành phần glycosyl chính trong số các thành phần glycosyl cấu thành polysacarit trong chất chiết AM. Theo một số phương án tùy ý, chất chiết AM có ít nhất là 30 % mol rhamnoza dựa trên tổng các thành phần glycosyl trong chất chiết AM. Ví dụ, tỷ lệ % mol của rhamnoza có thể là 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 45, 46, 48, 50, 52, 54, 55, 56, 58, 60, 62, 64, 65, 66, 68, hoặc 70 % mol.

Ngoài ra, liên kết glycosyl dồi dào nhất có mặt trong polysacarit là 3-rhap, theo một số phương án của sáng chế. Ví dụ, trong một ví dụ thực hiện, lớn hơn một nửa các gốc rhamnoza có liên kết 3-rhap.

Như có thể đánh giá được, các chất chiết AM khác cũng được mô tả ở đây. Mặc dù một số chất chiết AM được yêu cầu bảo hộ có thể thể hiện hoạt tính kháng virus tốt hơn các chất chiết AM được yêu cầu bảo hộ khác, các chất chiết AM giàu đường này đạt được hoạt tính kháng virus cao hơn với hàm lượng đường cao hơn. Ngoài ra, dữ liệu thử nghiệm được cung cấp dưới đây chứng tỏ rằng chất chiết AM theo sáng chế vẫn giữ được hoạt tính kháng virus thỏa đáng khi xử lý bằng enzym tiêu hóa, đề xuất rằng chúng có thể gây ra hoạt tính kháng virus *in vivo* mong muốn. Ngoài ra, có nhiều phương pháp và kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực chế biến chất chiết AM theo sáng chế để cải thiện sinh khả dụng và/hoặc công hiệu của chất chiết AM được tiêu thụ qua đường miệng.

Ngoài các chất chiết AM được mô tả ở trên, sáng chế cũng đề cập đến quy trình điều chế các chất chiết AM này. Quy trình này được đặc trưng ở bước chiết bằng nước nóng, mà dẫn đến việc tăng tổng số đường của chất chiết AM và tăng cường hoạt tính kháng virus. Quy trình này cũng bao gồm các bước bổ sung để tinh chế chất chiết AM, nhờ đó thu được các chất chiết AM khác nhau với hoạt tính kháng virus được tăng cường.

Các quy trình chiết minh họa theo các phương án khác của sáng chế được đề cập kèm theo việc tham khảo lưu đồ được mô tả trên Fig. 1. Theo một số phương án của sáng chế, quy trình chiết bao gồm bước chiết sinh khối *A. maxima* trong nước nóng để thu được chất chiết thô (bước 110). Ví dụ, đầu tiên sinh khối có thể được tạo huyền phù trong

nước (ví dụ, nước cất hoặc nước cất hai lần), mà sau đó được làm nóng đến nhiệt độ khoảng từ 80°C đến 120°C trong một khoảng thời gian. Ví dụ, thể huyền phù có thể được gia nhiệt đến nhiệt độ khoảng 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, hoặc 120°C. Theo các phương án khác, bước chiết gia nhiệt 110 có thể kéo dài đến ít nhất là một giờ, ví dụ, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, hoặc 4 giờ. Theo một số phương án, thời gian chiết có gia nhiệt có thể lâu hơn nữa.

Sinh khối *A. maxima* thích hợp để chiết bao gồm sinh vật *A. maxima* sống được lấy từ hệ thống nuôi cấy. Theo một cách khác, sinh khối *A. Maxima* có thể là sinh vật *A. maxima* chết, như sinh vật được làm khô (ví dụ, bằng cách làm đông khô, làm khô trong không khí, hoặc sấy phun). Theo một số phương án được cung cấp ở đây, sinh khối *A. maxima* khô được tạo huyền phù trong nước cất hai lần đến nồng độ 10% (% khối lượng/thể tích). Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể đánh giá được rằng, nồng độ của sinh khối trong thể huyền phù có thể nằm trong khoảng từ 1% (% khối lượng/thể tích) đến 30% (% khối lượng/thể tích), như 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, hoặc 30% (% khối lượng/thể tích).

Quy trình chiết cũng bao gồm bước 120, trong đó phần cặn rắn trong chất chiết thô được loại bỏ. Một phương án để loại bỏ phần cặn rắn được ly tâm. Ví dụ, chất chiết thô có thể được ly tâm ở tốc độ 1000 đến 5000 vòng/phút (ví dụ, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, hoặc 5000 vòng/phút) trong thời gian thích hợp (như 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, hoặc 50 phút).

Sau khi loại bỏ phần cặn rắn từ chất chiết thô, người ta có thể thu được chất chiết AM bằng nước nóng (ví dụ, dịch nổi được thu gom từ ống ly tâm). Như được đề cập dưới đây, chất chiết bằng nước nóng (ví dụ, chất chiết SH theo các ví dụ thực hiện dưới đây) bao gồm hàm lượng đường tăng, so với các chất chiết thông thường được điều chế bằng phương pháp chiết bằng nước lạnh (FE-L-APO). Ngoài ra, mức protein trong chất chiết bằng nước nóng ít hơn trong chất chiết bằng nước lạnh.

Theo các phương án tùy ý, chất chiết bằng nước nóng chứa nước có thể được làm khô để thu được chất chiết bằng nước nóng dạng bột. Ví dụ, chất chiết bằng nước nóng chứa nước có thể được làm khô tự nhiên, sấy phun, hoặc được làm khô trong không khí, hoặc được làm khô bằng các thiết bị thích hợp hoặc tương đương bất kỳ.

Như có thể đánh giá được, cả hai chất chiết bằng nước nóng ở dạng chứa nước và chất chiết bằng nước nóng dạng bột được làm khô đều nằm trong phạm vi của “chất chiết *A. maxima*” theo sáng chế, và có thể được sử dụng để bào chế chế phẩm dinh dưỡng hoặc được phẩm như được mô tả ở đây.

Tiếp theo, trong bước 130, chất chiết bằng nước nóng (hoặc chất chiết bằng nước nóng dạng bột) được phân tách theo kích thước phân tử (bước 130). Ví dụ, chất chiết bằng nước nóng có thể được lọc bằng màng bán thấm có ngưỡng phân tử lượng (MWCO) là 100 KD, nhờ đó tách chất chiết bằng nước nóng thành phân đoạn phân tử lượng nhỏ và phân đoạn phân tử lượng lớn. Theo cách này, phân đoạn phân tử lượng lớn bao gồm lượng của các thành phần có phân tử lượng lớn hơn 100 KD được tăng lên, trong khi đó phân đoạn phân tử lượng nhỏ bao gồm nhiều thành phần có phân tử lượng nhỏ hơn 100 KD. Dữ liệu thử nghiệm được trình bày dưới đây cho thấy rằng chất chiết phân tử lượng lớn (ví dụ, chất chiết SH1 theo các ví dụ thực hiện dưới đây) tạo ra hiệu quả kháng virus tốt hơn, so với chất chiết bằng nước nóng giàu đường hoặc chất chiết AM phân tử lượng thấp.

Trong trường hợp trong đó chất chiết bằng nước nóng dạng bột được sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu cho quá trình lọc, thì đầu tiên chất chiết bằng nước nóng dạng bột này được trộn với nước cất hai lần với lượng thích hợp (10 đến 50 lần) trước khi lọc. Ví dụ, hàm lượng nước có thể là 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, hoặc 50 lần so với khối lượng của chất chiết bằng nước nóng dạng bột được làm khô.

Quy trình lọc có thể được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, và người vận hành có thể sử dụng theo ý riêng của mình để quyết định xem các biến đổi nhất định có cần thiết trong các tình huống hay không.

Giống như chất chiết bằng nước nóng được đề cập ở trên, chất chiết phân tử lượng lớn có thể được làm khô để tạo ra chiết phân tử lượng lớn dạng bột. Các sản phẩm ở cả dạng chứa nước và dạng bột rắn đều thích hợp để sử dụng làm chất chiết AM được mô tả ở đây.

Sau đó, trong bước 140, các thành phần trong chất chiết phân tử lượng lớn (hoặc chiết phân tử lượng lớn dạng bột) được tách tiếp dựa trên điện tích của các phân tử. Theo các phương án của sáng chế, việc tách theo điện tích được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký trao đổi ion. Ví dụ, phương pháp sắc ký trao đổi ion có thể sử dụng cột trên cơ sở diethyl aminoethyl (DEAE), cột trên cơ sở aminoethyl bậc bốn (QAE) hoặc cột trên cơ sở trimethylamino etan (TMAE), hoặc các cột tích điện dương khác.

Theo một số phương án tùy ý, độ mặn của chất chiết phân tử lượng lớn (hoặc dung dịch chứa chất chiết phân tử lượng lớn dạng bột) đầu tiên có thể được điều chỉnh đến khoảng 0,5 đến 2,0% (ví dụ, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, hoặc 2,0%). Chất chiết phân tử lượng lớn dạng bột có thể được làm loãng theo cách tương tự như cách đã được mô tả ở trên với chất chiết bằng nước nóng dạng bột. Trong một số trường hợp, chất chiết phân tử lượng lớn dạng bột có thể được pha loãng khoảng lớn hơn 50 lần, như khoảng 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, hoặc 100 lần, hoặc thậm chí cao hơn.

Tùy ý, dung dịch nước (điều chỉnh độ mặn hoặc không) được xử lý thêm bằng cách ly tâm để loại bỏ phần cặn rắn từ đó. Ví dụ, theo một số phương án, dung dịch nước được ly tâm ở tốc độ 5000 đến 10000 vòng/phút (ví dụ, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, hoặc 10000 vòng/phút) trong thời gian thích hợp (như, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, hoặc 50 phút).

Phương pháp sắc ký trao đổi ion có thể được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, và tất nhiên, các cải biến thích hợp có thể được thực hiện nếu cần.

Theo thực hành sắc ký phổ biến, đầu tiên cột được rửa bằng một lượng nước cất hai lần thích hợp, và sau đó mẫu sắc ký (tức là, chất chiết AM chứa nước được xử lý từ trước) được phép chạy qua cột, dòng thoát ra ban đầu được thu gom. Tùy ý, cột này có thể được

rửa lại bằng nước cất hai lần, và dòng thoát ra thứ hai được chảy qua cột cũng được thu gom và được kết hợp với dòng thoát ra ban đầu. Các dòng thoát ra thứ nhất, thứ hai và được kết hợp để chỉ, theo cách riêng rẽ hoặc kết hợp, chất chiết AM giàu polysacarit tích điện dương và/hoặc trung tính, và bột khô thu được từ chất chiết AM này là bột chất chiết giàu polysacarit tích điện dương hoặc trung tính.

Sau đó, cột được rửa giải bằng thể tích thích hợp của dung dịch muối (ví dụ, NaCl 1M); dịch rửa giải được thu gom trong bước này là chất chiết AM giàu polysacarit tích điện âm, và bột khô thu được từ chất chiết AM này là chất chiết giàu polysacarit tích điện âm dạng bột.

Một số muối được sử dụng hoặc được tạo ra trong phương pháp sắc ký trao đổi ion có thể gây độc cho tế bào, và vì thế, theo một số phương án tùy ý, chất chiết AM giàu polysacarit tích điện dương và/hoặc trung tính và chất chiết AM giàu polysacarit tích điện âm được tiến hành việc tách theo kích thước phân tử khác trước khi được làm khô để loại bỏ muối khỏi chất chiết.

Dữ liệu thử nghiệm dưới đây chỉ ra rằng chất chiết AM giàu polysacarit tích điện dương và/hoặc trung tính (như chất chiết SHD1 theo một số ví dụ thực hiện) có hoạt tính kháng virus công hiệu hơn chất chiết phân tử lượng lớn (ví dụ, chất chiết SH1) hoặc chất chiết AM giàu polysacarit tích điện âm (như chất chiết SHR1 theo một số ví dụ thực hiện).

