



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0046128
(51)^{2020.01} A61K 35/612; A61P 29/00; A61K (13) B
35/618

(21) 1-2020-03345 (22) 21/12/2018
(86) PCT/IB2018/060482 21/12/2018 (87) WO 2019/123400 27/06/2019
(30) 2017905181 22/12/2017 AU
(45) 26/05/2025 446 (43) 26/10/2020 391A
(73) PHARMALINK INTERNATIONAL LIMITED (CN)
C/- Third Floor, 31 C-D Wyndham Street, Central, Hong Kong
(72) Charles HODGSON (NZ); Stephen MYERS (AU); Christopher OLIVER (AU).
(74) Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)

(54) TỔ HỢP GỒM PHẦN CHIẾT LIPIT TỪ CON TRAI VÀ DẦU TỪ LOÀI
NHUYỄN THỂ

(21) 1-2020-03345

- (57) Sáng chế liên quan đến tổ hợp hoặc chế phẩm chứa lipit từ sinh vật biển, mà được sử dụng để điều trị bệnh viêm hoặc cơn đau. Cụ thể, sáng chế đề xuất tổ hợp chứa phần chiết lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể. Sáng chế còn bộc lộ quy trình tạo ra dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng phospholipit khoảng 50% hoặc cao hơn.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

[0001] Nói chung, sáng chế liên quan đến tổ hợp gồm các lipit từ sinh vật biển. Cụ thể, sáng chế đề cập đến tổ hợp lipit thu được từ *Perna canaliculus* và loài nhuyễn thể, các hợp phần và các chế phẩm chứa các tổ hợp này và sử dụng các tổ hợp này và các hợp phần trong việc điều trị bệnh. Sáng chế còn đề cập đến quy trình tạo ra dầu từ loài nhuyễn thể và sử dụng chúng trong các tổ hợp và các hợp phần.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

[0002] Viêm là đáp ứng thích ứng thiết yếu về mặt sinh lý đối với tổn thương và nhiễm trùng, mà không có nó thì người và động vật không sống sót nổi. Chức năng của nó để loại bỏ nguyên nhân ban đầu của tổn thương, loại bỏ các yếu tố gây tổn thương và khởi đầu việc sửa chữa cấu trúc và chức năng của mô. Pha cấp tính sớm của nó thường được đặc trưng bởi hiện tượng nóng, đau, tấy đỏ và sưng. Hệ quả thông thường của trạng thái viêm cấp là khôi phục và sửa chữa vết thương, tuy nhiên, các đáp ứng viêm mạn tính dài hạn và cấp tính không tương xứng ở các tình trạng như nhiễm trùng có thể là có hại.

[0003] Điều quan trọng là nay đã thấy rằng bệnh viêm mạn tính có liên quan đến bệnh lý học của nhiều bệnh ảnh hưởng đến tất cả các mô và các bộ phận, kể cả bệnh viêm xương khớp mạn tính, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh tim mạch, bệnh mạch máu não, bệnh đường hô hấp, bệnh tự miễn và chứng thiếu cơ; thực sự đã thấy rằng bệnh viêm mạn tính có liên quan đến chính quá trình lão hóa.

[0004] Đáp ứng đối với quá trình viêm, đã phát triển nhiều loại thuốc, hiệu quả nhất là các thuốc glucocorticoid steroid mà có khả năng ngăn chặn viêm quá mức. Tuy nhiên, liệu pháp điều trị bằng thuốc chứa steroid bị hạn chế ở ứng dụng lâm sàng phổ biến của nó do các tác dụng phụ đáng kể, và thường bị giới hạn ở việc chỉ sử dụng ngắn hạn. Nhóm thứ hai bao gồm các thuốc viêm được phát triển được gọi là các thuốc kháng viêm không steroid (NSAIDs) như ibuprofen v.v. – xem Bảng 1. Đã nhận thấy rằng aspirin có hoạt tính kháng viêm và nó là một phần của nhóm thuốc kháng viêm thứ hai này. Các thuốc này là an toàn hơn các thuốc steroid và có thể được sử dụng cho nhiều tình trạng bệnh lý viêm mạn tính hơn, như bệnh viêm xương khớp mạn tính.

Bảng 1: Danh mục thuốc kháng viêm không steroid (NSAIDs) thường được sử dụng

Tên chung quốc tế (tên gốc)	Tên biệt dược
celecoxib	Celebrex
điclofenac	Cambia, Cataflam, Dyloject, Flector, Pennsaid, Solaraze, Voltaren, Voltaren-XR, Zipsor, Zorvolex, Arthrotec (kết hợp với misoprostol)
điflunisal	Không có tên biệt dược nào hiện đang được lưu hành trên thị trường
etodolac	Không có tên biệt dược nào hiện đang được lưu hành trên thị trường
fenoprofen	Nalfon
flurbiprofen	Ansaid
ibuprofen	Advil, Caldolor, Advil cho trẻ em, Elixsure IB cho trẻ em, Motrin cho trẻ em, Ibu-Tab, Ibuprohm, Motrin IB, Motrin cho bệnh đau nửa đầu, Profen, Tab-Profen, Duexis (kết hợp với famotidin), Reprexain (kết hợp với hydrocodon), Vicoprofen (kết hợp với hydrocodon)
indomethaxin	Indocin, Tivorbex
ketoprofen	Không có tên biệt dược nào hiện đang được lưu hành trên thị trường
ketorolac	Sprix
axit mefenamic	Ponstel
meloxicam	Mobic
nabumeton	Không có tên biệt dược nào hiện đang được lưu hành trên thị trường
naproxen	Aleve, Anaprox, Anaprox DS, EC-Naprosyn, Naprelan, Naprosyn, Treximet (kết hợp với sumatriptan), Vimovo (kết hợp với esomeprazol)
oxaprozin	Daypro
piroxicam	Felden
sulindac	Clinoril
tolmetin	Không có tên biệt dược nào hiện đang được lưu hành trên thị trường

[0005] Prostaglandin có vai trò then chốt ở đáp ứng viêm, và sự có mặt của chúng tăng đáng kể ở mô bị viêm, góp phần vào hiện tượng đau và sốt bằng cách làm tăng nhiệt độ, và làm giãn nở mạch máu, mà gây tấy đỏ và sưng tại nơi chúng được giải phóng. Các NSAID là các chất ức chế cạnh tranh vị trí của cả xyclooxygenaza-1 (COX-1) và xyclooxygenaza-2 (COX-2), và bằng cách đó làm giảm mức độ tổng hợp prostaglandin. Bằng cách làm giảm mức độ

tạo ra prostaglandin, NSAID giúp làm giảm mức độ khó chịu của cơn sốt và giảm viêm và cơn đau kèm theo. NSAIDS thường được dùng để điều trị tình trạng cấp tính và tình trạng mạn tính đặc trưng bởi cơn đau và trạng thái viêm, như bệnh viêm xương khớp mạn tính, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh đau đầu và bệnh đau nửa đầu, và sốt. Tuy nhiên, NSAIDS cũng gây ra các vấn đề đáng kể về tính an toàn, và có thể thể hiện độc tính đối với dạ dày-ruột, thận và tim mạch. Ví dụ, aspirin có thể khiến chảy máu dạ dày trong vòng vài ngày sử dụng và vào tháng 7 năm 2015, Cơ quan Quản lý Dược phẩm và Thực phẩm Mỹ đã nhắc lại cảnh báo trước đó về sự nguy hiểm đối với tim của các loại thuốc giảm đau NSAID thông thường, không kể aspirin. Các loại này bao gồm ibuprofen (Advil, Motrin) và naproxen (Aleve) và các NSAID chỉ kê đơn.

[0006] Do đó, cần có các chất trị liệu kháng viêm khác thay thế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

[0007] Mục đích của sáng chế là đề xuất tổ hợp gồm lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, chế phẩm chứa phần chiết lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, và quy trình tạo ra dầu từ loài nhuyễn thể. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng một số tổ hợp nhất định gồm lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể có thể tạo ra theo cách có lợi tác dụng ức chế có tính cộng hợp hoặc hiệp đồng đối với sự sản sinh hoặc giải phóng một hoặc nhiều thực thể trung gian tiền viêm liên quan đến quá trình viêm. Theo một số phương án, các tổ hợp theo sáng chế có thể vì thế là cách điều trị bệnh mới đối với các rối loạn đặc trưng bởi hiện tượng viêm, hoặc có thành phần viêm. Theo một số phương án, các tổ hợp theo sáng chế có thể là cách mới để điều trị cơn đau, như đau liên quan đến viêm. Phạm vi của sáng chế được xác định theo các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

[0008] Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tổ hợp gồm lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể. Tổ hợp gồm lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể có thể được làm thích ứng để dùng riêng rẽ hoặc đồng thời cho đối tượng. Theo một số phương án, tổ hợp là chế phẩm chứa lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể.

[0009] Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tổ hợp gồm, hoặc về cơ bản gồm, lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể. Tổ hợp gồm lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể có thể được làm thích ứng để dùng riêng rẽ hoặc đồng thời cho đối tượng. Theo một số phương án,

tổ hợp là chế phẩm bao gồm hoặc chủ yếu bao gồm lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể.

[0010] Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tổ hợp gồm lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể để dùng trong việc điều trị bệnh. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tổ hợp gồm lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể để dùng trong việc điều trị bệnh viêm ở đối tượng. Sáng chế còn đề xuất tổ hợp gồm lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể để dùng trong việc điều trị cơn đau ở đối tượng. Tổ hợp gồm lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể có thể được làm thích ứng để dùng riêng rẽ hoặc đồng thời cho đối tượng. Theo một số phương án, tổ hợp là chế phẩm chứa lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể.

[0011] Theo khía cạnh khác, sáng chế bộc lộ phương pháp điều trị bệnh viêm ở đối tượng có nhu cầu, bao gồm việc cho đối tượng dùng nêu trên tổ hợp gồm lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể. Sáng chế còn bộc lộ phương pháp điều trị đau ở đối tượng có nhu cầu, bao gồm việc cho đối tượng nêu trên dùng tổ hợp gồm lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể. Tổ hợp gồm lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể có thể được làm thích ứng để dùng riêng rẽ hoặc đồng thời cho đối tượng. Theo một số phương án, tổ hợp là chế phẩm chứa lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể.

[0012] Theo khía cạnh khác, sáng chế bộc lộ việc sử dụng lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể trong việc bào chế dược phẩm dạng tổ hợp để điều trị bệnh viêm. Sáng chế còn bộc lộ việc sử dụng lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể trong việc bào chế dược phẩm dạng tổ hợp để điều trị cơn đau. Dược phẩm có thể được làm thích ứng để dùng riêng rẽ hoặc đồng thời. Theo một số phương án, tổ hợp là chế phẩm chứa lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể.