Như có thể đánh giá được, chất chiết AM giàu polysacarit tích điện dương và/hoặc trung tính và chất chiết AM giàu polysacarit tích điện âm, cũng như bột thu được từ đó đều nằm trong phạm vi của chất chiết AM theo sáng chế.

Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp này bao gồm bước dùng cho đối tượng lượng hữu hiệu của chất chiết AM theo sáng chế để điều trị sự lây nhiễm virus hoặc rối loạn đi kèm với sự lây nhiễm virus. Theo một số trường hợp, quá trình sao chép của virus ở đối tượng có thể về cơ bản được ức chế bằng cách dùng chất chiết AM, nhờ đó tiết trừ sự lây nhiễm virus ở đối tượng.

Như có thể đánh giá được bởi người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này, lượng hữu hiệu có thể thay đổi phụ thuộc vào nhiều yếu tố, như tình trạng bệnh lý cụ thể được

điều trị, mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý, các thông số của bệnh nhân cụ thể (bao gồm tuổi, tình trạng sinh lý, kích cỡ, giới tính và cân nặng), thời gian điều trị, bản chất của phương pháp trị liệu đồng thời (nếu có), đường dùng cụ thể và các yếu tố tương tự nằm trong kiến thức và chuyên môn của người hành nghề y tế. Theo một số phương án của sáng chế, lượng hữu hiệu của chất chiết AM theo sáng chế là từ 0,01 đến 1000 mg/Kg thể trọng mỗi ngày đối với đối tượng là người, ví dụ, 0,01, 0,02, 0,03, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, hoặc 1000 mg/Kg thể trọng mỗi ngày.

Theo các phương án nhất định, lượng hữu hiệu của các chất chiết AM theo sáng chế để điều trị lây nhiễm EV là từ 0,375 đến 125 mg/kg/ngày đối với chuột nhắt; tốt hơn là từ 1 đến 60 mg/kg/ngày; tốt hơn nữa là từ 3 đến 30 mg/kg/ngày. Ví dụ, liều dùng hàng ngày đối với chuột nhắt có thể là 0,375, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, hoặc 125 mg/kg.

Theo các phương án nhất định, đối tượng là người trưởng thành, và lượng hữu hiệu của các chất chiết AM theo sáng chế điều trị lây nhiễm EV là 0,01 đến 10 mg/kg/ngày; tốt hơn là 0,8 đến 4,8 mg/kg/ngày; tốt hơn nữa là 0,24 đến 2,4 mg/kg/ngày. Ví dụ, liều dùng hàng ngày đối với đối tượng là người có thể là 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,12, 0,15, 0,2, 0,24, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,4, 2,5, 3, 3,5, 3,6, 4, 4,5, 4,8, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, hoặc 10 mg/kg. Như có thể đánh giá được, liều tương đương ở người (human equivalent dose-HEQ) đối với chất chiết AM theo sáng chế hoặc được phẩm chứa chất chiết này có thể được tính bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dựa trên liều dùng ở động vật được cung cấp trong các ví dụ thực hiện dưới đây. Ví dụ, người ta có thể làm theo hướng dẫn cho công nghiệp được công bố bởi Cơ quan quản lý Thực phẩm và

Dược phẩm Hoa Kỳ (US Food and Drug Administration - FDA) có tên “Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers (July 2005)” để ước lượng liều an toàn tối đa để sử dụng cho đối tượng là người. Ví dụ, khoảng lượng hữu hiệu đối với đối tượng là người được đề cập ở trên thu được từ các liều lượng hữu hiệu đối với chuột công bằng cách sử dụng hệ số chuyển đổi được nêu trên bảng 1 của hướng dẫn FDA, giả sử người nặng 60 kg.

Chất chiết AM theo sáng chế có thể được dùng qua đường toàn thân (ví dụ, miệng hoặc trong màng bụng) hoặc khu trú (như qua màng hoặc qua niêm mạc).

Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp này bao gồm các bước phun vào không khí, hoặc phun lên đối tượng một nồng độ hữu hiệu của các chất chiết AM để ngăn ngừa, hoặc điều trị sự lây nhiễm virus làm chất khử trùng. Nồng độ của các chất chiết AM trong dạng bào chế có thể là từ 1 đến 100000 ug/ml.

Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp này bao gồm các bước phun hoặc đắp, theo cách khu trú, lên đối tượng một nồng độ hữu hiệu của các chất chiết AM để điều trị sự lây nhiễm virus hoặc rối loạn đi kèm với sự lây nhiễm virus như bệnh mụn rộp gây ra bởi HSV-1/2 hoặc bệnh tay chân miệng gây ra bởi enterovirus. Dạng bào chế cũng có thể là vật liệu có khả năng tương thích sinh học, chứa chất nền có khả năng tương thích sinh học, và chất chiết AM được phân phối trong nền hoặc qua bề mặt của chất nền, ở dạng thạch hoặc thuốc mỡ. Nồng độ của các chất chiết AM trong dạng bào chế có thể là từ 1 đến 100000 ug/ml.

Ví dụ, chất chiết AM theo sáng chế có thể được bào chế, cùng với tá dược được dùng hoặc dinh dưỡng dụng, thành chế phẩm dinh dưỡng hoặc dược phẩm thích hợp cho chế độ dùng mong muốn. Các chế phẩm dinh dưỡng hoặc dược phẩm nhất định được bào chế theo ý tưởng sáng tạo được bộc lộ và được yêu cầu bảo hộ ở đây là dạng liều đơn vị để dùng qua đường miệng cho bệnh nhân. Chế phẩm dinh dưỡng hoặc dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành dạng rắn, bán rắn, hoặc lỏng. Các ví dụ về dạng liều lượng thích hợp cho đường dùng được đề cập ở trên bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, viên nén, viên nén dài, viên nang, viên nhện, viên ngậm dẹt, viên ngậm, bột, dung dịch, thể phân tán, thể huyền phù (ví dụ, thể huyền phù lỏng chứa nước hoặc không chứa nước, như tương

dầu trong nước, hoặc nhũ tương nước trong dầu), và còn ngọt. Như có thể đánh giá được, các chế phẩm dinh dưỡng hoặc dược phẩm này cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo các phương án tùy ý nhất định, các ví dụ về tá dược được dụng hoặc dinh dưỡng dụng bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, tinh bột, xyclodextrin, maltodextrin, metylxenluloza, carbometoxy xenluloza, và gôm xanthan. Ngoài ra, các chế phẩm dinh dưỡng hoặc dược phẩm theo sáng chế còn có thể chứa một hoặc nhiều thành phần sau đây: dung môi, môi trường phân tán, lớp bọc, chất hoạt động bề mặt, chất chống oxy hóa, chất bảo quản (ví dụ, chất kháng khuẩn, chất diệt nấm), chất tạo đẳng trương, chất làm chậm quá trình bám dính, chất làm ổn định, gel, chất kết dính, tá dược, chất làm rắn, chất làm trơn, chất tạo ngọt, chất tạo hương, và thuốc nhuộm.

Đối với chế phẩm dinh dưỡng chứa chất chiết AM theo sáng chế, chế phẩm này còn có thể bao gồm các thành phần dinh dưỡng bổ sung, như vitamin, chất khoáng, chất xơ, axit béo, hoặc axit amin.

Trong các phương án, đối tượng là động vật có vú, mà có thể có lợi từ phương pháp điều trị theo sáng chế. Như được sử dụng ở đây, “động vật có vú” để chỉ tất cả các thành viên thuộc lớp Thú (Mammalia), bao gồm người; linh trưởng (ví dụ, khỉ và tinh tinh); động vật nuôi và động vật trang trại, như chó, mèo, thỏ, lợn, cừu, dê, bò, ngựa, và gia súc; cũng như động vật trong vườn thú, động vật thể thao và động vật kiểng; và động vật gặm nhấm, như chuột nhắt, chuột cống và chuột lang. Theo một phương án được lấy làm ví dụ, bệnh nhân là người.

Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước dùng cho đối tượng một lượng hữu hiệu của chất để điều trị hoặc làm cải thiện các triệu chứng của sự lây nhiễm virus, trước, đồng thời với, hoặc sau khi dùng chất chiết AM theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phần ví dụ dưới đây được cung cấp để giải thích các khía cạnh nhất định theo sáng chế và nhằm hỗ trợ cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này thực hành sáng chế. Phần ví dụ này không được hiểu là để giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ. Không cần giải thích thêm, người ta tin rằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, dựa vào phần mô tả ở đây, có thể sử dụng sáng chế đến phạm vi đầy đủ nhất của nó.

Ví dụ so sánh: Điều chế và phân tích thành phần của chất chiết AM bằng nước lạnh

Sinh khối *A. maxima* khô (10 g) được tạo huyền phù trong nước cất hai lần (100 ml) bằng cách khuấy mạnh. Thể huyền phù này được đặt trong tủ lạnh dưới 0°C trong ít nhất là 8 giờ sao cho thể huyền phù được đông lạnh thành một khối băng. Sau đó khối băng này được rã đông ở nhiệt độ từ 0 đến 37°C và rung hoặc khuấy nhẹ để khối băng này được tan chảy từ từ. Quy trình kết đông và rã đông được thực hiện ít nhất là hai lần, và sau đó thể huyền phù đã rã đông được ly tâm ở tốc độ cao trong 1 giờ để loại bỏ các cặn rắn. Chất chiết AM bằng nước lạnh thu được theo cách này được gọi là chất chiết FE-L-APO. Chất chiết FE-L-APO được làm đông khô để thu được bột FE-L-APO để phân tích thêm.

Chất chiết FE-L-APO bằng nước lạnh được phân tích để xác định % khối lượng (% khối lượng) của protein (thuốc thử trong thử nghiệm protein Bio-rad sử dụng albumin huyết thanh bò (BSA) làm chuẩn), tổng lượng đường, (thử nghiệm axit phenol-sulfuric sử dụng glucoza làm chuẩn), axit nucleic (độ hấp thụ OD₂₆₀), nước (được xác định bằng mức hao hụt khi làm khô), và tro (được xác định bằng cách đốt ra tro ở 600°C trong 7 giờ), và kết quả tương ứng được trình bày trên bảng 1 (được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± S.D. từ ba mẻ riêng biệt).

Bảng 1: Phân tích thành phần của chất chiết FE-L-APO

	Hàm lượng (% khối lượng)
Protein	39,33 ± 5,6
Tổng số đường	11,79 ± 5,7
Axit nucleic	19,29 ± 2,7
Nước	5 ± 1
Tro	1,2 ± 0,3
Các thành phần khác	23,39

Thành phần glycosyl của chất chiết FE-L-APO được xác định bằng phân tích sắc ký khí - Phổ khối (gas chromatography-mass spectrometry-GS-MC), và kết quả từ ba mẻ chất chiết FE-L-APO này được tóm tắt trên bảng 2.

Bảng 2: Thành phần monosacarit của chất chiết FE-L-APO (theo tỷ lệ % số mol, %mol)

	A5-S5 101105	A5-S5 110309	A5-S5 110427
Fucoza	2,00	1,73	2,29
Rhamnoza	25,72	18,19	26,57
Galactosamin	Không xác định	Không xác định	Không xác định
Arabinoza	1,33	0,87	1,13
Glucosamin	8,36	6,80	8,02
Galactoza	6,62	7,49	5,83
Glucoza	18,65	15,01	20,12
Manoza	54,41	46,02	56,32
Xyloza	1,71	1,77	1,61

Chất chiết FE-L-APO được tách tiếp thành các phân đoạn Allophycoxyanin (APC), C-phycoxyanin (C-PC), FE-L-APO(H), và FE-L-APO (T). Các phân đoạn APC và CPC là các phân đoạn protein thu được bằng cách cho chất chiết FE-L-APO tiến hành tách tiếp bằng cột DEAE và HA. Các phân đoạn FE-L-APO(H) và FE-L-APO(T) là các phân đoạn polysacarit. Chất chiết FE-L-APO(H) được điều chế bằng cách chiết bằng nước nóng FE-L-APO để làm biến tính phần protein và tách phân đoạn protein bằng cách ly tâm. Chất chiết FE-L-APO(T) được điều chế bằng cách làm biến tính thành phần protein của chất chiết FE-L-APO bằng axit tricloaxetic, và sau đó làm kết tủa và tách phân đoạn protein bằng cách ly tâm.

Ví dụ 1: Điều chế và phân tích thành phần của các chất chiết AM bằng nước nóng

Sinh khối *A. maxima* khô (10 g) được tạo huyền phù trong nước cất hai lần (100 ml) bằng cách khuấy mạnh. Thể huyền phù này được làm nóng đến nhiệt độ khoảng 80°C đến 120°C trong ít nhất là 1 giờ, nhờ đó thu được chất chiết thô. Chất chiết thô được ly tâm ở tốc độ 3500 vòng/phút trong thời gian khoảng 20 đến 30 phút, và dịch nổi thu được được thu gom là chất chiết AM bằng nước nóng (chất chiết SH). Chất chiết SH chứa nước được làm đông khô để thu được bột SH để phân tích tiếp.

Để tách theo kích thước phân tử, bột SH được hòa tan trong nước cất hai lần với lượng gấp từ 10 đến 50 lần và sau đó được lọc bằng đơn vị lọc ly tâm Amicon Ultra-15 bằng cách sử dụng màng Ultracel-100 (MWCO: 100 KD). Phân đoạn không qua màng (tức

là, phần bị giữ lại ở phía mẫu) được thu gom làm chất chiết AM phân tử lượng lớn (chất chiết SH1), mà được làm đông khô để thu được bột SH1 để sử dụng sau đó.

Để tách theo điện tích, gel DEAE (Sephacrose™ Fast Flow) được sử dụng cho phương pháp sắc ký trao đổi ion. Tóm lại, bột SH1 được hòa tan trong nước cất hai lần với độ pha loãng ít nhất là 50 lần, và độ mặn được điều chỉnh đến khoảng 0,8~1,0% bằng cách bổ sung 0,4~0,5 g NaCl vào 50 mL chất pha loãng. Sau đó chất pha loãng được ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 30 phút, và dịch nổi được lọc bằng sàng có kích thước mắt lưới 1µm để loại bỏ, nhờ đó thu được dung dịch mẫu sẵn sàng cho phương pháp sắc ký. Cột DEAE đã chuẩn bị bằng cách sử dụng 200 ml gel DEAE đầu tiên được làm cân bằng bằng 5 đến 10 thể tích cột (CV) là nước cất hai lần. Sau đó, dung dịch mẫu (50 ml) được bơm lên cột ở lưu lượng 4 ml/phút, và dòng thoát ra ban đầu hạ thấp qua cột được thu gom. Tiếp theo, cột được rửa bằng 500 mL nước cất hai lần, và dòng thoát ra chạy qua cột được thu thập là dòng thoát ra thứ hai. Dòng thoát ra ban đầu và dòng thoát ra thứ hai được kết hợp để tạo ra chất chiết AM giàu polysacarit tích điện dương và/hoặc trung tính (chất chiết SHD1). Sau khi rửa, cột DEAE được rửa giải bằng 1 đến 3 CV NaCl 1M, và dịch rửa giải được thu gom, nhờ đó thu được chất chiết AM giàu polysacarit tích điện âm (chất chiết SHR1).

Các chất chiết SHD1 và SHR1 chứa nước sau đó được lọc bằng đơn vị lọc ly tâm Amicon Ultra-15 bằng cách sử dụng màng Ultracel-100, tương ứng, để loại bỏ các muối và các tạp chất khác từ đó. Các phần không qua màng sau đó được làm đông khô để thu được bột SHD1 và bột SHR1 để phân tích thêm.

Bột SH, bột SH1, bột SHD1, và bột SHR1 được tiến hành một chuỗi các phân tích thành phần, bao gồm tổng số đường (thử nghiệm axit phenol-sulfuric sử dụng thành phần monosacarit của chất chiết AM làm chuẩn), hàm lượng đường axit (phương pháp m-hydroxydiphenyl sử dụng axit glucuronic làm chuẩn), đường khử oxy (xác định bằng thử nghiệm Metylpentoza sử dụng rhamnoza làm chuẩn), axit nucleic (độ hấp thụ OD₂₆₀), protein tổng (thuốc thử trong thử nghiệm protein Bio-rad sử dụng BSA làm chuẩn); chất béo thô (A.O.A.C- 960,39), nước (được xác định bằng lượng hao hụt khi làm khô), và tro (được xác định bằng cách đốt ra tro ở 600°C trong 7 giờ), và kết quả tương ứng được trình bày trên bảng 3.

Bảng 3: Phân tích thành phần chất chiết AM (theo phần trăm khối lượng, % khối lượng)

	SH	SH1	SHD1
Đường có tính axit	2,97	3,22	5,53
Đường khử oxy	8,53	10,73	27,03
Tổng lượng đường	29,52	31,59	61,05
Axit nucleic	19,54	18,77	4,98
Protein (BIO-RAD)	5,88	6,29	1,93
Chất béo thô	vết	vết	vết
Nước	5~7	5~7	5~7
Tro	Không có kết quả thử nghiệm	Không có kết quả thử nghiệm	Không có kết quả thử nghiệm

Ngoài ra, phương pháp sắc ký loại trừ theo kích thước hiệu năng cao (high performance size exclusion chromatography - HPSEC) được sử dụng để tách polysacarit trong tổng thành phần đường, và sau đó khối lượng phân tử của các phân đoạn này được xác định bằng cách phát hiện chỉ số khúc xạ (refractive index - RI). Nói ngắn gọn, polysacarit được tách bằng cách sử dụng cột bảo vệ TSK PWH (7,5 mm×7,5 cm) được nối với cột TSK gel G4000PW (7,5 mm×30 cm) và cột TSK gel G3000PW (7,5 mm×30 cm). Các cột này được rửa giải ở lưu lượng là 0,5 mL/phút bằng NaNO_3 0,3 N chứa NaN_3 0,02% Fig. 2A, Fig. 2B, và Fig. 2C lần lượt thể hiện đường cong phân bố phân tử lượng của polysacarit trong chất chiết SH, chất chiết SH1, và chất chiết SHD1, và các kết quả định lượng được tóm lược trên bảng 4 đến bảng 6.

Bảng 4: Sự phân bố phân tử lượng của chất chiết SH

Đỉnh	MW	DPw	Tỷ lệ phần trăm diện tích đỉnh (%)
A	1104367,8	6816,97	14,32
B	597417,5	3687,65	2,49
C	303789,7	1875,13	12,82
D	153091,2	944,90	2,85
E	13734,4	84,67	4,36
F	7683,3	47,32	4,16
G	3698,5	22,72	9,17

H	2182,2	13,36	8,47
I	1376,5	8,39	23,11
J	684,3	4,11	8,60
K	398,8	2,35	7,37
L	185,0	1,09	2,29

Theo dữ liệu được cung cấp trên Fig. 2A và bảng 4, khoảng 2 phần 3 số polysacarit trong chất chiết SH dạng bột có phân tử lượng nhỏ hơn 100 KD. Mặt khác, đối với chất chiết SH1 dạng bột thu được từ chất chiết AM phân tử lượng lớn, polysacarit với phân tử lượng lớn hơn 100 KD chiếm gần một nửa tổng số đường (xem Fig. 2B và bảng 5).

Bảng 5: Sự phân bố phân tử lượng của chất chiết SH1

Đỉnh	MW	DP _w	Tỷ lệ phần trăm diện tích đỉnh (%)
A	1099926,5	6789,56	18,63
B	573379,5	4156,55	5,90
C	316191,0	1951,69	18,67
D	153105,0	944,98	5,10
E	14066,1	86,72	0,59
F	7131,0	43,91	4,00
G	4106,7	25,24	5,56
H	2256,0	13,81	13,06
I	1282,0	7,80	16,15
J	670,3	4,03	6,95
K	398,8	2,35	3,52
L	183,5	1,33	1,86

Khi bột SH1 phân tử lượng lớn được xử lý tiếp bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion, phân đoạn thu được với polysacarit tích điện dương và trung tính chiếm ưu thế có nhiều hơn các polysacarit phân tử lượng lớn. Dữ liệu trên Fig. 2C và bảng 6 thể hiện rằng hơn 75% polysacarit trong chất chiết SHD1 dạng bột có phân tử lượng lớn hơn 100 KD.

Bảng 6: Sự phân bố phân tử lượng của chất chiết SHD1

Đỉnh	MW	DPw	Tỷ lệ phần trăm vùng đỉnh (%)
A	1023005,0	6314,73	16,23
B	523071,5	3228,73	11,32
C	393198,4	2427,04	18,04
D	206803,6	1276,45	14,66
E	143597,4	886,29	14,74
F	64782,8	399,78	10,56
G	20795,2	128,25	6,60
H	2946,0	18,07	4,64
I	787,0	4,75	3,21

Thành phần monosacarit của chất chiết AM theo sáng chế được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký trao đổi ion hiệu năng cao với thiết bị phát hiện ampe kế được tạo xung (HPAEC-PAD), và kết quả tương ứng được trình bày trên bảng 7 (được biểu diễn ở dạng giá trị trung bình $\pm$ S.D. từ ba mẻ độc lập).

Bảng 7: Thành phần monosacarit của chất chiết AM (theo phần trăm số mol, %mol)

	Fuc	Rha	Ara	Gal	Glc	Man	Xyl	Glc A
SH	6,2 $\pm$ 0,4	40,4 $\pm$ 0,6	5,4 $\pm$ 0,3	8,5 $\pm$ 0,2	28,1 $\pm$ 0,4	4,4 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,4
SH1	7,2 $\pm$ 0,4	44,2 $\pm$ 1,5	4,7 $\pm$ 0,1	7,6 $\pm$ 0,2	25,3 $\pm$ 0,7	4,0 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,4	3,9 $\pm$ 0,2
SHD1	8,3 $\pm$ 0,5	59,1 $\pm$ 2,7	4,4 $\pm$ 0,4	7,2 $\pm$ 0,6	12,1 $\pm$ 1,1	1,1 $\pm$ 2,0	1,2 $\pm$ 0,7	6,6 $\pm$ 1,1

* Fuc: fucoza, Rha: rhamnoza, Ara: arabinoza, Gal: Galactoza, Glc: glucoza, Man: mannoza, và Glc A: axit glucuronic.

* Gal A, axit galacturonic, không phát hiện được trong tất cả các mẫu

Dữ liệu trên bảng 7 chỉ ra rằng monosacarit phong phú nhất trong ba chất chiết AM được chiết bằng nước nóng theo sáng chế là rhamnoza, mà chiếm khoảng 40 đến 60 % mol dựa trên tổng các monosacarit. Ngược lại, dữ liệu trên bảng 2 cho thấy rằng trong chất chiết được điều chế bằng cách chiết bằng nước lạnh, monosacarit phong phú nhất là mannoza (khoảng 46 đến 56 % mol), với rhamnoza nhiều thứ hai (khoảng 18 đến 27 % mol). Mặt khác, mannoza chỉ chiếm tỷ lệ nhỏ (ít hơn 5 % mol) trong chất chiết AM thu được theo phương pháp chiết bằng nước nóng theo sáng chế.

Chất chiết SHD1 dạng bột được tiếp tục tiến hành phân tích liên kết glycosyl. Vấn đề, sau trình tự permethyl hóa, thủy phân, khử bằng NaBD₄, và axetyl hóa, liên kết glycosyl

được làm sáng tỏ bằng cách sử dụng phổ GC-MS và chỉ số lưu giữ trên cột HP5-MS của sản phẩm alditol axetat được O-metyl hóa tạo thành được ghi nhận. Các kết quả được tóm tắt trong bảng 8.

Dữ liệu trên bảng 8 chỉ ra rằng liên kết glycosyl quan trọng nhất là liên kết 3-rhap (32,59%), sau đó là 4-rhap (14,76%) và 2,3-rhap (6,12%). Cùng với nhau, ba liên kết glycosyl hàng đầu này chiếm nhiều hơn một nửa số liên kết glycosyl.