[0013] Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tác nhân tổ hợp để điều trị bệnh viêm, tổ hợp này chứa lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể. Sáng chế còn đề xuất tác nhân tổ hợp để điều trị cơn đau, tổ hợp này chứa lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể. Lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể có thể được làm thích ứng để dùng riêng rẽ hoặc đồng thời cho đối tượng. Theo một số phương án, tác nhân tổ hợp là chế phẩm chứa lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể.

[0014] Theo một số phương án, lipit từ con trai là ở dạng bột trai đã được sấy khô. Theo các

phương án khác, lipid từ con trai là ở dạng chiết xuất lipid thu được từ con trai (“phần chiết lipid từ con trai”). Theo các phương án bổ sung thêm, lipid từ con trai có thể ở dạng tổ hợp hoặc chế phẩm bột của con trai đã được sấy khô và phần chiết lipid từ con trai.

[0015] Theo một số phương án, dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng phospholipit nằm trong khoảng 40% đến 99% trọng lượng, và theo phương án khác nữa hàm lượng phospholipit nằm trong khoảng 50% đến 99% trọng lượng, như khoảng 60% đến 80% trọng lượng.

[0016] Theo một số phương án, tổ hợp theo sáng chế có thể được dùng để điều trị một hoặc nhiều rối loạn ở đối tượng, trong đó rối loạn có yếu tố viêm, và nhờ đó việc ức chế một hoặc nhiều phân tử tiền viêm là có lợi về mặt điều trị. Theo một số phương án, các tổ hợp có thể là thích hợp để điều trị bệnh một hoặc nhiều rối loạn mạn tính.

[0017] Theo một số phương án, như để dùng trong việc điều trị mạn tính viêm, các tổ hợp này có thể loại bỏ, tránh hoặc làm giảm nhẹ theo cách khác mức độ, mức nghiêm trọng hoặc khoảng thời gian kéo dài của một hoặc nhiều tác dụng phụ liên quan đến NSAIDS thông thường hiện có.

[0018] Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình tạo ra dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng phospholipit khoảng 50% hoặc cao hơn, như khoảng 60% hoặc cao hơn, bao gồm các bước:

- (a) cho nguyên liệu nạp là sinh khối của loài nhuyễn thể tiếp xúc với hỗn hợp gồm CO₂ và etanol, để chiết dầu từ loài nhuyễn thể; và
- (b) cho dầu từ loài nhuyễn thể này tiếp xúc với CO₂ để chiết ít nhất là một phần các thành phần lipid không phân cực sao cho dầu có hàm lượng phospholipit ít nhất là 50% trọng lượng.

[0019] Theo một số phương án, dầu từ loài nhuyễn thể thu được theo quy trình này có hàm lượng phospholipit khoảng 60% trọng lượng hoặc nhiều hơn, như ít nhất là khoảng 65% trọng lượng, hoặc 70% trọng lượng, hoặc 75% trọng lượng, hoặc 80% trọng lượng, hoặc 85% trọng lượng, hoặc 90% trọng lượng.

[0020] Sáng chế còn đề xuất quy trình làm giàu hàm lượng phospholipit của dầu từ loài nhuyễn thể.

[0021] Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình làm tăng hàm lượng phospholipit ở dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng phospholipit thấp hơn 50% trọng lượng đến 50% trọng lượng hoặc nhiều hơn, bao gồm bước cho dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng phospholipit thấp hơn 50% trọng lượng tiếp xúc với CO₂ để loại bỏ một cách chọn lọc các thành phần lipit không phân cực.

[0022] Theo một số phương án, dầu thô của loài nhuyễn thể có hàm lượng phospholipit khoảng thấp hơn 50% trọng lượng, như thấp hơn khoảng 40%, hoặc khoảng thấp hơn 30% trọng lượng hoặc 20% trọng lượng. Theo một số phương án, dầu đã được làm giàu thu được bằng cách đó có hàm lượng phospholipit ít nhất là khoảng 55% trọng lượng, hoặc ít nhất là khoảng 60% trọng lượng, hoặc ít nhất là khoảng 65% trọng lượng hoặc ít nhất là khoảng 70% trọng lượng hoặc ít nhất là khoảng 75% trọng lượng hoặc ít nhất là khoảng 80% trọng lượng hoặc ít nhất là khoảng 85% trọng lượng hoặc ít nhất là khoảng 90% trọng lượng.

[0023] Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng phospholipit khoảng 50% trọng lượng hoặc nhiều hơn, (ví dụ, $\geq 60\%$ trọng lượng) thu được theo quy trình theo sáng chế.

[0024] Theo các phương án khác nữa, sáng chế đề xuất dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng phospholipit khoảng 50% hoặc 60% trọng lượng hoặc nhiều hơn để dùng trong các tổ hợp và các chế phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

[0025] **Hình 1A** là đồ thị thể hiện tác dụng ức chế NO ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ (IF γ) theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phân chiết lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, từng phần chiết lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể riêng rẽ, dầu oliu và N-(3-(aminometyl)benzyl)axetamidin (1400W).

[0026] **Hình 1B** là đồ thị thể hiện mức độ giải phóng NO (%) ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ (IF γ) theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phân chiết lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, từng phần chiết lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể riêng rẽ, dầu oliu và N-(3-(aminometyl)benzyl)axetamidin

(1400W).

[0027] **Hình 2A** là đồ thị thể hiện tác dụng ức chế $\text{TNF}\alpha$ ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ ($\text{IF}\gamma$) theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, từng phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể riêng rẽ, dầu oliu và dexamethason.

[0028] **Hình 2B** là đồ thị thể hiện mức độ giải phóng $\text{TNF}\alpha$ (%) ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ ($\text{IF}\gamma$) theo nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, từng phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể riêng rẽ, và dầu ô liu.

[0029] **Hình 3A** là đồ thị thể hiện tác dụng ức chế IL-6 ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ ($\text{IF}\gamma$) theo nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, từng phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể riêng rẽ, dầu oliu và dexamethason.

[0030] **Hình 3B** là đồ thị thể hiện mức độ giải phóng IL-6 (%) ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ ($\text{IF}\gamma$) theo nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, từng phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể riêng rẽ, và dầu ô liu.

[0031] **Hình 4A** là đồ thị thể hiện tác dụng ức chế PGE_2 ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ ($\text{IF}\gamma$) theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, từng phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể riêng rẽ, dầu oliu và diclofenac.

[0032] **Hình 4B** là đồ thị thể hiện mức độ giải phóng PGE_2 (%) ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ ($\text{IF}\gamma$) theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, từng phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể riêng rẽ, và dầu ô liu.

[0033] **Hình 5A** là đồ thị thể hiện mức độ giải phóng NO (%) ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ (IF γ) theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể (LY90 đến LY50).

[0034] **Hình 5B** là đồ thị thể hiện mức độ giải phóng NO (%) ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ (IF γ) theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể (LY50 đến LY10).

[0035] **Hình 6A** là đồ thị thể hiện mức độ giải phóng NO (%) ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ (IF γ) theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể (LY75 đến LY60).

[0036] **Hình 6B** là đồ thị thể hiện mức độ giải phóng NO (%) ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ (IF γ) theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể (LY60 đến LY45).

[0037] **Hình 7** là đồ thị thể hiện isobologram về tác dụng ức chế hiệp đồng NO theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể (LY90 đến LY10).

[0038] **Hình 8A** là đồ thị thể hiện mức độ giải phóng TNF α (%) ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ (IF γ) theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể (LY90 đến LY60).

[0039] **Hình 8B** là đồ thị thể hiện mức độ giải phóng TNF α (%) ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ (IF γ) theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể (LY60 đến LY30).

[0040] **Hình 8C** là đồ thị thể hiện mức độ giải phóng TNF α (%) ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ (IF γ) theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể (LY40 đến LY10).

[0041] **Hình 9A** là đồ thị thể hiện mức độ giải phóng $\text{TNF}\alpha$ (%) ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ ($\text{IF}\gamma$) theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể (LY70 đến LY55).

[0042] **Hình 9B** là đồ thị thể hiện mức độ giải phóng $\text{TNF}\alpha$ (%) ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ ($\text{IF}\gamma$) theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể (LY50 đến LY35).

[0043] **Hình 10** là đồ thị thể hiện isobologram về tác dụng ức chế hiệp đồng $\text{TNF}\alpha$ theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể (LY90 đến LY10).

[0044] **Hình 11A** là đồ thị thể hiện mức độ giải phóng IL-6 (%) ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ ($\text{IF}\gamma$) theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể (LY90 đến LY50).

[0045] **Hình 11B** là đồ thị thể hiện mức độ giải phóng IL-6 (%) ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ ($\text{IF}\gamma$) theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể (LY50 đến LY10).

[0046] **Hình 12A** là đồ thị thể hiện mức độ giải phóng IL-6 (%) ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ ($\text{IF}\gamma$) theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể (LY70 đến LY50).

[0047] **Hình 12B** là đồ thị thể hiện mức độ giải phóng IL-6 (%) ở các tế bào RAW264.7 đã được kích thích bởi lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ ($\text{IF}\gamma$) theo các nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể (LY50 đến LY30).

[0048] **Hình 13** là đồ thị thể hiện isobologram về tác dụng ức chế hiệp đồng IL-6 theo nồng độ khác nhau của tổ hợp phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể (LY90 đến LY10).

Mô tả chi tiết sáng chế

[0049] Trong toàn bộ bản mô tả này và các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây, trừ trường hợp chỉ rõ khác, thuật ngữ "chứa" và các biến thể như "có chứa" và "hiện chứa" sẽ được hiểu là ngụ ý bao gồm số nguyên hoặc bước đã nêu hoặc nhóm bao gồm các số nguyên nhưng không loại trừ số nguyên hoặc bước bất kỳ khác hoặc nhóm bao gồm các số nguyên hoặc các bước bất kỳ khác.

[0050] Trong toàn bộ bản mô tả này và các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây, trừ trường hợp chỉ rõ khác thuật ngữ "chủ yếu bao gồm" và các biến thể như "chủ yếu chứa" sẽ được hiểu là cho thấy rằng (các) yếu tố đã nêu là thiết yếu tức là các yếu tố cần thiết theo sáng chế. Thuật ngữ này cho phép sự có mặt của các yếu tố khác không được nêu mà không ảnh hưởng đáng kể các dấu hiệu theo sáng chế nhưng không loại trừ các yếu tố bổ sung mà không được nêu rõ mà có thể ảnh hưởng đến các dấu hiệu cơ bản và các dấu hiệu mới theo sáng chế.