Bảng 8: Liên kết glycosyl của chất chiết SHD1

	Liên kết	Hàm lượng đường (%)	Diện tích đỉnh (%)
Fucoza	T-fucp	8,9	4,28
	3-fucp		3,33
	2,3-fucp		1,28
Rhamnoza	2-rhap	63,3	4,89
	3-rhap		32,59
	4-rhap		14,76
	2,3-rhap		6,12
	3,4-rhap		4,92
Arabinoza	3-arap	4,7	4,7
Galactoza	T-galp	7,7	6,19
	6-galp		0,87
	2,6-galp		0,66
Glucoza	T-glcp	13,0	1,06
	2-glcp		1,65
	4-glcp		1,97
	6-glcp		5,36
	4,6-glcp		2,92
Manoza		1,2	
Xyloza		1,3	

Bột SHD1 lại được tiến hành phương pháp sắc ký cột DEAE để tách tiếp các thành phần dựa trên mật độ điện tích của chúng. Các kết quả được cung cấp trên các sắc ký đồ Fig. 3A (tổng lượng đường) và Fig. 3B (khối lượng (%)) với SHD1, hàm lượng của axit uronic với tổng lượng đường). Việc phân tích thành phần của dòng thoát ra và dịch rửa giải từ phương pháp sắc ký được thực hiện như đã mô tả ở trên, và kết quả được tóm lược trên bảng 9.

Bảng 9: Phân tích thành phần của các phân đoạn DEAE trong chất chiết SHD1

Phân đoạn	W đến SHD1 (%)	Axit uronic (%)
SHD1-dòng thoát ra	22,8%	Không xác định
SHD1-dịch rửa giải	77,2%	29,85

Ví dụ 3: Hoạt tính kháng virus của chất chiết AM đối với Enterovirus

Hiệu quả kháng virus và hoạt tính gây độc với tế bào của chất chiết AM được lần lượt nghiên cứu bằng thử nghiệm trung hòa và thử nghiệm MTT. Các kết quả được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD từ bốn giếng, trừ khi được quy định khác.

Các tế bào RD được nuôi trong môi trường Eagle được cải biến của Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (DMEM), được bổ sung huyết thanh thai bò (FBS) 10%. EV71/TWN/4643/1998 thu được từ Jen-Ren Wang, National Cheng Kung University (Tainan, Taiwan); EV71/CA/BrCr/1970, chủng gốc của EV71 (số truy nhập ATCC: VR 784), thu được từ ATCC. EV71/TWN/1743/1998 và TWN/2231/1998.

Đối với thử nghiệm trung hòa, việc ức chế tác dụng gây bệnh cho tế bào gây ra bởi Enterovirus trên tế bào RD được xác định. Lớp đơn tế bào RD trên các đĩa 96 giếng (6000 tế bào/giếng) được cho lây nhiễm virus EV71 và được xử lý bằng các nồng độ theo chuỗi của chất chiết AM. Để bám dính, các tế bào được ủ ở 37°C trong 1 giờ; sau khi hấp thụ, các đĩa tế bào bị nhiễm được phủ 50 μ l DMEM ở 37°C trong 48 giờ. Sau đó, các đĩa này được cố định bằng cách bổ sung 100 μ l formaldehyt 0,5% trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, formaldehyt được loại bỏ và mẫu được nhuộm bằng 0,1% tím tinh thể trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được rửa và làm khô, và mật độ tế bào trong mỗi giếng được đo ở 570 nm. Nồng độ cần để chất chiết AM làm giảm tác dụng gây bệnh cho tế bào do virus là 50% so với đối chứng âm chỉ chứa virus được biểu diễn dưới dạng 50% liều hữu hiệu (EC_{50}).

Đối với thử nghiệm MTT, tế bào RD được cấy trong các vi đĩa 96 giếng (30000 tế bào/giếng), và được nuôi cấy trong thiết bị ủ được làm ẩm trong 24 giờ. Môi trường nuôi cấy sau đó được thay thế bằng môi trường chứa chất chiết AM ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 0,048 đến 50 mg/ml. Nhóm đối chứng âm tính được nuôi cấy trong DMEM mà không chứa chất chiết AM, và nhóm trống không chứa tế bào cũng như môi trường nuôi cấy, cũng được bao gồm. Các tế bào được ủ trong 72 giờ, sau đó môi trường nuôi cấy

được loại bỏ và 20 μ l dung dịch 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromua (MTT) (1 mg/mL trong DMEM) được bổ sung vào mỗi giếng. Các tế bào được ủ trong 4 giờ nữa, và dung dịch MTT sau đó được loại bỏ. Tiếp theo, 200 μ l HCl 0,04N trong isopropanol được bổ sung vào mỗi giếng để hòa tan tinh thể formazan. Sau đó các đĩa được đọc trên máy đọc vi đĩa (BIOtAK, Bristol, UK) ở 570 nm (OD_{570}). CC_{50} , nồng độ dẫn đến chết 50% số tế bào so với đối chứng không được xử lý được tính theo phương pháp Reed-Muench.

Được tóm tắt trong bảng 10 dưới đây là các giá trị EC_{50} và CC_{50} , cũng như chỉ số chọn lọc (SI), tỷ lệ của CC_{50} với EC_{50} , của chất chiết AM theo sáng chế và chất chiết được chiết bằng nước lạnh.

Bảng 10: Hoạt tính kháng virus của chất chiết AM đối với EV71/TW/4643/1998

Các mẫu	EC_{50} (μ g/ml)	CC_{50} (μ g/ml)	SI
FE-L-APO	76 ± 0	>25000	>329
SH	21 ± 3	>25000	>1190
SH1	8 ± 0	>25000	>3125
SHD1	$3 \pm 0,15$	>25000	>8333
SHR1	13 ± 089	>25000	>1923

Dữ liệu trên bảng 10 chứng tỏ rằng chất chiết AM theo sáng chế (ví dụ, các chất chiết SH, SH1, SHD1 và SHR1) đã thể hiện hiệu quả kháng virus tốt hơn, như được chứng tỏ bằng các giá trị EC_{50} thấp hơn đáng kể, so với chất chiết FE-L-APO thông thường. Tham chiếu đến các phép phân tích thành phần được trình bày ở trên trong ví dụ so sánh và ví dụ 1, người ta suy đoán được rằng hoạt tính kháng virus của chất chiết AM theo sáng chế phần lớn là do thành phần polysaccharit được chứa trong đó. Việc so sánh hoạt tính kháng virus giữa các chất chiết SH và SH1 cũng tiết lộ thêm rằng hàm lượng polysaccharit có phân tử lượng cao (ví dụ, lớn hơn 100 KD) dường như có hiệu quả hơn trong việc ức chế sự lây nhiễm virus. Ngoài ra, hàm lượng polysaccharit trung tính và tích điện dương thậm chí còn hữu hiệu hơn về mặt giá trị EC_{50} thấp nhất của nó trong số tất cả các nhóm được thử nghiệm.

Nên lưu ý rằng mặc dù giá trị EC_{50} của chất chiết SHR1 có các polysaccharit tích điện âm chiếm ưu thế là cao hơn giá trị EC_{50} của chất chiết SH1 và chất chiết SHD1, nhưng nó

thấp hơn giá trị EC_{50} của chất chiết SH. Các kết quả này một lần nữa cho thấy rằng các polysaccharit có phân tử lượng cao hơn (ví dụ, lớn hơn 100 KD) có hiệu quả hơn trong việc bảo vệ tế bào chủ chống lại sự lây nhiễm EV. Mặt khác, các kết quả cũng chỉ ra rằng phân đoạn chứa hầu hết thành phần phân tử lượng nhỏ (ví dụ, các phân tử có phân tử lượng nhỏ hơn 100 KD) đã thể hiện là không có hoạt tính kháng virus đối với EV71 (dữ liệu không được thể hiện).

Hơn thế nữa, dữ liệu trên bảng 10 chỉ ra rằng tất cả các chất chiết AM theo sáng chế có tính chọn lọc cao đối với virus EV nhưng không chọn lọc các tế bào RD có chỉ số chọn lọc lớn hơn 1000, đề xuất rằng các chất chiết AM như vậy không gây độc tính với tế bào ở liều hữu hiệu của chúng.

Phân đoạn SHD1-dòng thoát ra và phân đoạn SHD1-dịch rửa giải được điều chế ở trên cũng được tiến hành thử nghiệm trung hòa để xác định hoạt tính kháng virus của chúng. Các kết quả từ thử nghiệm giống nhau được tóm lược trên bảng 11. Dữ liệu trên bảng 11 đề xuất rằng khi các thành phần trong chất chiết SHD1 được tách tiếp dựa trên mật độ điện tích bề mặt của chúng, phân đoạn với các thành phần tích điện dương và trung tính chiếm ưu thế (SHD1-dòng thoát ra) có hiệu quả hơn trong việc bảo vệ tế bào chủ chống lây nhiễm EV hơn là phân đoạn có các thành phần tích điện âm (SHD1-dịch rửa giải). Mặt khác, do hầu hết các thành phần trong SHD1-dịch rửa giải có phân tử lượng lớn hơn 100 KD (do phân đoạn này thu được từ các dịch chiết SH1 và SHD1), nên giá trị EC_{50} của SHD1-dịch rửa giải thấp hơn giá trị EC_{50} của chất chiết SH.

Bảng 11: Hoạt tính kháng virus của chất chiết AM chống lại EV71/TW/4643/1998

Các mẫu	EC_{50} 1 ($\mu\text{g/ml}$)	EC_{50} 2 ($\mu\text{g/ml}$)	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
SHD1	2,82	2,39	$2,61 \pm 0,30$
SHD1-dòng thoát ra	2,24	2,61	$2,43 \pm 0,26$
SHD1-dịch rửa giải	14,51	16,42	$15,47 \pm 1,35$

Các triệu chứng lâm sàng của việc lây nhiễm enterovirus ở giai đoạn sớm bao gồm HFMD và viêm họng mụn nước. Các triệu chứng này là phổ biến với bệnh lây nhiễm gây ra bởi các enterovirus khác. Vì thế, người ta mong muốn cung cấp chất chiết AM kháng virus hiệu quả kháng enterovirus phổ rộng. Các virus khác EV71/4643, các tác giả sáng chế cũng đánh giá hiệu quả kháng virus của chất chiết SHD1 trên

EV71/CA/BrCr/1970 (Kiểu gen A), EV71/TWN/1743/1998 (Kiểu gen B), EV71/TW/2231/1998 (Kiểu gen C), virus Coxsackie A6, Coxsackie A10, Coxsackie A16, Coxsackie B3, virus cúm, virus gây mụn rộp (Herpes simplex virus) typ 1 và typ 2 (HSV-1, HSV-2) bằng phản ứng trung hòa, và các kết quả được tóm tắt trên bảng 12 (được biểu diễn bằng giá trị trung bình $\pm$ S.D. từ ba thử nghiệm giống nhau). Các Coxsackievirus A6, A10, A16, B3, HSV-1 và HSV-2 được phân lập từ các mẫu thử lâm sàng trong phòng thí nghiệm virus học lâm sàng của bệnh viện Chang Gung Memorial Hospital (Linkou, Taiwan).