[0051] Các dạng số ít "một" và "nó" bao gồm cả các khía cạnh ở dạng số nhiều trừ trường hợp quy định rõ ràng khác.

[0052] Thuật ngữ "sáng chế" bao gồm toàn bộ phần bộc lộ, các khía cạnh, các phương án và các ví dụ như được bộc lộ trong bản mô tả này.

[0053] Thuật ngữ "khoảng" được dùng trong bản mô tả này để chỉ lượng, trị số hoặc thông số mà có thể thay đổi đến 10%, 5%, hoặc 2% đến 1% lượng, trị số hoặc thông số đã nêu, và bao gồm ít nhất độ dung sai chấp nhận được trong lĩnh vực kỹ thuật này. Khi được sử dụng liên quan đến trị số đã nêu là số nguyên, "khoảng" có thể bao gồm mức biến thiên của một số nguyên theo hướng bất kỳ của trị số đã nêu, ví dụ, "50%", có thể bao gồm 49% và 51%. Khi đặt phân mở đầu cho một khoảng trị số được nêu, nó nhằm để áp dụng cho cả hai giới hạn trên và giới hạn dưới của khoảng này.

[0054] Trừ trường hợp được nêu rõ khác, các dấu hiệu được mô tả dưới đây có thể áp dụng độc lập cho khía cạnh hoặc phương án bất kỳ.

[0055] Thuật ngữ "lipit từ con trai" được dùng trong bản mô tả này để chỉ thành phần lipit chiết được hoặc thu được từ con trai Niu-di-lân môi xanh (NZGL) (hoặc vỏ xanh) (*Perna canaliculus*). Lipit từ con trai có thể bao gồm một hoặc nhiều axit béo mạch dài không no nhiều lần (PUFAs), như ALA, ETA, EPA và DHA, sterol, các sterol este, triglycerit,

carotenoit lipit không phân cực và các thành phần khác của (NZGL) thịt của con trai. Lipit từ con trai có thể ở dạng bột con trai đã được sấy khô, hoặc phân đoạn lipit chiết được từ thịt của con trai (“phần chiết lipit từ con trai”). Còn dự tính rằng “lipit từ con trai” bao hàm hỗn hợp gồm bột của con trai và phần chiết lipit từ con trai, ví dụ, lipit từ con trai có thể được bổ sung bù bằng cách bổ sung bột của con trai vào hoặc ngược lại. Theo một số phương án, lipit từ con trai là phân đoạn lipit đã được phân lập.

[0056] Lipit từ con trai bột có thể được chế biến từ thịt của con trai NZGL tươi (sống), đông lạnh hoặc đã được xử lý bằng nhiệt bằng cách sấy khô thích hợp bất kỳ (ví dụ, sấy khô ở nhiệt độ thấp, sấy khô nhanh hoặc sấy khô trong chân không) và cách nghiền mịn. Ngoài các axit béo (kể cả ALA, ETA, EPA và DHA), bột của con trai thu được bằng cách làm khô thịt của con trai sẽ còn chứa các thành phần có tiềm năng có lợi khác, kể cả các chất khoáng, axit amin, các peptit, các protein, và các glycosaminoglycan (ví dụ chondroitin-4-sulfat và chondroitin-6-sulfat). Quy trình sản xuất bột của con trai là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

[0057] Phần chiết lipit từ con trai có thể thu được từ thịt của con trai NZGL tươi (sống), đã làm đông lạnh, đã được xử lý bằng nhiệt hoặc đã được sấy khô (ví dụ, đã được sấy khô ở nhiệt độ thấp, sấy khô nhanh hoặc dùng trống sấy khô chân không) (ví dụ, dạng bột, sạng sấy phun hoặc dạng nghiền mịn) theo phương pháp thích hợp bất kỳ, như chiết bằng dung môi (ví dụ, axeton hoặc etanol – ví dụ, xem công bố đơn quốc tế số WO2005073354 A1), xử lý bằng enzym (ví dụ, xem công bố đơn quốc tế số WO2006128244) hoặc chiết lỏng siêu tới hạn. Theo một số phương án, phần chiết lipit từ con trai thu được theo cách có lợi bằng cách chiết bằng CO₂ siêu tới hạn từ thịt của con trai đã được sấy khô (ví dụ, đã được sấy khô ở nhiệt độ thấp) (đã được làm ổn định một cách tùy ý để tránh oxy hóa). Phương pháp làm ví dụ để thu nhận phần chiết lipit từ con trai được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO 97/09992 A1. Các phương pháp khác được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

[0058] Theo các phương án được ưu tiên, các quy trình được thực hiện trong các điều kiện sao cho các thành phần có lợi, như các axit béo, hầu như không bị phân hủy và được duy trì ở mức độ đáng kể, ví dụ, xử lý lạnh.

[0059] Một phần chiết lipit từ con trai làm ví dụ thu được theo quy trình này đã được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO 97/09992 A1, còn được gọi là PCSO-524[®] (do Pharmalink

International Limited, Hong Kong cung cấp). PCSO-524[®] chứa vitamin E (0,15% trọng lượng, được bổ sung làm chất bảo quản chống oxy hóa) đã được bổ sung vào và chứa tổ hợp các axit béo tự do, triglycerit, các sterol este, các lipid không phân cực, và các carotenoid (xem tài liệu: Sinclair, A. J. *et al*, 2000), và là nguồn axit béo omega-3 không no mạch dài có nhiều nối đôi, axit eicosapentaenoic (EPA) và axit docosahexaenoic (DHA), cũng như các axit béo mạch dài khác, như axit 5,9,12,15-octadecatetraenoic, axit 5,9,12,16-nona-decatetraenoic, axit 7,11,14,17-eicotetraenoic, và axit 5,9,12,15,18-heneicosapentaenoic. PCSO-254[®] (đã được sản xuất cùng với dầu oliu ở dạng liều đã được bao nang để dùng qua đường miệng), được bán trên thị trường với nhãn hiệu Lyprinol[®] và Omega XL[®], (để dùng cho người), và Antinol[®] (cho chó và mèo).

[0060] Theo một số phương án, phần chiết lipid từ con trai được dùng trong tổ hợp theo sáng chế điều chế được với vitamin E (được bổ sung vào, ví dụ, với lượng khoảng 0,2% trọng lượng, hoặc 0,15% trọng lượng, hoặc 0,1% trọng lượng, hoặc 0,05% trọng lượng hoặc khoảng 0,03% trọng lượng hoặc khoảng 0,01% trọng lượng). Theo một số phương án, lipid từ con trai được sử dụng ở dạng PCSO-254[®], tức là phần chiết lipid từ con trai chứa 0,15% trọng lượng vitamin E. Theo một số phương án lipid từ con trai, tùy ý chứa vitamin E, còn được bào chế tiếp với dầu làm chất mang, như dầu ô liu. Trong khi theo một số phương án, lipid từ con trai là phần chiết lipid từ con trai và chứa vitamin E được bổ sung vào, việc bổ sung vitamin E là tùy ý, và do đó, theo một số phương án, phần chiết lipid từ con trai được sử dụng nguyên chất, tức là không chứa thành phần bổ sung bất kỳ khác, như vitamin E.

[0061] Lipid từ con trai, ở các dạng khác nhau, cũng có thể mua được từ các nguồn cung cấp thương mại.

[0062] Dầu từ loài nhuyễn thể có thể được chế biến từ loài nhuyễn thể thích hợp bất kỳ, bao gồm *Euphausia superba* (loài nhuyễn thể Nam cực), *Euphausia pacifica* (loài nhuyễn thể Thái Bình Dương), *Maganycitiphanes norvegica* (loài nhuyễn thể Bắc), *Euphausia crystallorophias* (loài nhuyễn thể nước đá), *Euphausia frigida*, *Euphausia longirostris*, *Euphausia triacantha* và *Euphausia vallentini*. Theo một số phương án được ưu tiên, dầu từ loài nhuyễn thể thu được từ *Euphausia superba*.

[0063] Lipid từ sinh vật biển chứa các axit béo, đặc biệt là các axit béo omega-3 như EPA và DHA, ở dạng tự do và dạng triglycerit. Tương tự, dầu từ loài nhuyễn thể còn giàu các

axit béo omega-3, tuy nhiên, dầu từ loài nhuyễn thể chứa lượng đáng kể của các phospholipit, khi các axit béo được gắn vào nhóm đầu phosphat thông qua gốc glyxerol. Chính dạng liên kết phospholipit này của các axit béo được hấp thụ hiệu quả hơn vào màng tế bào so với dạng triglyxerit, và nhờ đó nên dễ sinh khả dụng hơn. Các phospholipit điển hình tìm thấy ở dầu từ loài nhuyễn thể có thể bao gồm: phosphatidylcholin, alkyl axyl phosphatidylcholin, phosphatidylinositol, phosphatidylserin, lysophosphatidylcholin, lyso alkyl axyl phosphatidylcholin, phosphatidyletanolamin, alkyl axyl phosphatidyletanolamin, cardiolipin + N-axyl phosphatidyletanolamin, lysophosphatidyletanolamin, và lyso alkyl axyl phosphatidyletanolamin. Dầu từ loài nhuyễn thể còn chứa lượng có thể đánh giá được của astaxanthin, chất chống oxy hóa, mà còn chịu trách nhiệm về màu đỏ của nó.

[0064] Theo một số phương án, dầu từ loài nhuyễn thể chứa phospholipit với lượng ít nhất là khoảng 1% trọng lượng, 5% trọng lượng, 10% trọng lượng, hoặc ít nhất là khoảng 20% trọng lượng. Theo một phương án khác nữa, dầu chứa phospholipit với lượng ít nhất là khoảng 25% trọng lượng hoặc ít nhất là khoảng 30% trọng lượng, hoặc ít nhất là khoảng 35% trọng lượng, hoặc ít nhất là khoảng 40% trọng lượng, hoặc ít nhất là khoảng 45% trọng lượng, hoặc ít nhất là khoảng 50% trọng lượng, hoặc ít nhất là khoảng 55% trọng lượng, hoặc ít nhất là khoảng 60% trọng lượng, hoặc ít nhất là khoảng 65% trọng lượng hoặc ít nhất là khoảng 70% trọng lượng, hoặc ít nhất là khoảng 75% trọng lượng, hoặc ít nhất là khoảng 80% trọng lượng hoặc ít nhất là khoảng 85% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 90% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 95% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 97% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 98% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 99% trọng lượng. Theo một số phương án, dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng phospholipit nằm trong khoảng 40% đến 99% trọng lượng. Theo một số phương án khác, dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng phospholipit nằm trong khoảng 60% đến 99% trọng lượng, ví dụ, nằm trong khoảng 65% đến 90% trọng lượng. Thuật ngữ dầu từ loài nhuyễn thể “đã được làm giàu” được dùng trong bản mô tả này để chỉ dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng phospholipit ít nhất là khoảng 60% trọng lượng. Hàm lượng phospholipit có thể được xác định theo cách thích hợp bất kỳ trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, phân tích ^{31}P NMR.