Bảng 12. Hoạt tính kháng virus của chất chiết SHD1 chống lại các virus khác nhau

Virut	EC ₅₀ (μ g/ml)	CC ₅₀ (μ g/ml)	SI
EV71/BrCr (kiểu gen A)	27	>25000	>925,9
EV71/1743 (kiểu gen B)	14	>25000	>1785,7
EV71/2231 (kiểu gen C)	13	>25000	>1923,0
EV71/4643 (kiểu gen C)	3 $\pm$ 0,15	>25000	>8333
Coxsackie A6	>1000	>25000	Không có
Coxsackie A10	5,72 $\pm$ 0,14	>25000	>4370
Coxsackie A16	1,31 $\pm$ 0,05	>25000	>19083
Coxsackie B3	667 $\pm$ 9	>25000	>37,4
Cúm A/WSN/33	333 $\pm$ 77	>25000	>75
HSV-1	21,37 $\pm$ 1,82	>25000	>1170
HSV-2	2,21 $\pm$ 0,04	>25000	>11312

Dữ liệu trên bảng 12 chỉ ra rằng ngoại trừ SHD1 theo sáng chế thể hiện hiệu quả ức chế và tính chọn lọc thỏa đáng đã thể hiện đối với các chủng virus EV. Ngoài ra, chất chiết SHD1 theo sáng chế khá hữu hiệu trong việc ức chế các virus Coxsackie A10, Coxsackie A16, HSV-1, và HSV-2. Nên lưu ý là các giá trị EC₅₀ của SHD1 chống lại HSV-1 (86,58 $\pm$ 11,91 μ g/ml) và HSV-2 (10,03 $\pm$ 0,54 μ g/ml) cao hơn các giá trị EC₅₀ của SHD1, đề xuất rằng chất chiết SHD1 có hiệu quả hơn trong việc ức chế sự lây nhiễm virus HSV-1 và HSV-2. Ngoài ra, giá trị EC₅₀ của chất chiết SHD1 chống lại virus Coxsackie B3 và cúm A/WSN/33 cũng chấp nhận được.

Để xác định (các) giai đoạn có thể của vòng đời virus được hướng đích bởi các chất chiết AM theo sáng chế, các thử nghiệm thời gian bổ sung và thời gian loại bỏ được thực hiện.

Đối với thử nghiệm thời gian bổ sung (xem, Fig. 4A), tại thời điểm -1, các tế bào RD trong các đĩa 6 giếng được tiếp xúc với virus EV71/TW/4643/1998 (tỷ lệ gây nhiễm (multiplicity of infection - MOI) = 2) và được phép bám dính trong một giờ, và thời điểm “0” được chỉ định là thời gian lây nhiễm. Các tế bào RD được xử lý bằng 6 µg/ml chất chiết SHD1 ở các khoảng thời gian định trước. Dịch nổi và các viên được thu hoạch lúc 8 giờ sau khi lây nhiễm, và tải lượng virus được xác định bằng thử nghiệm vết tan. Các kết quả, như được tóm lược trên Fig. 4B chỉ ra rằng chất chiết SHD1 ức chế một cách đáng kể quá trình sao chép của virus ở giai đoạn sớm của quá trình lây nhiễm virus. Khi chất chiết SHD1 được bổ sung 2 giờ (thời điểm -2) và 1 giờ (thời điểm -1) trước khi lây nhiễm, chất chiết SHD1 có thể làm giảm 89% và 90% tải lượng virus so với đối chứng chứa virus. Mặt khác, đối với chất chiết SHD1 được bổ sung tại các thời điểm lây nhiễm (thời điểm 0) và 1, 3, và 5 giờ sau khi lây nhiễm, hiệu quả ức chế của mỗi nhóm chỉ lần lượt là 24%, 13%, 11%, và 18%.

Đối với thử nghiệm thời gian loại bỏ (xem Fig. 4C), 6 µg/ml SHD1 được bổ sung trước khi tế bào bị nhiễm. Sau đó chất chiết AM được loại bỏ ở các khoảng thời gian chỉ định bằng cách thay thế môi trường nuôi cấy bằng môi trường E2 mới. Các tế bào được thu hoạch sau 8 giờ và tải lượng virus cũng được xác định bằng thử nghiệm vết tan. Các kết quả được tóm lược trên Fig. 4D. Theo Fig. 4D, khi chất chiết SHD1 được loại bỏ tại thời điểm -1 (ví dụ, trước khi có sự bám dính của virus), tải lượng virus là 114% so với đối chứng chứa virus. Mặt khác, khi chất chiết SHD1 được loại bỏ ở các thời điểm “0”, “+1”, “+3”, và “+5”, thì tải lượng virus chỉ lần lượt là 20%, 20%, 20% và 16%.

Kết hợp lại với nhau, các kết quả này đề xuất rằng chất chiết AM theo sáng chế (ví dụ, chất chiết SHD1) thể hiện hiệu quả ức chế đáng kể ở giai đoạn sớm trong quá trình lây nhiễm EV.

Thử nghiệm sau đây được thực hiện để làm sáng tỏ thêm rằng hiệu quả ức chế của chất chiết AM theo sáng chế là do việc tác động trực tiếp đến virus EV (ví dụ,

trực tiếp loại trừ virus) hay là tác động đến quá trình lây nhiễm ở giai đoạn sớm (ví dụ, can thiệp vào sự tương tác giữa virus và tế bào chủ).

Trong pha ban đầu, 1×10^5 P.F.U. EV71/TW/4643/1998 được trộn với 24 µg/ml chất chiết SHD1 hoặc không có chất chiết SHD1 trong ba giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, trong pha thứ hai, hỗn hợp được pha loãng khoảng 10000 lần trước khi thực hiện thử nghiệm vết tan.

Kết quả, như được tóm lược trên Fig. 4E chỉ ra rằng nhóm được xử lý bằng SHD1, tải lượng virus là 114% so với nhóm đối chứng không được xử lý bằng chất chiết SHD1. Như có thể đánh giá được, trong nhóm được xử lý bằng SHD1, đầu tiên virus được xử lý bằng chất chiết SHD1 ở nồng độ (24 µg/ml) cao hơn giá trị EC_{50} của chất chiết (~2-3 µg/ml), và sau khi làm loãng, nồng độ của chất chiết SHD1 thấp hơn giá trị EC_{50} của nó. Vì thế, có thể là trường hợp chất chiết SHD1 đã trực tiếp tác động lên chính virus EV, tải lượng virus bị giảm đáng kể trong nhóm xử lý, do hầu hết virus sẽ bị mất hoạt tính lây nhiễm khi xử lý ban đầu bằng chất chiết SHD1 liều lượng cao. Tuy nhiên, kết quả trong thử nghiệm vết tan lại đề xuất khác. Tải lượng virus đáng kể quan sát được trong nhóm được điều trị bằng SHD1 chỉ ra rằng chất chiết SHD1 không tác động lên chính virus EV.

Đánh giá từ khả năng tạo vết tan trong nhóm được điều trị bằng SHD1 sau khi làm loãng và xem xét kết quả từ các thử nghiệm thời gian bổ sung và thời gian loại bỏ, nhiều khả năng là chất chiết AM theo sáng chế có thể can thiệp vào giai đoạn sớm của quá trình lây nhiễm virus, như bước gắn hoặc bám dính.

Ví dụ 4: Hiệu quả trị liệu của SHD1 trên chuột nhắt ICR bị nhiễm EV71/MP4

Vào ngày 0, chuột ICR 10 ngày tuổi được chủng EV71/MP4 ($3,0 \times 10^6$ PFU/chuột) qua đường trong màng bụng. Một giờ sau khi chủng, chuột được dùng chất chiết SHD1 với lượng 0,375, 0,75, 1,5, hoặc 3 mg/kg/ngày bằng cách tiêm trong màng bụng hoặc dùng chất chiết SHD1 qua đường miệng với lượng 1, 5, hoặc 0 mg/kg/ngày một lần hàng ngày trong 10 ngày liên tiếp. Các điểm lâm sàng và tỷ lệ sống sót được theo dõi trong 15 ngày (từ ngày 0 đến ngày 14); các kết quả được tóm lược trên Fig. 5A (đối với trường hợp tiêm trong màng bụng chất chiết SHD1) và Fig. 5B (đối với trường hợp dùng qua đường

miệng chất chiết SHD1). Các điểm lâm sàng bằng "0" nghĩa là khỏe mạnh, "1" nghĩa là yếu, "2" nghĩa là liệt một chân, "3" nghĩa là liệt hai chân, và "4" nghĩa là chết.

Dữ liệu trên Fig. 5A chứng tỏ rằng chuột nhắt được điều trị bằng chất chiết SHD1 với lượng 1,5 hoặc 3 mg/kg/ngày thể hiện điểm lâm sàng tốt hơn, so với chuột đối chứng được điều trị bằng chất dẫn thuốc. Mặt khác, đối với nhóm dùng qua đường miệng, chuột nhắt được nhận chất chiết SHD1 với lượng 5 mg/kg đã thể hiện là ít cải thiện so với chuột nhắt được điều trị bằng chất dẫn thuốc, trong khi đó sự cải thiện đáng kể quan sát được ở chuột nhắt được điều trị bằng chất chiết SHD1 với lượng 50 mg/kg. Ngoài ra, không thấy có sự đáp ứng phụ thuộc liều lượng một cách đáng kể liên quan đến hiệu quả trị liệu đối với liều lượng được thử nghiệm.

Ví dụ 5: Hoạt tính kháng virus của chất chiết AM chống lại virus hợp bào hô hấp

Hoạt tính kháng virus (EC_{50}) của chất chiết AM theo sáng chế chống lại virus RSV được nghiên cứu bằng cách sử dụng thử nghiệm làm giảm tác dụng gây bệnh cho tế bào (CPE) ban đầu bằng cách sử dụng tế bào MA-104 làm tế bào chủ. CC_{50} được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm độc tính in vitro trên cơ sở đo trung tính (Nr).

Dữ liệu được tóm tắt trên bảng 13 chỉ ra rằng chất chiết SH1 theo sáng chế có tác dụng bảo vệ nhiều hơn 3,55 lần đối với hoạt tính lây nhiễm RSV.

Bảng 13: Hoạt tính kháng virus của chất chiết AM đối với RSV

Các mẫu	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	SI
FE-L-APO	611 ± 8	>10000	>59
SH1 (SP-100KD)	211	>10000	>476
SHR1	325 ± 10	>10000	>30
SHD1	$91,5 \pm 5,5$	10000	>109

Ví dụ 6: Hoạt tính kháng virus của chất chiết AM đối với virus Ebola

Hoạt tính kháng virus Ebola (EC_{50}) của chất chiết AM theo sáng chế được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm giảm vết tan bằng cách sử dụng tế bào Vero CCL81 làm tế bào chủ; CC_{50} được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm độc tính in vitro trên cơ sở đo trung tính (Nr). Trong ví dụ này, chất chiết FE-L-APO thông thường và Favipiravir, chất kháng virus, được sử dụng làm đối chứng.

Kết quả, như được tóm lược trên bảng 14, tiết lộ rằng chất chiết SH1 đã ức chế sự lây nhiễm của virus Ebola ở giá trị EC_{50} là 500 $\mu\text{g/ml}$, với chỉ số chọn lọc lớn hơn 20, và giá trị EC_{50} của FE-L-APO trên virus Ebola là 270, với chỉ số chọn lọc lớn hơn 37.

Bảng 14: Hoạt tính kháng virus của chất chiết AM đối với virus Ebola/Zaire

Các mẫu	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	SI
FE-L-APO	270	>10000	>37
SH1 (SP-100KD)	500	>10000	>20
Favipiravir (đối chứng dương)	96 μM	>1000 μM	>10

Để chứng tỏ thêm mối quan hệ giữa hoạt tính kháng virus Ebola và các thành phần trong phân đoạn của chất chiết AM, các tế bào CellTiter96 bị nhiễm Ebola (MTS) được xử lý bằng các phân đoạn Allophycoyanin (APC), C-phycoyanin (C-PC), FE-L-APO(H), và FE-L-APO (T) từ chất chiết FE-L-APO, và các phân đoạn SHD1 và SHR1 từ SH1 được tiến hành thử nghiệm giảm tải lượng virus bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza thời gian thực.

Dữ liệu như được tóm lược trên bảng 15 chỉ ra rằng phân đoạn Allophycoyanin hữu hiệu nhất trong việc ức chế sự lây nhiễm Ebola trong số bốn phân đoạn FE-L-APO. Mặt khác, giá trị EC_{50} của SHD1 thấp hơn đáng kể so với giá trị EC_{50} của SHR1. Ngoài ra, cả hai phân đoạn SHR1 và SHD1 hữu hiệu hơn trong việc ức chế lây nhiễm Ebola hơn bốn phân đoạn FE-L-APO.

Dữ liệu này cũng thể hiện rằng các chất chiết SHD1 và SHR1 đạt được giá trị EC_{90} (trong đó quá trình sao chép của virus bị ức chế khoảng 90%) lần lượt ở 9,99 $\mu\text{g/ml}$ và 30,4 $\mu\text{g/ml}$. Ngược lại, giá trị EC_{90} cho tất cả các phân đoạn FE-L-APO đều lớn hơn 400 $\mu\text{g/ml}$.

Bảng 15: Hoạt tính kháng virus của các phân đoạn khác đối với virus Ebola/Zaire

Các mẫu	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	EC_{90} ($\mu\text{g/ml}$)	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	SI	SI_{90}^*
Allophycoyanin	1,77	>400	>400	>226	--
C-phycoyanin	242	>400	>400	>2	--
FE-L-APO (H)	149	>400	>400	>3	--
FE-L-APO (T)	>400	>400	>400	--	--
SHD1	1,35	9,99	>400	>296	>40

SHR1	9,1	30,4	>400	>44	>13
E64D (đối chứng dương)	<1,26 μ M	5,69 μ M	>400 μ M	>317	>70

*SI90: chỉ số chọn lọc, tỷ lệ của CC50 và EC90.

Ví dụ 7: Hoạt tính kháng virus của chất chiết AM đối với virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn

Ví dụ này nghiên cứu hoạt tính ức chế của chất chiết AM đối với virus gây dịch tiêu chảy cấp (PEDV). Trong ví dụ này, đầu tiên chất chiết AM được trộn với virus. Cụ thể, DMEM (50 μ l/giếng), 50 μ l FE-L-APO (2 mg/ml) hoặc SH (20 mg/ml), và 100 μ l/giếng dung dịch virus PEDV chứa 1000 PFU, 100 PFU, hoặc 10 PFU được tuần tự thêm vào mỗi giếng trong đĩa 96 giếng. Đối với đối chứng dương, 100 μ l/giếng DMEM được trộn với 100 μ l/giếng các nồng độ virus khác nhau, trong khi đó đối với đối chứng âm, 200 μ l DMEM được sử dụng. Sau đó đĩa này được ủ ở 37°C trong 60 phút. Sau đó, hỗn hợp (200 μ l) từ mỗi giếng được bổ sung vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng chứa tế bào Vero (1×10^5 tế bào/giếng) mà được ủ qua đêm. Sau đó đĩa này được ủ ở 37°C trong 5 ngày. Tác dụng gây bệnh cho tế bào ban đầu được xác định và các kết quả được tóm lược trên bảng 16.

Các kết quả (từ ba thử nghiệm giống nhau) cho thấy rằng các tế bào này không thể ức chế sự hình thành các vết tan virus với sự có mặt của FE-L-APO ở 1000 PFU, 100PFU, 10 PFU virus. Mặt khác, chất chiết SH làm giảm đáng kể vết tan virus PEDV ở tế bào Vero khoảng 55-75%, so với đối chứng dương.

Bảng 16: Thử nghiệm ức chế virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn

	PFU		
	1000	100	10
FE-L-APO	1002	102	13
	1010	104	12
	1006	105	9
	450	34	5
SH	467	25	3
	462	30	4
	1002	100	9
Mẫu đối chứng dương	1005	103	12
	998	102	11
Mẫu đối chứng âm	0	0	0

Ví dụ 8: Hoạt tính kháng virus của chất chiết AM chống lại virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn

Trong thử nghiệm này, hoạt tính ức chế của chất chiết AM theo sáng chế đối với virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV) được nghiên cứu. Trong ví dụ này, đầu tiên chất chiết AM được trộn với tế bào chủ. Ngắn gọn, tế bào Vero (1×10^5 tế bào/giếng) được nuôi cấy trong các đĩa 96 giếng qua đêm. Sau đó, 50 μ l FE-L-APO (2 mg/ml) và SH (20 mg/ml) được bổ sung vào mỗi giếng, và đĩa này được để ở 37°C trong 60 phút. Sau đó, dung dịch virus PRRSV (100 μ l/giếng) chứa 1000 PFU, 100 PFU, hoặc 10 PFU được bổ sung vào mỗi giếng. Đối với đối chứng dương, 100 μ l/giếng DMEM được trộn với 100 μ l/giếng các nồng độ virus khác nhau, trong khi đó đối với đối chứng âm tính, 200 μ l DMEM được sử dụng. Sau đó, đĩa này được ủ ở 37°C trong 5 ngày và tác dụng gây bệnh cho tế bào ban đầu được xác định hàng ngày.

Các kết quả (từ ba thử nghiệm giống nhau), như được tóm lược trên bảng 17, chỉ ra rằng khi các tế bào bị nhiễm bằng 1000PFU PRRSV trước khi bổ sung chất chiết, cả chất chiết FE-L-APO lẫn chất chiết SH đều không ức chế hiệu quả sự lây nhiễm virus. Tuy nhiên, đối với các tế bào bị nhiễm bởi 100 PFU PRRSV, chất chiết SH theo sáng chế đã bảo vệ hơn 90% tế bào chủ không bị nhiễm PRRSV.

Bảng 17: Thử nghiệm ức chế virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn I

		PFU	
		1000	100
FE-L-APO	1001	20	1
	1020	18	2
	1012	28	1
	998	6	7
SH	995	5	6
	1003	3	9
	1003	105	10
Mẫu đối chứng dương	1005	102	12
	1003	106	9
Mẫu đối chứng âm	0	0	0

Trong thử nghiệm này, đầu tiên chất chiết AM được trộn với PRRSV. Ngắn gọn, đầu tiên chất chiết AM được trộn với virus. Cụ thể, DMEM (50 μ l/giếng), 50 μ l FE-L-APO (2 mg/ml) hoặc SH (20 mg/ml), và 100 μ l/giếng dung dịch virus PRRSV chứa 1000 PFU, 100

PFU, hoặc 10 PFU được tuân tự thêm vào mỗi giếng trong đĩa 96 giếng. Đối với đối chứng dương, 100 µl/giếng DMEM được trộn với 100 µl/giếng các nồng độ virus khác nhau, trong khi đó đối với đối chứng âm, 200 µl DMEM được sử dụng. Sau đó đĩa này được ủ ở 37°C trong 60 phút. Sau đó, hỗn hợp (200 µl) từ mỗi giếng được bổ sung vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng chứa tế bào Vero (1×10^5 tế bào/giếng) mà được ủ qua đêm. Sau đó đĩa này được ủ ở 37°C trong 5 ngày. Tác dụng gây bệnh cho tế bào ban đầu được xác định và các kết quả được tóm lược trên bảng 18.

Các kết quả này chứng tỏ rằng khi virus được xử lý trước bằng chất chiết SH theo sáng chế, tác dụng lây nhiễm virus giảm khoảng 50%, thậm chí ngay cả khi các tế bào bị nhiễm với nồng độ cao virus PRRSV (ví dụ, 1000 PFU). Ngoài ra, khi tế bào bị nhiễm bởi nồng độ thấp PRRSV (ví dụ, 100 hoặc 10 PFU), sự ức chế hoàn toàn đối với việc lây nhiễm PRRSV đạt được.

Bảng 18: Thử nghiệm ức chế virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn II

	PFU		
	1000	100	10
FE-L-APO	679	0	0
	691	0	0
	698	0	0
SH	510	0	0
	520	0	0
	493	0	0
Mẫu đối chứng dương	1004	106	8
	1007	104	12
	999	101	11
Mẫu đối chứng âm	0	0	0

Ví dụ 9: Hoạt tính kháng virus của chất chiết AM sau khi xử lý bằng các enzym tiêu hóa

Trong ví dụ này, chất chiết AM theo sáng chế được xử lý bằng enzym tiêu hóa, và giá trị EC_{50} được xác định để chứng tỏ chất chiết AM có bị mất hoạt tính kháng virus của nó khi được tiêu thụ qua đường miệng hay không.

Bột SH được hòa tan trong nước cất hai lần ở nhiệt độ trong phòng, và độ pH được điều chỉnh đến 6. α -amylaza (100 µl/1 g mẫu) được bổ sung vào dung dịch SH trong bể nước 95°C (tốc độ lắc: 40 vòng/phút) trong 30 phút để tiêu hóa (1-4)- α -D-glucan. Sau đó mẫu được làm mát xuống nhiệt độ trong phòng và độ pH được điều chỉnh đến 7,5 bằng cách

bổ sung NaOH 6N. Proteaza (50 mg/1 g mẫu) được bổ sung vào mẫu ở bồn nước 60°C (tốc độ lắc: 40 vòng/phút) trong 30 phút để loại bỏ thành phần protein. Mẫu lại được làm mát xuống nhiệt độ trong phòng và độ pH được điều chỉnh đến 4,5 bằng cách bổ sung HCl 6N. Amyloglucosidaza (300 µl/1 g mẫu) được bổ sung vào mẫu trong bồn nước 60°C (tốc độ lắc: 40 vòng/phút) trong 30 phút để tiêu hóa α -D-1,4 ~ 1,6 glucan có khả năng tiêu hóa. Để ức chế hoạt tính enzym, mẫu được làm nóng đến nhiệt độ 100°C trong 30 phút, và sau đó được làm mát xuống nhiệt độ trong phòng. Mẫu này được ly tâm ở tốc độ 3500 vòng/phút trong 30 phút. Dịch nổi được làm kết tủa bằng 4 thể tích rượu, và sản phẩm kết tủa được thu gom làm mẫu SH-EA. Các mẫu SH và SH-EA được tiến hành thử nghiệm trung hòa như được mô tả ở trên để xác định khả năng ức chế tác dụng gây bệnh cho tế bào gây ra bởi EV71/TW/4643/1998 trên tế bào RD.

Dữ liệu được tóm lược trên bảng 19 chỉ ra rằng SH-EA (tức là, chất chiết SH được xử lý bằng các loại enzym tiêu hóa khác nhau) có giá trị EC_{50} thấp hơn của chất chiết SH. Các dữ liệu này gợi ý rằng chất chiết SH theo sáng chế có thể tạo ra hoạt tính kháng virus mong muốn thậm chí sau khi nó được tiêu hóa. Vì thế, rất có khả năng là chất chiết AM, khi được dùng qua đường tiêu hóa (ví dụ, dùng qua đường miệng), có thể giữ được hoạt tính kháng virus in vivo của nó.