[0065] Các phương pháp để sản xuất dầu từ loài nhuyễn thể, kể cả dầu từ loài nhuyễn thể giàu phospholipit, là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nói chung, sinh khối của loài nhuyễn thể tươi, đông lạnh và/hoặc đã được xử lý bằng nhiệt (ví dụ, *Euphasia superba* hoặc

Euphasia pacifica) có thể được chiết bằng cách sử dụng các dung môi (ví dụ, rượu, như etanol; keton, như axeton; hoặc dimetoxyetan) và/hoặc chất lỏng siêu tới hạn (ví dụ, CO₂). Một số quy trình làm ví dụ không giới hạn để sản xuất dầu từ loài nhuyễn thể được bộc lộ trong patent Mỹ số 9,028,877, patent Mỹ số 9,375,453, patent Mỹ số 6,800,299, patent Mỹ số 8,828,447, patent Mỹ số 9,150,815, patent Mỹ số 8,383,845, WO2007/123424, WO2011/050474, WO2015/104401 và WO2015/121378. Các phương pháp khác nữa cũng được bộc lộ trong bản mô tả này. Dầu từ loài nhuyễn thể còn có thể được mua từ các nguồn cung cấp thương mại.

[0066] Theo một số phương án có lợi, dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng nước khoảng 5% trọng lượng hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 4%, hoặc 3%, hoặc 2% hoặc 1%, hoặc 0,5% trọng lượng, hoặc thấp hơn. Theo một số phương án, dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng dung môi chiết còn lại khoảng 5% trọng lượng hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 4%, hoặc 3%, hoặc 2% hoặc 1%, hoặc 0,5% trọng lượng, hoặc thấp hơn. Theo một phương án khác nữa, dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng nước khoảng 5% trọng lượng hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 4%, hoặc 3%, hoặc 2% hoặc 1%, hoặc 0,5% trọng lượng, hoặc thấp hơn, và hàm lượng dung môi chiết còn lại khoảng 5% trọng lượng hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 4%, hoặc 3%, hoặc 2% hoặc 1%, hoặc 0,5% trọng lượng, hoặc thấp hơn. Nước và dung môi có thể được loại ra theo cách thích hợp bất kỳ, như làm nóng rất ngắn hoặc nhẹ (ví dụ, 30 phút, hoặc 1 giờ, hoặc 2 giờ hoặc 3 giờ, ở nhiệt độ khoảng hoặc thấp hơn 60°C, hoặc 50°C, hoặc 40°C, và tốt hơn nếu sao cho tính nguyên vẹn của các thành phần cấu thành hầu như không bị tác động), dòng nitơ hoặc làm đông khô nhanh (sấy khô ở nhiệt độ thấp).

[0067] Hoạt tính ức chế của tổ hợp đối với một hoặc nhiều chất trung gian gây viêm như oxit nitric (NO), các xytokin, như các interleukin, (ví dụ, IL-6), prostaglandin (ví dụ, PG-E₂), và TNF α , có thể được dùng để điều trị một hoặc nhiều rối loạn hoặc triệu chứng ở đối tượng, nhờ đó việc ức chế một hoặc nhiều phân tử như vậy là có lợi về mặt điều trị. Cụ thể, tổ hợp theo sáng chế có thể được dùng để điều trị tình trạng viêm quá mức cấp tính hoặc mạn tính, và/hoặc một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến chúng, như cơn đau, sốt, tấy đỏ và sưng. Theo một số phương án, các tổ hợp có thể được dùng để điều trị tình trạng viêm ở các rối loạn khi bệnh lý học bao gồm thành phần viêm, và/hoặc đau liên quan đến các rối loạn này. Một vài ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các rối loạn mà bao gồm yếu tố viêm bao gồm chúng xơ vữa động mạch, dị ứng, bệnh hen, bệnh tự miễn (ví dụ, bệnh tạng phủ, bệnh vẩy nến, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh viêm khớp vẩy nến), hội chứng

đau do xơ cơ, bệnh gut, bệnh đau nửa đầu, bệnh viêm xương khớp mạn tính, bệnh viêm ruột kết gây loét, ung thư, suy giảm nhận thức, kể cả bệnh Alzheimer, bệnh đái tháo đường typ 2, đau nhức cơ bắp trì hoãn khởi phát (DOMS), bệnh Crohn và bệnh viêm đốt sống dạng thấp. Theo một số phương án, tổ hợp theo sáng chế có thể được dùng để điều trị đau khớp hoặc cải thiện mức độ linh động của khớp liên quan đến bệnh viêm xương khớp mạn tính hoặc bệnh viêm đa khớp dạng thấp. Theo một số phương án, tổ hợp theo sáng chế có thể được dùng để điều trị các rối loạn trong đó việc ức chế PGE₂ có thể là có lợi, như bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh đau nửa đầu và đau (mà có thể là cơn đau cảm thụ (thân thể hoặc nội tạng), và/hoặc cơn đau thần kinh).

[0068] Có thể thấy rằng các tổ hợp theo sáng chế có thể được làm thích ứng để dùng riêng rẽ hoặc đồng thời. Khi đã được làm thích ứng để dùng đồng thời, tổ hợp có thể được tạo ra và/hoặc được dùng ở dạng chế phẩm riêng biệt hoặc hỗn hợp mà chứa cả phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, hoặc ở dạng các dạng liều riêng rẽ của từng thành phần của tổ hợp. Khi từng phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể được tạo ra và/hoặc được dùng riêng rẽ, chúng có thể được dùng đồng thời, thành phần này sau thành phần khác, hoặc mỗi thành phần tại thời điểm khác.

[0069] Theo phương án khác nữa, lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể có thể được bào chế một cách tùy ý, cùng nhau hoặc riêng lẻ, kết hợp với một hoặc nhiều chất phụ gia và/hoặc chất mang được dụng. Một số ví dụ về chất mang thích hợp là dầu ăn được, như dầu ô liu, dầu thầu dầu, dầu hạt lanh, dầu hạt nho, dầu cá (ví dụ, dầu cá ngừ), dầu của cải dầu, dầu thực vật, dầu hướng dương, dầu hạt chia, dầu đậu tương, dầu vừng, dầu táo, và hỗn hợp của chúng. Một hoặc nhiều chất phụ gia tùy ý, như các chất chống oxy hóa, các vitamin (như các vitamin hòa tan trong chất béo (A, D, E và K), hoặc các vitamin hòa tan trong nước (B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, C), các chất khoáng dinh dưỡng, axit amin, các tác nhân giấu mùi và vị, các chất nhũ hóa, rượu được dụng (ví dụ, etanol, glyxerol, propylen glycol, và polyetylen glycol) hoặc các chất khác điều chỉnh độ nhớt, các chất hoạt động bề mặt (ví dụ, các polysorbat), huyền phù các tác nhân, lactoza, đextroza, sucroza, manitol, sorbitol, glucoza, các chất làm trơn, các chất kết dính, tinh bột, các chất tăng cường hấp thụ và chất bảo quản v.v. cũng có thể được bao gồm. Chất mang hoặc chất cộng hợp có thể thực hiện một hoặc nhiều chức năng. Lipid từ con trai và/hoặc dầu từ loài nhuyễn thể có thể tùy ý được bổ sung tiếp hoặc kết hợp với một hoặc nhiều thành phần bổ sung đã được tinh chế hoặc đã được tinh chế một phần của dầu từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, như, astaxanthin và các este

của chúng, các axit béo (ví dụ, EPA, DHA), ở dạng axit tự do, este axit, triglyxerit hoặc phospholipit, sterol, các sterol este, axit amin, các peptit và các protein, và các glycosaminoglycan (ví dụ, chondroitin sulfat). Các thực phẩm kháng viêm khác, như dạng nghiền thô, hoặc các chiết phẩm chứa chúng, ví dụ củ nghệ (nghệ), gừng, tỏi, đinh hương v.v., cũng có thể được kết hợp một cách tùy ý.

[0070] Các tổ hợp bào chế có thể được điều chế theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp này bao gồm bước đưa riêng rẽ phần chiết lipid từ con trai và/hoặc dầu từ loài nhuyễn thể vào kết hợp với chất mang, tùy ý cùng với một hoặc nhiều thành phần cộng thêm. Cần phải hiểu rằng chất mang hoặc phụ gia bất kỳ phải là được dụng.

[0071] Do đó, theo một số phương án, lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể được bào chế, riêng rẽ hoặc cùng nhau, với dầu làm chất mang, như dầu ô liu. Theo một số phương án, dầu làm chất mang chứa khoảng từ 10% trọng lượng đến 90% trọng lượng, như khoảng 20% trọng lượng đến 80% trọng lượng tổ hợp hoặc chế phẩm. Theo một phương án khác nữa, dầu làm chất mang chứa khoảng 25% trọng lượng, hoặc khoảng 30% trọng lượng, hoặc khoảng 35% trọng lượng, hoặc khoảng 40% trọng lượng, hoặc khoảng 45% trọng lượng, hoặc khoảng 50% trọng lượng, hoặc khoảng 55% trọng lượng, hoặc khoảng 60% trọng lượng, hoặc khoảng 65% trọng lượng, hoặc khoảng 70% trọng lượng, hoặc khoảng 75% trọng lượng tổ hợp hoặc chế phẩm. Theo một số phương án, tỷ lệ trọng lượng giữa dầu chất mang và lượng tổ hợp lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể là khoảng 3:1, hoặc khoảng 2,5:1, hoặc khoảng 2:1, hoặc khoảng 1,5:1, hoặc khoảng 1:1, hoặc khoảng 1:1,5, hoặc khoảng 1:2, hoặc khoảng 1:2,5 hoặc khoảng 1:3.

[0072] Trong khi cách dùng bất kỳ được dự tính theo sáng chế, như qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, khu trú, qua da hoặc dưới da, một cách có lợi, theo một số phương án tổ hợp theo sáng chế có thể được tạo ra và/hoặc được dùng ở dạng liều dùng qua đường miệng. Theo một số phương án, các tổ hợp có thể được thể hiện trong dạng khối, ví dụ, ở dạng lỏng, siro, bột nhão, các loại sáp bán rắn, các loại thể phân tán, các loại huyền phù, nhũ tương (ví dụ, nước-trong-dầu hoặc dầu-trong-nước), bột đã được nghiền hoặc bột đã được bao vi nang, mà từ đó các liều lượng riêng rẽ có thể được đo. Việc đo và/hoặc dùng có thể là theo cách bất kỳ, như dùng thìa hoặc muỗng, bơm tiêm, ống nhỏ giọt, hoặc cốc đo. Các liều lượng đo được có thể được cho đối tượng dùng một cách trực tiếp hoặc được trộn kỹ, được rót lên, hoặc được rắc lên thực phẩm hoặc đồ uống.