Bảng 19: Hoạt tính kháng virus của chất chiết AM sau khi xử lý bằng các enzym tiêu hóa

Các mẫu	EC_{50} (µg/ml)
SH	14,25 ± 0,35
SH-EA	10,62 ± 0,24

Người ta sẽ hiểu được rằng phần mô tả về các phương án trên đây được nêu chỉ nhằm mục đích ví dụ và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thực hiện các cải biến khác nhau. Phần mô tả, phần ví dụ và các dữ liệu trên cung cấp sự mô tả hoàn chỉnh về cấu trúc và việc sử dụng các phương án được lấy làm ví dụ của sáng chế. Mặc dù các phương án khác của sáng chế được mô tả trên đây mới mức độ cụ thể nhất định, hoặc tham chiếu đến một hoặc nhiều phương án riêng lẻ, thì người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thực hiện nhiều biến đổi với phương án được bộc lộ mà không nằm ngoài ý tưởng hoặc phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chất chiết *Arthrospira maxima* (chất chiết AM), chứa ít nhất 30% (% khối lượng) tổng số đường trong chất chiết AM này, ít nhất 60% (% khối lượng) polysacarit tích điện dương và/hoặc trung tính dựa trên tổng số đường trong chất chiết, và ít nhất 30 % mol rhamnoza, trong đó liên kết glycosyl chiếm ưu thế nhất là 3-rhap.
2. Chất chiết AM theo điểm 1, trong đó hàm lượng của tổng số đường trong chất chiết AM này là từ 30 đến 75% (% khối lượng).
3. Chất chiết AM theo điểm 1, trong đó chất chiết AM có nguồn gốc từ phân đoạn phân tử lượng lớn có thể thu được bằng cách sử dụng màng lọc có ngưỡng phân tử lượng (MWCO) là 100 KD.
4. Chất chiết AM theo điểm 1, trong đó hàm lượng của polysacarit tích điện dương và/hoặc trung tính dựa trên tổng số đường trong chất chiết là từ 60 đến 100% (% khối lượng).
5. Chất chiết AM theo điểm 1, trong đó chất chiết AM này có nguồn gốc từ phân đoạn phân tử lượng lớn có thể thu được bằng cách sử dụng màng lọc có ngưỡng phân tử lượng (MWCO) là 100 KD, và chứa ít nhất 60% (% khối lượng) polysacarit tích điện dương và/hoặc trung tính dựa trên tổng số đường trong chất chiết.
6. Chế phẩm dinh dưỡng, chứa tá dược chấp nhận được về mặt dinh dưỡng và chất chiết AM theo điểm 1.
7. Dược phẩm để điều trị sự lây nhiễm virus gây ra bởi virus đường ruột (Enterovirus - EV), virus hợp bào hô hấp (respiratory syncytial virus - RSV), virus herpes ở người (Human Herpesvirus - HHV), virus Ebola, virus gây dịch tiêu chảy cấp ở lợn (porcine epidemic diarrhea virus - PEDV), hoặc virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus - PRRSV), hoặc rối loạn do lây nhiễm virus trong đó dược phẩm này chứa chất chiết AM theo điểm 1 và tá dược được dùng.