[0073] Theo các phương án khác, các tổ hợp là được trình bày một cách có lợi ở dạng liều lượng đơn vị dùng qua đường miệng, tức là dạng liều cố định. Một số ví dụ về liều lượng đơn vị thích hợp để dùng qua đường miệng bao gồm các ống thuốc tiêm được bao gói riêng rẽ, ống nghiệm, bơm tiêm đã nạp sẵn, gói nhỏ, kẹo nhai và viên nang (kể cả viên nang cứng và viên nang mềm).

[0074] Một ví dụ về dạng liều đơn vị thích hợp để dùng qua đường miệng là viên nang, ở dạng vỏ cứng hoặc vỏ mềm. Vỏ có thể bao gồm một hoặc nhiều gelatin, pullulan, hypromellose, PVA copolyme, caraginan hoặc thành phần saccharit khác như tinh bột hoặc xenluloza, hoặc hỗn hợp của chúng, và có thể còn bao gồm tác nhân tạo màu, chất cản quang, chất làm mềm (ví dụ, sorbitol, xyloza, maltitol và glyxerin) v.v. Các phương pháp để bao nang dầu từ sinh vật biển và lipit, như lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem công bố đơn quốc tế số WO2015/121378. Theo một số phương án, khi dầu từ loài nhuyễn thể được bao nang một cách riêng rẽ, thì dầu từ loài nhuyễn thể có thể được bao nang khi không có các tác nhân bổ sung tùy ý, như các tác nhân điều chỉnh độ nhớt, tức là, nhân của viên nang chủ yếu gồm dầu từ loài nhuyễn thể.

[0075] Theo một số phương án có lợi, tổ hợp lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể theo sáng chế được trình bày ở dạng viên nang gel mềm, ví dụ, viên nang gel mềm chứa cả lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, hoặc các viên nang gel mềm riêng rẽ, khi lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể được bao nang riêng rẽ, tùy ý cùng với chất mang thích hợp và/hoặc các chất phụ gia. Các viên nang gel mềm thích hợp có thể được chế biến từ gelatin (hoặc theo cách khác, các nguồn saccharit như pullulan và hypromellose), tùy ý với một hoặc nhiều chất làm mềm như sorbitol và glyxerin (glyxerol), và các chất phụ gia như chất tạo màu và chất cản quang. Theo một ví dụ, lớp vỏ của viên nang gel mềm có thể bao gồm gelatin, và một hoặc cả hai sorbitol và glyxerin.

[0076] Bao vi nang là phương pháp mà bằng cách đó các giọt nhỏ xíu hoặc các phần tử được bao quanh bởi thành bao hoặc được gắn vào nền để tạo ra bột, với lớp bao hoặc nền tạo ra hàng rào chức năng mà tránh hoặc làm giảm xu hướng phản ứng hóa học, như oxy hóa. Ngoài ra, nó có thể có vai trò giấu vị hoặc mùi tiềm năng. Do đó, theo một số phương án, lipit từ con trai và/hoặc dầu từ loài nhuyễn thể có thể được bao vi nang, riêng rẽ hoặc cùng nhau, để tạo ra bột. Các phương pháp bao vi nang được áp dụng bao gồm nhũ hóa, sấy phun,

làm khô ở nhiệt độ thấp, điện phun đồng trục, ép đùn, sinh giọt tự, chất lỏng siêu tới hạn công nghệ, và tại chỗ polyme hóa. chất bao bao gồm tự nhiên và tổng hợp các polyme, các hydrat cacbon (ví dụ, tinh bột, glucoza), các protein (ví dụ, casein, gelatin) và hỗn hợp của chúng. (ví dụ, xem tài liệu: Bakry, A. M., *et al*, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 143, 2016, và các tài liệu trích dẫn trong đó, WO2014/170464 và WO2014/169315). Lipit từ con trai và/hoặc dầu từ loài nhuyễn thể có thể được bao vi nang với một hoặc nhiều chất mang hoặc chất phụ gia như nêu trên. Bột lipit từ con trai và/hoặc dầu từ loài nhuyễn thể đã được bao vi nang có thể được bao nang tiếp, ví dụ, ở dạng liều lượng đơn vị viên nang vỏ cứng. Lipit hoặc dầu đã được tạo bột và bao vi nang có thể tùy ý kết hợp với một hoặc nhiều chất mang hoặc chất phụ gia.

[0077] Theo một số phương án, tổ hợp theo sáng chế có thể được hấp thụ vào cùng với thực phẩm hoặc đồ uống, ví dụ, bằng cách rưới, khuấy, trộn hoặc các cách khác để dùng hoặc kết hợp tổ hợp gồm phần chiết lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể vào hoặc lên thực phẩm hoặc đồ uống. Do đó, các tổ hợp có thể được tạo ra ở định dạng để kết hợp vào hoặc lên đồ uống hoặc thực phẩm. Theo một số phương án, tổ hợp còn có thể được bào chế vào chế phẩm gồm thực phẩm và đồ uống để tạo ra các thực phẩm chức năng.

[0078] Theo một số phương án, lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể được bào chế, riêng rẽ hoặc cùng nhau, với dầu làm chất mang, như dầu ô liu, tùy ý với chất chống oxy hóa (ví dụ, vitamin E).

[0079] Đối tượng cần được điều trị bằng các tổ hợp theo sáng chế bao gồm các đối tượng động vật có vú, như người, các động vật linh trưởng, mèo, chó, bò, ngựa, lợn, thỏ, cừu, và dê, và bao gồm vật nuôi động vật (ví dụ, bò cái, ngựa, cừu, lợn và dê), thú cưng (ví dụ, chó, mèo, thỏ, chuột lang), và động vật hoang dã nuôi nhốt. Các động vật phòng thí nghiệm như thỏ, chuột nhắt, chuột to, chuột lang và chuột đồng cũng được dự tính vì chúng cũng có thể là hệ thử nghiệm thuận tiện.

[0080] Dạng liều lượng bất kỳ trong số các dạng liều lượng nêu trên có thể được áp dụng cho người hoặc ứng dụng thú y khi thích hợp.

[0081] Lượng hữu hiệu để điều trị dự định bao gồm lượng kết hợp mà khi được dùng theo phác đồ dùng liều mong muốn, là cùng có tác dụng để đạt được ít nhất là một phần tác dụng

điều trị bệnh mong muốn, bao gồm một hoặc nhiều: làm thuyên giảm, loại bỏ hoặc làm giảm khoảng thời gian, mức độ nghiêm trọng và/hoặc tần suất của bệnh viêm và/hoặc một hoặc nhiều triệu chứng viêm (ví dụ, nóng, đau, sưng, tấy đỏ), phòng bệnh hoặc trì hoãn khởi phát, ức chế diễn tiến của, hoặc làm tạm dừng hoặc làm đảo ngược (một phần hoặc hoàn toàn) sự khởi phát hoặc tiến triển của rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý cụ thể được điều trị.

[0082] Các liều lượng và phác đồ dùng liều thích hợp có thể được xác định bởi bác sỹ điều trị hoặc bác sỹ thú y, và có thể phụ thuộc vào tình trạng/triệu chứng cụ thể được điều trị, mức độ nặng của tình trạng cũng như lứa tuổi chung, tình trạng sức khỏe và thể trọng của đối tượng. Liều lượng hằng ngày thích hợp của lipit từ con trai và/hoặc dầu từ loài nhuyễn thể có thể độc lập nằm trong khoảng từ 10mg đến 10g, ví dụ, khoảng 10mg, 20mg, 30mg, 40mg, 50mg, 100mg, 150mg, 200mg, 250mg, 300mg, 350mg, 400mg, 450mg, 500mg, 550mg, 600mg, 650mg, 700mg, 750mg, 800mg, 850mg, 900mg, 950mg, 1g, 1,1g, 1,2g, 1,3g, 1,4g, 1,5g, 1,6g, 1,7g, 1,8g, 1,9g, 2,0g, 2,1g, 2,2g, 2,3g, 2,4g, 2,5g, 2,6g, 2,7g, 2,8g, 2,9g, 3,0g, 3,2g, 3,5g, 3,7g, 4,0g, 4,5g, 5,0g, 5,5g, 6,0g, 6,5g, 7,0g, 7,5g, 8,0g, 8,5g, 9,0g, hoặc khoảng 9,5g. Theo một số phương án khác, liều lượng hằng ngày của tổ hợp có thể nằm trong khoảng từ 20mg đến 15g, ví dụ, khoảng 20mg, 30mg, 40mg, 50mg, 100mg, 150mg, 200mg, 250mg, 300mg, 350mg, 400mg, 450mg, 500mg, 550mg, 600mg, 650mg, 700mg, 750mg, 800mg, 850mg, 900mg, 950mg, 1g, 1,1g, 1,2g, 1,3g, 1,4g, 1,5g, 1,6g, 1,7g, 1,8g, 1,9g, 2,0g, 2,1g, 2,2g, 2,3g, 2,4g, 2,5g, 2,6g, 2,7g, 2,8g, 2,9g, 3,0g, 3,2g, 3,5g, 3,7g, 4,0g, 4,5g, 5,0g, 5,5g, 6,0g, 6,5g, 7,0g, 7,5g, 8,0g, 8,5g, 9,0g, 9,5g, 10,0g, 10,5g, 11,0g, 11,5g, 12,0g, 12,5g, 13,0g, 13,5g, 14,0g, hoặc 14,5g.

[0083] Theo một số phương án, các đơn vị liều lượng riêng rẽ (ví dụ, viên nang gel mềm) có thể chứa khoảng 10mg, 20mg, 25mg, 30mg, 40mg, 50mg, 60mg, 70mg, 75mg, 80mg, 90mg, 100mg, 110mg, 120mg, 125mg, 130mg, 140mg, 150mg, 160mg, 165mg, 170mg, 175mg, 180mg, 190mg, 200mg, 210mg, 220mg, 225mg, 230mg, 240mg, 250mg, 260mg, 265mg, 270mg, 275mg, 280mg, 290mg, 300mg, 310mg, 320mg, 325mg, 330mg, 340mg, 350mg, 360mg, 365mg, 370mg, 375mg, 380mg, 390mg, 400mg, 410mg, 420mg, 425mg, 430mg, 440mg, 450mg, 460mg, 465mg, 470mg, 475mg, 480mg, 490mg, hoặc khoảng 500mg tổ hợp, tùy ý đã được sản xuất cùng với dầu làm chất mang (ví dụ, dầu ô liu). Theo một số phương án khác của chúng, tổ hợp còn chứa vitamin E. Theo một số phương án khác, của chúng, các tổ hợp bao gồm lipit từ con trai (ví dụ, ở dạng PCSO-524) với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 90% tổng trọng lượng lipit từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể,

và bao gồm dầu từ loài nhuyễn thể với lượng nằm trong khoảng từ 90% đến 10% tổng trọng lượng lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, tức là tỷ lệ trọng lượng giữa lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể của nằm trong khoảng từ 10:90 đến 90:10, ví dụ, lipid từ con trai so với dầu từ loài nhuyễn thể theo tỷ lệ trọng lượng khoảng 15:85, hoặc khoảng 20:80, hoặc khoảng 25:75, hoặc khoảng 30:70, hoặc khoảng 35:65, hoặc khoảng 40:60, hoặc khoảng 45:55, hoặc khoảng 50:50, hoặc khoảng 55:45, hoặc khoảng 60:40, hoặc khoảng 65:35, hoặc khoảng 70:30, hoặc khoảng 75:25, hoặc khoảng 80:20, hoặc khoảng 85:15.

[0084] Các liều có thể được dùng một cách thuận tiện mỗi ngày một lần, hoặc các liều hằng ngày có thể được chia nhỏ và được dùng nhiều lần (ví dụ, hai, ba hoặc bốn lần) hằng ngày. Theo một số phương án, tổ hợp theo sáng chế có thể được dùng một, hai, ba hoặc nhiều lần hằng tuần, ví dụ, cách ngày. Theo một số phương án, việc điều trị có thể là liên tục hoặc kéo dài, ví dụ, trong thời gian ít nhất là 6 tháng đến 12 tháng hoặc ít nhất là 2 năm đến 3 năm, hoặc tiếp diễn.

[0085] Các tổ hợp theo sáng chế, ví dụ, với lượng bất kỳ trong số các liều hằng ngày, có thể bao gồm lipid từ con trai với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 99% tổng trọng lượng lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, và bao gồm dầu từ loài nhuyễn thể với lượng nằm trong khoảng 99% đến 1% tổng lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, tức là tỷ lệ trọng lượng giữa lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể của nằm trong khoảng từ 1:99 đến 99:1. Theo một số phương án, các tổ hợp bao gồm lipid từ con trai với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 95% tổng trọng lượng lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, và bao gồm dầu từ loài nhuyễn thể với lượng nằm trong khoảng từ 95% đến 5% tổng lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, tức là tỷ lệ trọng lượng giữa lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể nằm trong khoảng từ 5:95 đến 95:5. Theo một số phương án, các tổ hợp bao gồm lipid từ con trai với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 90% tổng trọng lượng lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, và bao gồm dầu từ loài nhuyễn thể với lượng nằm trong khoảng từ 90% đến 10% trọng tổng lượng lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, tức là tỷ lệ trọng lượng giữa lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể của nằm trong khoảng từ 10:90 đến 90:10. Theo các phương án bổ sung thêm, các tổ hợp bao gồm lipid từ con trai so với dầu từ loài nhuyễn thể theo tỷ lệ trọng lượng khoảng 15:85, hoặc khoảng 20:80, hoặc khoảng 25:75, hoặc khoảng 30:70, hoặc khoảng 35:65, hoặc khoảng 40:60, hoặc khoảng 45:55, hoặc khoảng 50:50, hoặc khoảng 55:45, hoặc khoảng 60:40, hoặc khoảng 65:35, hoặc khoảng 70:30, hoặc khoảng 75:25, hoặc khoảng 80:20, hoặc khoảng 85:15.

[0086] Trong khi các tổ hợp theo sáng chế có thể được dùng làm liệu pháp điều trị kháng viêm duy nhất cho một hoặc nhiều rối loạn bất kỳ, chúng còn có thể được dùng cùng với phác đồ dùng của một hoặc nhiều NSAIDS, như celecoxib, diclofenac, diflunisal, etodolac, fenoprofen, flurbiprofen, ibuprofen, indomethacin, ketoprofen, telorolac, mefenamic, meloxicam, nabumetone, naproxen, oxaprozin, piroxicam, sulindac, và tolmetin. Theo một số phương án, tổ hợp theo sáng chế có thể loại bỏ hoặc làm giảm tác dụng phụ tiềm năng liên quan đến NSAIDS, ví dụ, bằng cách loại bỏ hoặc hầu như loại bỏ nhu cầu về việc điều trị bổ sung bằng NSAIDS, hoặc bằng cách làm giảm liều lượng và/hoặc tần suất dùng liều NSAIDS cần thiết để đạt được tác dụng điều trị bệnh có lợi.

[0087] Như đã nêu trên, theo một hoặc nhiều phương án, dầu từ loài nhuyễn thể được dùng trong các tổ hợp theo sáng chế có thể có, theo cách có lợi, hàm lượng phospholipit ít nhất là khoảng 40% trọng lượng, hoặc tốt hơn nếu ít nhất là 50% trọng lượng, hoặc cao hơn, tốt hơn nếu ít nhất là khoảng 60% trọng lượng, hoặc cao hơn. Nhiều quy trình đã biết để chiết dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng phospholipit cao (ví dụ, cao hơn khoảng 50% hoặc 60% trọng lượng) từ thịt của loài nhuyễn thể sử dụng kết hợp CO₂ và CO₂/etanol. Tuy nhiên, đã nhận thấy rõ rằng hàm lượng phospholipit của dầu từ loài nhuyễn thể càng cao, thì dầu từ loài nhuyễn thể càng nhớt, và khi dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng khoảng 60% hoặc cao hơn thì thường là bột nhão nhớt ở nhiệt độ môi trường. Điều này là thách thức đối với sản xuất, đặc biệt là việc sản xuất dầu trên quy mô công nghiệp hoặc quy mô thương mại, vì nhiệt độ cao hơn là cần thiết để làm bay hơi các dung môi được dùng trong quy trình chiết từ nguyên liệu nhớt, và hiện tượng dầu bị hỏng do nhiệt dễ xảy ra hơn. Ngoài ra, lúc đó áp suất cao là cần thiết để chuyển dầu từ các bình chiết sang bình bao gói.

[0088] Một quy trình đã biết làm ví dụ được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO2007123424. Tài liệu này mô tả quy trình gồm hai bước, theo đó trước hết nguyên liệu nạp được chiết bằng CO₂ tinh khiết để chỉ chiết riêng lipid trung tính (tức là triglycerit không phân cực) ra, để lại sau nguyên liệu mà đã được làm giàu phospholipit nhờ việc loại bỏ triglycerit không phân cực. Tiếp đó, nguyên liệu phospholipit đã được làm giàu này được chiết bằng CO₂ + $\geq 10\%$ etanol đồng dung môi để chiết cả phospholipit phân cực và triglycerit không phân cực còn lại từ sinh khối nạp của loài nhuyễn thể. Phương pháp này sử dụng một cách không hiệu quả năng lực của nhà máy ở quy mô công nghiệp, vì trong cả hai giai đoạn của quy trình này các thành phần protein, hydrat cacbon và tro không chiết

được trong sinh khối nạp chiếm phần lớn thể tích máy chiết áp suất cao. Cũng về cơ bản, việc vận hành theo mẻ là kém hiệu quả hơn (so với việc vận hành liên tục hiệu quả hơn), mà có thể tác động một cách bất lợi đến chi phí của quy trình. Một cách hiệu quả, việc làm giàu để phân phối hàm lượng phospholipit phân cực cuối cùng ở đầu thành phẩm đạt được ở bước thứ nhất, một cách trực tiếp trên nguyên liệu khối rắn thô không đồng nhất ở quy mô công nghiệp. Kiến thức chính xác đã biết về hàm lượng lipit phân cực và không phân cực của nguyên liệu nạp rắn, và từng thành phần sẽ được chiết ra sau đó như thế nào, là cần thiết để làm giàu chính xác dầu cuối cùng. Trên thực tế, sự không chắc chắn ở quy mô thương mại có thể khiến chi phí làm giàu đắt đỏ, mà tiếp đó cần phải trộn lẫn cuối ngược lại như đã mô tả, nếu cần. Điều này một lần nữa tác động một cách bất lợi đến mặt kinh tế của quy trình này.

[0089] Các patent Mỹ số US 9,735,453, US 9,078,905, US 9,028,877, US 9,320,765, và US 9,072,752 bộc lộ cách chiết loại nhuyễn thể bằng CO₂ hoặc CO₂ với khoảng 5% etanol để chiết lipit trung tính (triglycerit không phân cực), tiếp theo là CO₂/~ 20% etanol để chiết từ chất liệu khối rắn không đồng nhất dầu từ loại nhuyễn thể với lượng cao phospholipit, astaxanthin este và/hoặc axit béo omega-3. Các quy trình này cũng có các nhược điểm nêu trên.

[0090] Phần mô tả dưới đây bộc lộ quy trình mà, theo một số phương án, có thể làm giảm, giảm đến mức thấp nhất hoặc loại bỏ một hoặc nhiều nhược điểm nêu trên khi điều chế dầu từ loại nhuyễn thể giàu phospholipit hoặc chứa phospholipit với hàm lượng cao theo các phương pháp đã biết, đặc biệt là trên quy mô công nghiệp hoặc quy mô thương mại (ví dụ, khi sản xuất các mẻ dầu theo thứ tự ít nhất là khoảng 50kg, 100kg, 200kg, 300kg hoặc 500kg và nhiều hơn). Do đó, bản mô tả này còn đề xuất quy trình tạo ra dầu từ loại nhuyễn thể với hàm lượng phospholipit ít nhất là khoảng 50% trọng lượng, hoặc cao hơn, tốt hơn là đến mức ít nhất là khoảng 60% trọng lượng hoặc cao hơn, và quy trình làm giàu dầu với hàm lượng phospholipit thấp hơn (ít hơn khoảng 50% trọng lượng) đến mức ít nhất là khoảng 50% trọng lượng hoặc cao hơn, tốt hơn là đến mức ít nhất là khoảng 60% trọng lượng hoặc cao hơn.