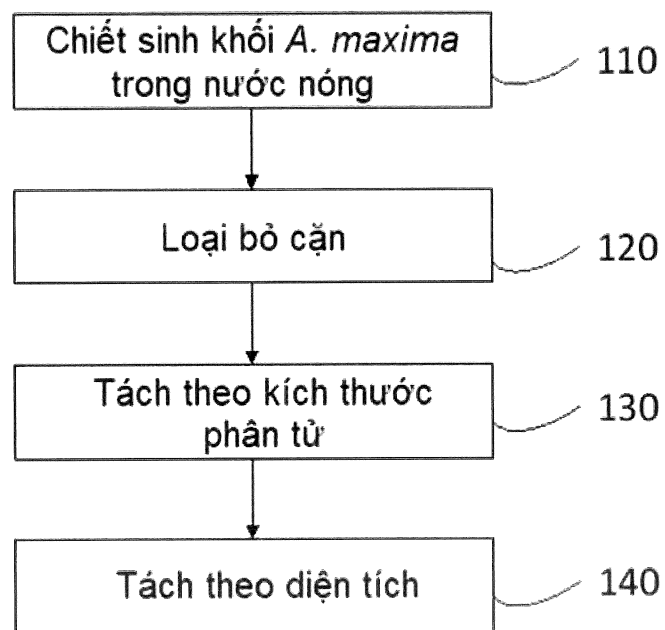


FIG. 1

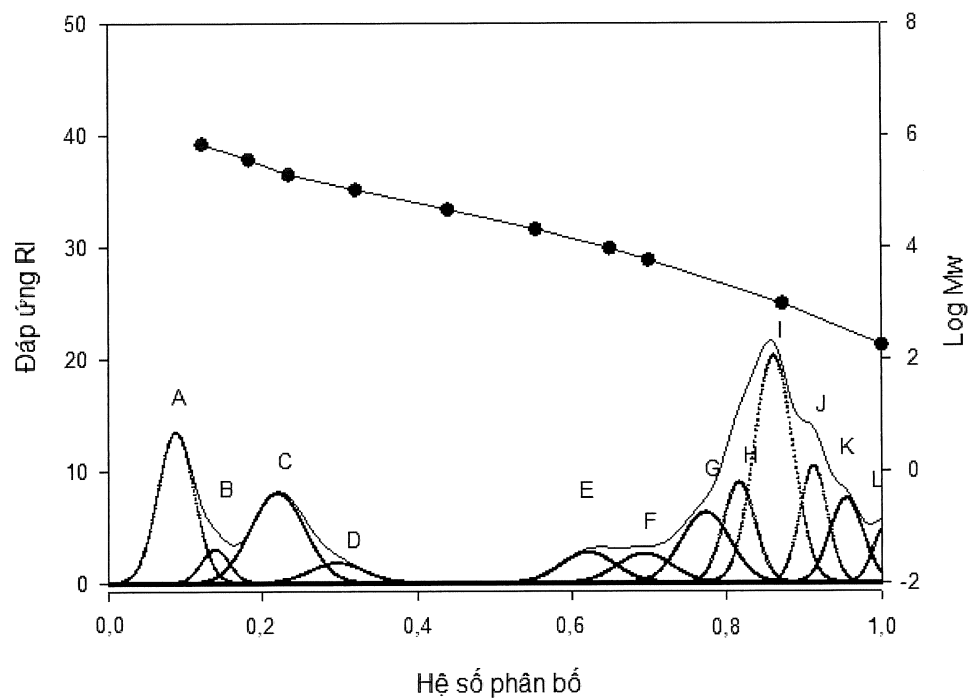


FIG. 2A

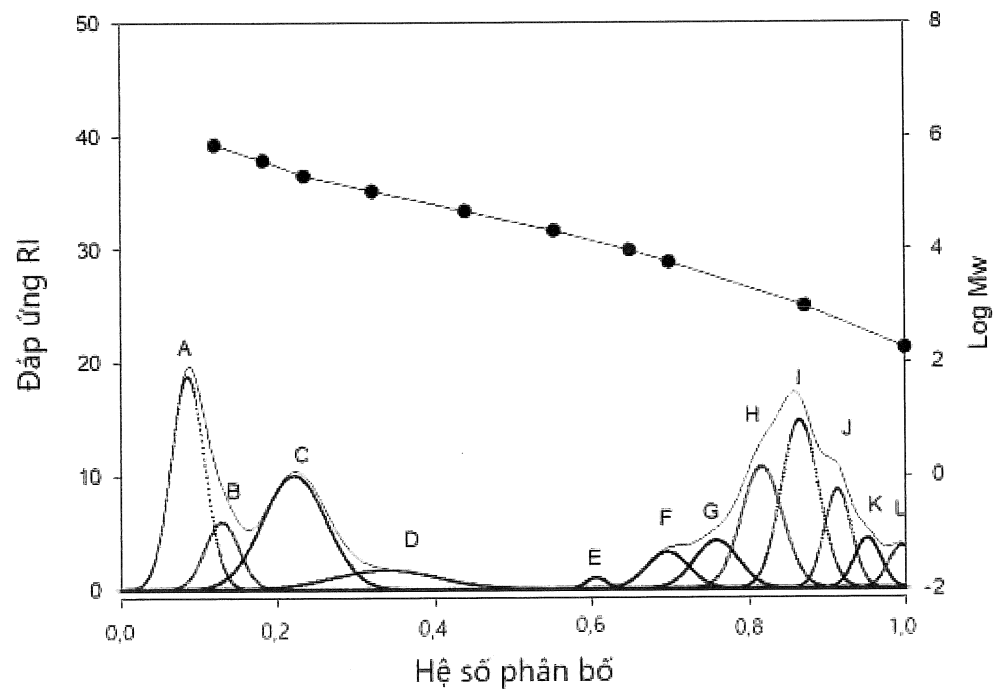


FIG. 2B

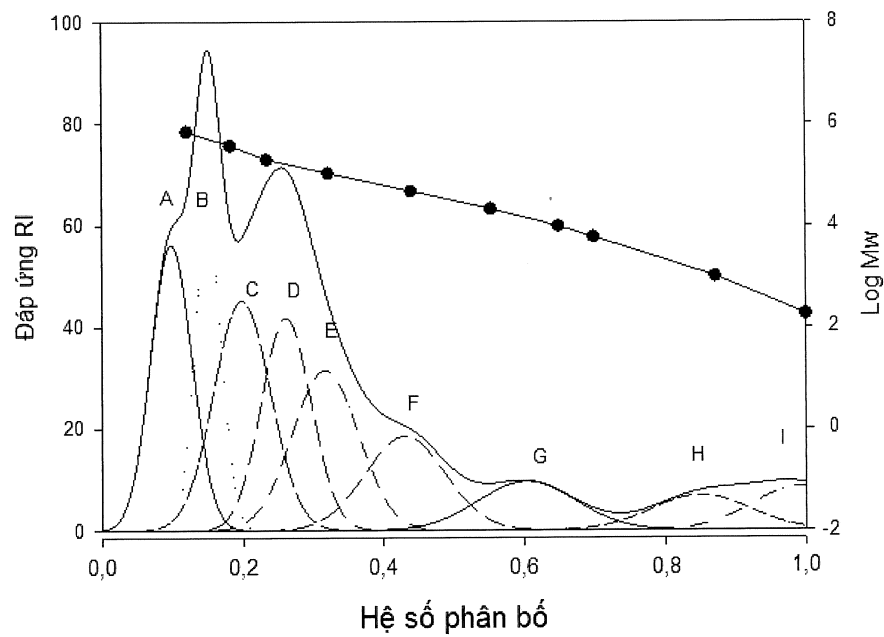


FIG. 2C

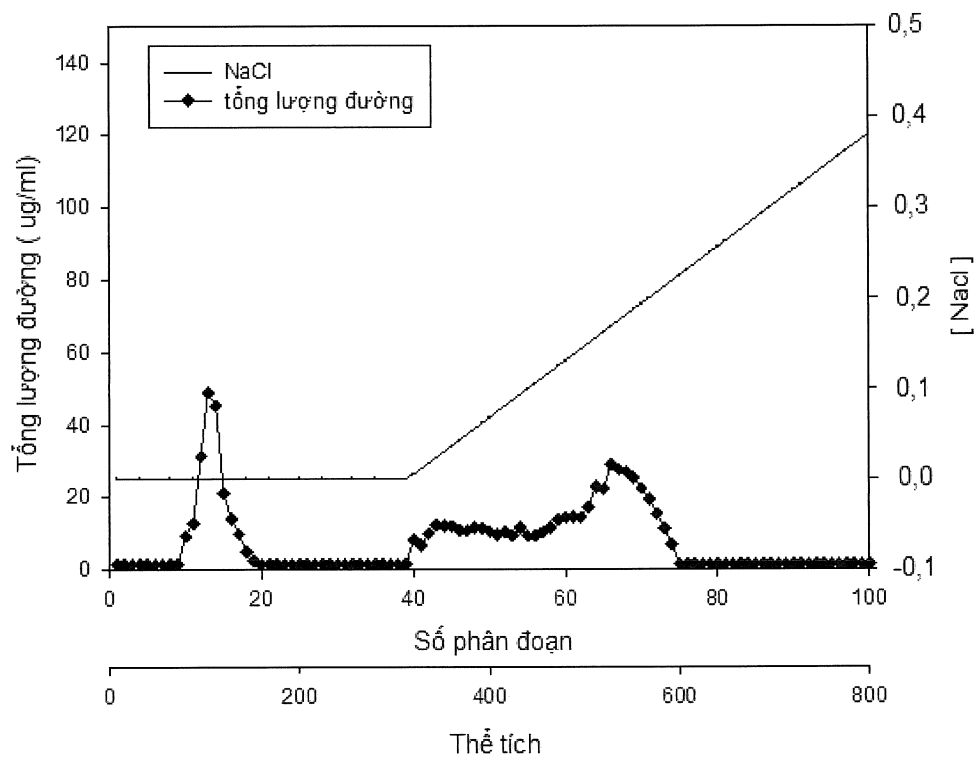


FIG. 3A

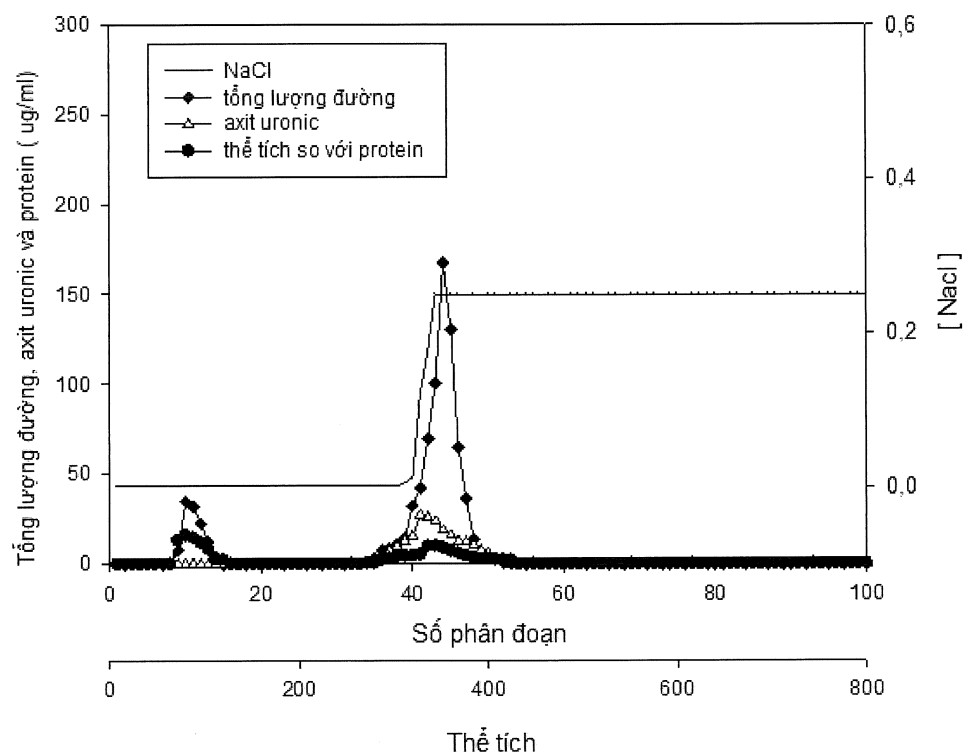
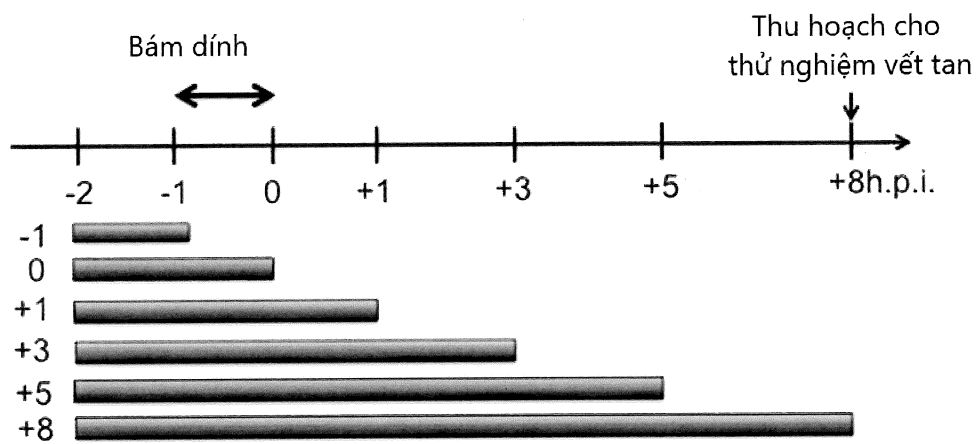
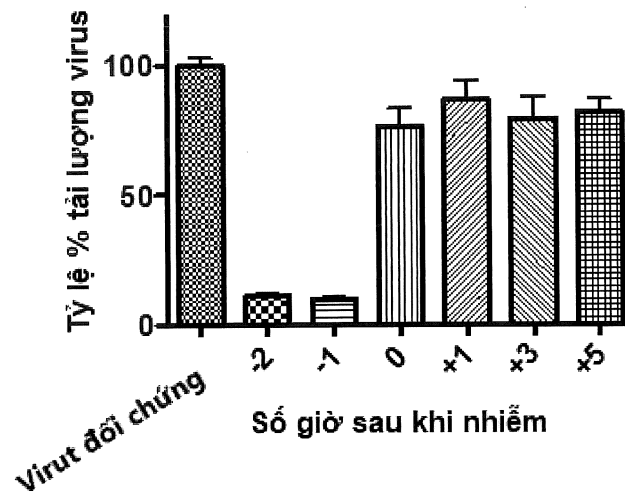
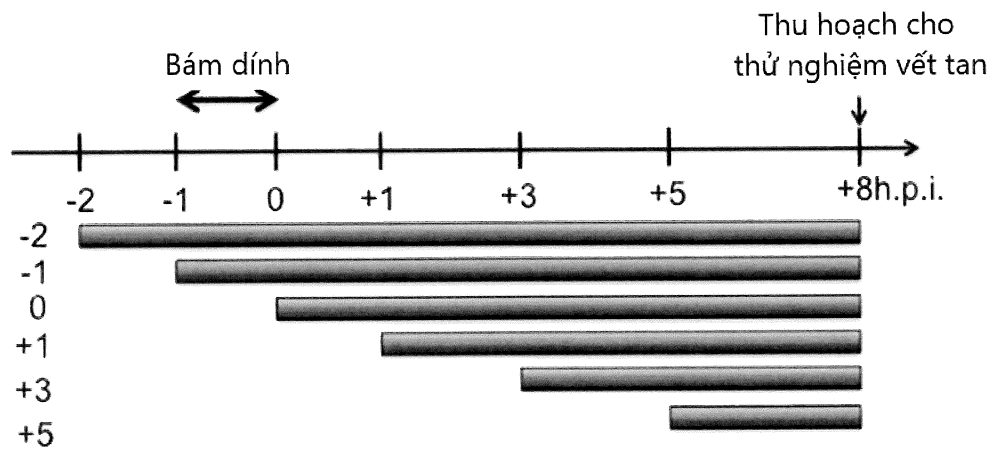


FIG. 3B



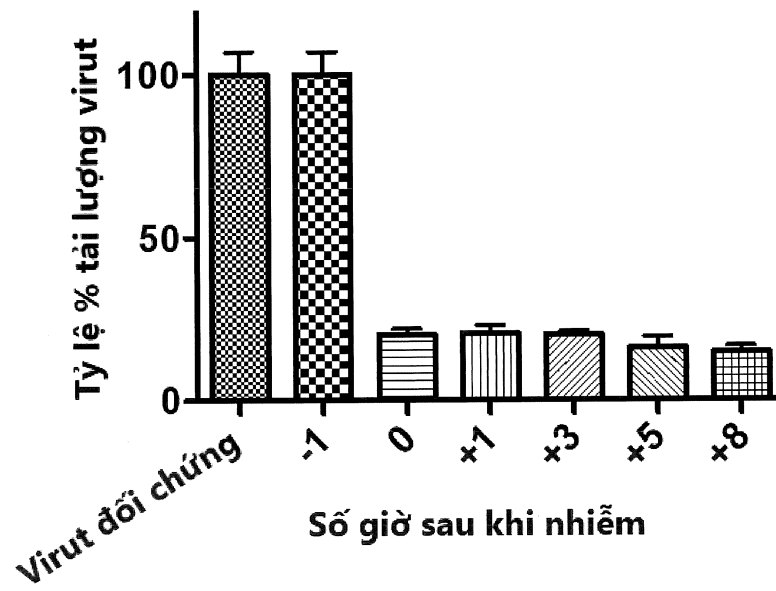


FIG. 4D

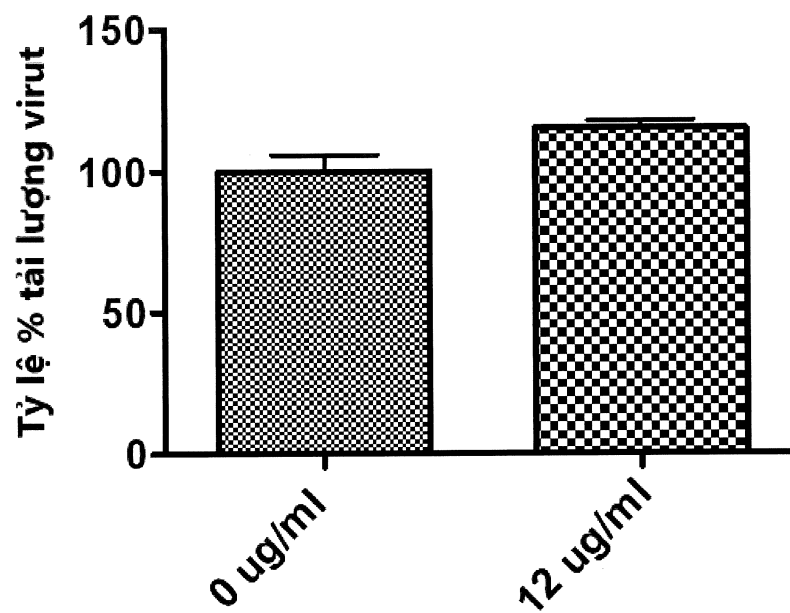


FIG. 4E

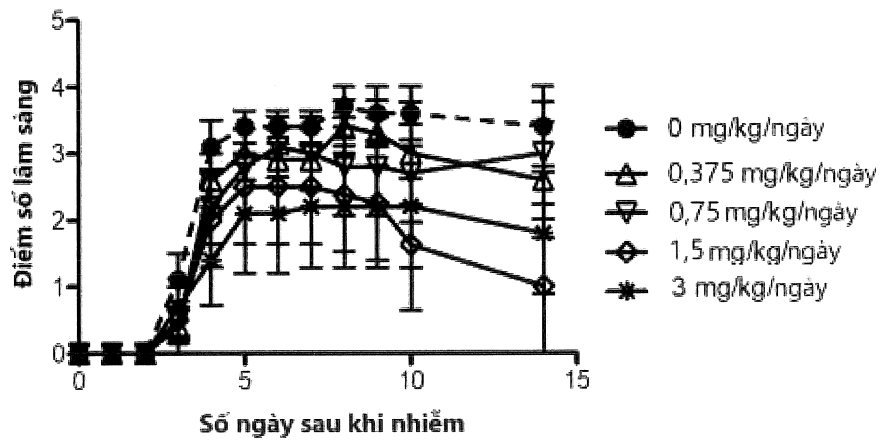


FIG. 5A

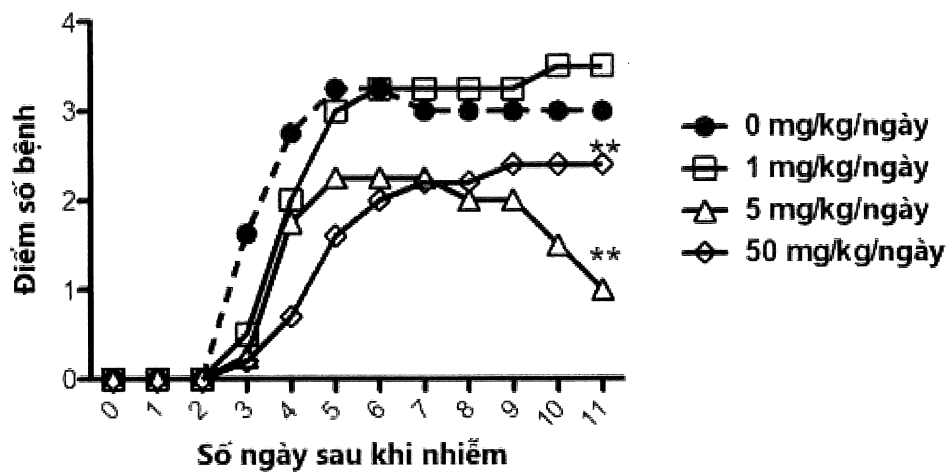


FIG. 5B