[0091] Theo một số phương án, sáng chế đề xuất quy trình tạo ra dầu từ loại nhuyễn thể có hàm lượng phospholipit ít nhất là khoảng 50% trọng lượng gồm 2 bước, trong đó bước thứ nhất bao gồm việc chiết dầu thứ nhất từ loại nhuyễn thể, có hàm lượng phospholipit khoảng

thấp hơn 50% trọng lượng từ sinh khối của loài nhuyễn thể và sau đó loại bỏ ít nhất là một phần các thành phần lipid không phân cực (ví dụ, triglycerit) ra khỏi dầu thứ nhất của loài nhuyễn thể để thu được dầu thứ hai của loài nhuyễn thể mà giàu phospholipit (tức là có hàm lượng phospholipit cao hơn) so với dầu thứ nhất từ loài nhuyễn thể.

[0092] Trái với các quy trình đã biết nêu trên, một số phương án của quy trình này bắt đầu với việc chiết dầu không chọn lọc từ nguyên liệu nạp là sinh khối của loài nhuyễn thể. Việc chiết cả lipid phân cực (ví dụ, phospholipit) và lipid không phân cực (ví dụ, triglycerit) từ thức ăn cứng nạp vào có thể đạt được bằng cách sử dụng hỗn hợp CO₂ và etanol (ví dụ, hỗn hợp đồng sôi etanol - nước-etanol chứa khoảng 95% etanol).

[0093] Theo một số phương án được ưu tiên, tỷ lệ khối lượng ít nhất là khoảng 15% trọng lượng hoặc khoảng 20% trọng lượng etanol trong CO₂ có thể được sử dụng, ví dụ, nằm trong khoảng 17% đến 22% trọng lượng. Theo một phương án khác nữa, tỷ lệ khối lượng ít nhất là khoảng 25% trọng lượng etanol trong CO₂ có thể được sử dụng, như ít nhất là khoảng 26% trọng lượng etanol, hoặc ít nhất là khoảng 27% trọng lượng etanol, hoặc ít nhất là khoảng 28% trọng lượng etanol, hoặc ít nhất là khoảng 29% trọng lượng etanol, hoặc ít nhất là khoảng 30% trọng lượng etanol trong CO₂ được sử dụng.

[0094] Theo một số phương án, kể cả phương án bất kỳ trong số các phương án khác được bàn luận đến trong khổ này, nhiệt độ chiết là khoảng 60°C hoặc thấp hơn, như nhiệt độ khoảng 55°C hoặc thấp hơn, hoặc nhiệt độ khoảng 50°C hoặc thấp hơn, hoặc nhiệt độ khoảng 45°C hoặc thấp hơn, hoặc nhiệt độ 40°C hoặc thấp hơn, hoặc nhiệt độ 35°C hoặc thấp hơn, hoặc nhiệt độ 30°C hoặc thấp hơn để làm giảm hoặc giảm đến mức thấp nhất theo cách có lợi nguy cơ thoái biến sản phẩm. Áp suất chiết có thể được đặt để đảm bảo các điều kiện siêu tới hạn, cận tới hạn và/hoặc gần các điều kiện tới hạn đối với nhiệt độ chọn lọc và tỷ lệ giữa CO₂ và etanol. Theo một số phương án, áp suất nằm trong khoảng từ 200 bar đến 350 bar (20.000 kPa đến 35.000 kPa), như khoảng từ 250 bar đến 300 bar (25.000 kPa đến 30.000 kPa), mặc dù áp suất cao hơn ví dụ 400 bar (40.000 kPa) và cao hơn, là hữu hiệu về mặt kỹ thuật và cũng có thể được sử dụng. Theo một số phương án, trị số hoặc khoảng áp suất tạo ra tỷ trọng dung môi thích hợp để đảm bảo việc chiết lipid không phân cực không trở thành yếu tố hạn chế tốc độ của quy trình này. Theo một số phương án, điều kiện áp suất chiết có thể được điều chỉnh trong toàn bộ quy trình chiết để dịch chuyển giữa các điều kiện siêu tới hạn, cận tới hạn hoặc gần tới hạn. Theo một số phương án, điều kiện cận tới hạn, và/hoặc

gần tới hạn được áp dụng, mà theo đó các điều kiện thay đổi tùy theo tỷ lệ trộn hai phần CO₂ so với etanol (hoặc tỷ lệ trộn ba thành phần trong trường hợp etanol đồng sôi, mà còn chứa nước). Thời gian chiết có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể phụ thuộc, trong số nhiều thứ, vào các điều kiện chiết và mức tối ưu hóa kinh tế mong muốn. Theo một số phương án, thời gian chiết thường nằm trong khoảng từ 1 giờ đến 15 giờ, như khoảng 2 giờ đến 10 giờ, như khoảng từ 2 giờ đến 5 giờ hoặc khoảng 3 giờ đến 6 giờ, hoặc khoảng 4 giờ đến 5 giờ. Về phần mình, nó có thể phụ thuộc vào, trong số nhiều thứ, lượng và cỡ hạt của nguyên liệu nạp sinh khối. Các hạt to hơn sẽ cho phép lưu tốc dung môi cao hơn được dùng trong khi vẫn giữ sinh khối không đổi và tiếp xúc dung môi đồng nhất. Tuy nhiên, phần tử to hơn còn là yêu cầu khuếch tán cao hơn để dung môi đến được tâm của các phần tử, và cần nhiều dung môi hơn. Do đó, theo một số phương án, cỡ hạt của nguyên liệu nạp nằm trong khoảng từ 1mm đến 5mm, như khoảng 2mm đến 3mm.

[0095] Theo một số phương án khác, áp suất chiết là khoảng 300 bar (30.000 kPa) và nhiệt độ chiết là khoảng 60°C.

[0096] Việc tách dầu có thể được thực hiện ở nhiệt độ thấp hơn (ví dụ, khoảng 25°C đến 35°C) và áp suất thấp hơn (ví dụ, khoảng 25 bar đến 60 bar (2500 kPa đến 6000 kPa))

[0097] Dầu chiết thu được chứa cả lipit phân cực (ví dụ, phospholipit) và lipit không phân cực (ví dụ, triglycerit), và có thể có hàm lượng phospholipit khoảng thấp hơn 50% trọng lượng, hoặc khoảng thấp hơn 45% trọng lượng, hoặc khoảng thấp hơn 40% trọng lượng, hoặc khoảng thấp hơn 35% trọng lượng, hoặc khoảng thấp hơn 30% trọng lượng, hoặc khoảng thấp hơn 25% trọng lượng, hoặc khoảng thấp hơn 20% trọng lượng, hoặc khoảng thấp hơn 10% trọng lượng.

[0098] Theo một số phương án có lợi, sau đó nước và etanol có trong dầu có thể được loại ra bằng cách áp dụng phương pháp thích hợp bất kỳ, như làm bay hơi trong chân không (một cách tùy ý bằng cách làm nóng nhẹ, ví dụ ở nhiệt độ khoảng 65°C hoặc thấp hơn), dòng nito hoặc làm đông khô nhanh. Theo một số phương án, dầu được đưa vào làm bay hơi trong chân không, tùy ý bằng cách làm nóng nhẹ. Tiếp theo có thể là thời gian nghỉ ngắn (ví dụ, 1 giây đến 3 giây) ở nhiệt độ cao hơn (ví dụ, khoảng 70°C, khoảng 75°C hoặc khoảng 80°C) để loại bỏ đồng dung môi nước và etanol ra khỏi hỗn hợp lipit phân cực và không phân cực có độ nhớt thấp, tỷ phần cao của lipit không phân cực tạo ra độ nhớt thấp. Theo một số

phương án được ưu tiên, theo cách có lợi nhiệt độ không vượt quá khoảng 60°C trong toàn bộ quá trình làm nóng nhẹ trong chân không, để tránh hoặc giảm đến mức tối thiểu mức độ thoái biến của các thành phần của dầu chiết được. Theo một phương án khác nữa, nhiệt độ trong toàn bộ quá trình làm nóng nhẹ trong chân không theo cách có lợi không vượt quá khoảng 55°C, hoặc khoảng 50°C hoặc khoảng 45°C, hoặc khoảng 40°C, hoặc khoảng 35°C, hoặc khoảng 30°C, hoặc khoảng 25°C.

[0099] Theo một số phương án, hàm lượng chất bay hơi còn lại (nước và etanol) sau khi làm bay hơi là khoảng hoặc thấp hơn 3% trọng lượng, trong khi hàm lượng này có thể giảm đến mức tối thiểu khả năng etanol và nước còn lại tác động một cách bất lợi đến việc tách lipid ở bước làm giàu sau đó. Theo một phương án khác nữa, hàm lượng chất bay hơi còn lại là khoảng hoặc thấp hơn 2,5% trọng lượng, hoặc khoảng hoặc thấp hơn 2,0% trọng lượng, hoặc khoảng hoặc thấp hơn 1,5% trọng lượng, hoặc khoảng hoặc thấp hơn 1,0% trọng lượng, hoặc khoảng thấp hơn 0,5% trọng lượng, hoặc khoảng thấp hơn 0,3% trọng lượng, hoặc khoảng thấp hơn 0,1% trọng lượng.

[0100] Ở giai đoạn này, sau khi làm bay hơi, do sự có mặt của các thành phần lipid không phân cực, dầu vẫn là lỏng và có thể dễ dàng được phân tích, ví dụ về hàm lượng phospholipit và/hoặc axit béo omega-3. Điều này là quan trọng vì phân tích chính xác là cần thiết để tính mức độ làm giàu mong muốn, và do đó hàm lượng phospholipit của dầu cuối cùng đạt được ở bước tiếp theo. Cụ thể, khi mong muốn hàm lượng phospholipit cuối cùng cao, thì việc làm giàu quá mức (tức là tiếp tục loại bỏ lipid không phân cực), thậm chí chỉ biên độ nhỏ, cũng có thể dẫn tới các vấn đề trong quá trình xử lý do độ nhớt quá mức. Dầu đã bay hơi có thể được trộn kỹ để đảm bảo độ đồng nhất, tùy ý sau khi chuyển sang bình sản phẩm trung gian. Tùy ý, dầu có thể được làm nóng nhẹ (ví dụ, ở nhiệt độ thấp hơn hoặc khoảng 60°C, 55°C, hoặc khoảng 50°C hoặc khoảng 45°C, hoặc khoảng 40°C, hoặc khoảng 35°C, hoặc khoảng 30°C, hoặc khoảng 25°C) để hỗ trợ việc duy trì chất lỏng và nguyên liệu đồng nhất để phân tích. Tính chất kém nhớt hơn của dầu không làm giàu thu được từ bước chiết thứ nhất CO₂/EtOH so với sinh khối rắn khối ở bước thứ nhất được dùng trong các quy trình đã biết nêu trên, có thể, theo một số phương án, theo cách có lợi, cho phép phân tích thành phần chính xác hơn vì độ đồng nhất khối có thể đạt được dễ dàng hơn. Theo một số phương án, điều này tránh được, giảm đến mức tối thiểu hoặc giảm theo cách có lợi khác hiện tượng làm giàu quá mức các phospholipit ở bước chiết chọn lọc tiếp theo đối với các lipid không phân

cực, mà có thể theo cách khác tạo ra sản phẩm rắn không xê dịch được hoặc nhót một cách không mong muốn.

[0101] Bước thứ hai của quy trình này bao gồm việc chiết ưu tiên hoặc chọn lọc lipid không phân cực (triglycerit) từ dầu thu được trong bước thứ nhất. Nếu dầu không làm giàu thu được ở bước chiết thứ nhất đã được chuyển sang thùng chất trung gian, nó được quay ngược lại phương tiện chiết. Dầu được đưa tiếp đến bước chiết CO₂, theo một số phương án được ưu tiên ở các điều kiện siêu tới hạn, ví dụ ở áp suất bằng hoặc cao hơn khoảng 300 bar (30.000 kPa) và nhiệt độ khoảng 60°C, để chiết một cách chọn lọc lipid không phân cực (triglycerit). Theo một số phương án, việc chiết có thể bắt đầu với áp suất thấp hơn và sau đó được gia tăng dần đến mức mong muốn (ví dụ, khoảng 300 bar (30.000 kPa)). Lipid không phân cực (triglycerit) có thể được chiết dần, nhờ đó làm giàu dung dịch tinh chế còn lại, cho đến khi đạt được thành phần đích, ví dụ, hàm lượng phospholipit ít nhất là khoảng 50% trọng lượng, hoặc ít nhất là khoảng 55% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 60% trọng lượng phospholipit hoặc ít nhất là khoảng 65% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 70% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 75% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 80% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 85% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 90% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 95% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 97% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 98% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 99% trọng lượng phospholipit.

[0102] Theo một số phương án, sau khi lượng lipid không phân cực cần thiết đã được chiết để đạt đến mức độ làm giàu phospholipit mong muốn, bình chiết giảm áp một phần cho phép áp suất còn lại hỗ trợ việc tháo xả dung dịch tinh chế nay đã được làm giàu (và nhót hơn) nếu cần. Việc tháo kiệt dầu có độ nhót cao đã được làm giàu có thể được chịu đựng đến mức độ cao hơn bằng cách tháo kiệt khỏi bình chiết vẫn chịu áp một phần. Theo cách này, nguyên liệu rất nhót có thể được chuyển để pha trộn và pha chế tiếp.

[0103] Theo một hoặc nhiều phương án, quy trình này có thể cho phép xử lý bán liên tục, với từng bình chiết được thay ra theo cách quay vòng liên tục nhưng chỉ một bình mỗi lần trong khi các bình chiết khác tiếp tục vận hành. Theo cách này, có thể tránh được việc dừng để thay đổi nhiều mẻ chiết.

[0104] Theo các phương án khác, bước thứ hai được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được dùng để làm giàu hàm lượng phospholipit của dầu bất kỳ của loài nhuyễn thể có hàm lượng phospholipit thấp hơn khoảng 50% trọng lượng, để thu được dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng phospholipit ít nhất khoảng 50% trọng lượng.

[0105] Theo một số phương án, dầu từ loài nhuyễn thể ban đầu có hàm lượng phospholipit khoảng 45% trọng lượng hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 40% trọng lượng hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 35% trọng lượng hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 30% trọng lượng hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 25% trọng lượng hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 20% trọng lượng hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 10% trọng lượng, hoặc thấp hơn. Theo một số phương án, dầu đã được làm giàu cuối cùng có thể có hàm lượng phospholipit ít nhất là khoảng 55% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 60% trọng lượng phospholipit hoặc ít nhất là khoảng 65% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 70% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 75% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 80% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 85% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 90% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 95% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 97% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 98% trọng lượng phospholipit, hoặc ít nhất là khoảng 99% trọng lượng phospholipit.

[0106] Theo một số phương án, dầu từ loài nhuyễn thể đã được làm giàu có hàm lượng nước cuối cùng khoảng 5% trọng lượng hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 4%, hoặc 3%, hoặc 2% hoặc 1%, hoặc 0,5% trọng lượng, hoặc thấp hơn. Theo một số phương án, dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng dung môi chiết còn lại khoảng 5% trọng lượng hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 4%, hoặc 3%, hoặc 2% hoặc 1%, hoặc 0,5% trọng lượng, hoặc thấp hơn. Theo một phương án khác nữa, dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng nước khoảng 5% trọng lượng hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 4%, hoặc 3%, hoặc 2% hoặc 1%, hoặc 0,5% trọng lượng, hoặc thấp hơn, và hàm lượng dung môi chiết còn lại khoảng 5% trọng lượng hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 4%, hoặc 3%, hoặc 2% hoặc 1%, hoặc 0,5% trọng lượng, hoặc thấp hơn. Theo các phương án bổ sung thêm, loài nhuyễn thể đã được làm giàu có hàm lượng dung môi (nước và etanol) còn lại 5% trọng lượng hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 4%, hoặc 3%, hoặc 2% hoặc 1,5%, hoặc 1%, hoặc 0,5%, hoặc 0,3%, hoặc 0,1% trọng lượng, hoặc thấp hơn.

[0107] Theo các phương án khác nữa, dầu từ loài nhuyễn thể đã được làm giàu cuối cùng có hàm lượng phospholipit ít nhất là khoảng 60% trọng lượng phospholipit, và hàm lượng dung môi còn lại khoảng 3% trọng lượng hoặc thấp hơn.

[0108] Các phương án khác liên quan đến dầu từ loài nhuyễn thể như được bộc lộ trong bản mô tả này, nếu thích hợp, cũng có thể áp dụng đối với dầu từ loài nhuyễn thể tạo ra theo quy trình theo sáng chế.

[0109] Các ví dụ dưới đây được trình bày nhằm mục đích minh họa một số phương án theo sáng chế và không nhằm để giới hạn tính tổng quát được bộc lộ trong bản mô tả này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 - Điều chế dầu từ loài nhuyễn thể chứa 62% trọng lượng phospholipit

1. Chiết dầu từ loài nhuyễn thể từ thịt của loài nhuyễn thể

[0110] Thịt của loài nhuyễn thể được chiết bằng CO₂/etanol (tỷ lệ nạp giữa etanol và thịt của loài nhuyễn thể nằm trong khoảng từ 3,0 đến 3,5 : 1 trọng lượng), với phân đoạn khối lượng etanol nằm trong khoảng 17% đến 22% trọng lượng, ở nhiệt độ 60°C và áp suất 300 bar (30.000 kPa). Giai đoạn chiết bằng etanol/CO₂ là khoảng từ 10 giờ đến 15 giờ. Hỗn hợp gồm dầu chiết được/CO₂/EtOH được tách ở áp suất 45 bar (4500 kPa) và nhiệt độ 25°C.

[0111] Vải mé dầu thu được theo phương pháp này được trộn lẫn để tạo ra dầu từ loài nhuyễn thể chứa cả thành phần phân cực và thành phần không phân cực và có hàm lượng phospholipit khoảng 42% (xem Bảng 1-1 dưới đây).

Bảng 1-1: Phân tích PL ở mẫu dầu từ loài nhuyễn thể theo ³¹P NMR

Phospholipit (PL)		% tổng trọng lượng PL	g/100g mẫu
Phosphatidylcholin	PC	76,0	32,3
Alkyl axyl phosphatidylcholin	AAPC	9,6	4,1
Phosphatidylinositol	PI	0,6	0,3
Phosphatidylserin	PS	0,3	0,1
Lysophosphatidylcholin	LPC	7,4	3,1

Lyso alkyl axyl phosphatidylcholin	LAAPC	0,5	0,2
Phosphatidyletanolamin	PE	1,3	0,5
Alkyl axyl phosphatidyletanolamin	AAPE	0,9	0,4
Cardiolipin + N-axyl phosphatidyletanolamin	CL/NAPE	2,6	1,1
Lysophosphatidyletanolamin	LPE	0,9	0,4
Lyso alkyl axyl phosphatidyletanolamin	LAAPE	<0,1	<0,1
Tổng hàm lượng PL			42,5

2. *Chiết chọn lọc triglyxerit từ dầu từ loài nhuyễn thể thu được theo bước 1.*

[0112] 5,9kg dầu từ loài nhuyễn thể (có thành phần như nêu trong Bảng 1-1 trên đây) được nạp trực tiếp vào một bình chiết loại dung tích 10,7 lit (đường kính 155mm). Nguyên liệu nạp được chiết bằng CO₂ ở nhiệt độ 60°C và áp suất 300 bar (30.000 kPa).

[0113] Các dịch chiết, chủ yếu chứa triglyxerit, được thu hồi và kém nhớt hơn ở mức độ đáng kể so với dầu nạp của loài nhuyễn thể mà được nạp vào bình chiết.

[0114] Quy trình giảm áp suất của bình chiết được bắt đầu ngay khi tổng khối lượng nguyên liệu chiết được đạt 97% lượng lý thuyết của nguyên liệu mà có thể chiết được. thiết bị được giảm áp suất với tốc độ biến thiên không đổi trong thời gian 15 phút từ 300 bar đến 100 bar (30.000 kPa đến 10.000 kPa) với tuần hoàn CO₂ tiếp tục, mặc dù ở 50% lưu tốc chiết. Trong khoảng thời gian này đo được nhiệt độ ở đầu ra của thiết bị chiết giảm từ nhiệt độ vận hành 60°C đến 50°C. Tiếp đó, thiết bị chiết được giảm áp suất tiếp từ 100 bar đến 75 bar (10.000 kPa đến 7500 kPa) trong thời gian 15 phút nữa mà không chạy máy bơm. Sau đó, bình tách được tháo rỗng dung lượng của nó.

[0115] Trong khi bình chiết vẫn ở nhiệt độ xử lý và áp suất 75 bar (7500 kPa), bình này được tháo dung lượng dầu từ loài nhuyễn thể đã được làm giàu của nó ra khỏi nền của bình chiết dưới mức bề mặt của dung dịch tinh chế, nhờ đó tránh mất áp suất cao của CO₂ khi dầu tinh lọc được dẫn tiêu. Việc thu hồi dầu đã được làm giàu mất khoảng một giờ và trong thời gian đó áp suất của bình này giảm từ 75 bar đến 54 bar (7500 kPa đến 5400 kPa) khi CO₂ còn lại trong bình chiết giãn nở để chiếm khoảng không mà chiếm bởi dầu tinh lọc trước đó.

[0116] Sau khi việc tháo xả dầu đã được làm giàu kết thúc, quan sát thấy rằng một phần dầu từ loài nhuyễn thể đã được làm giàu vẫn ở trong bình chiết trên hệ phân phối và ở bề mặt đáy của bình này, mà được ước tính là thấp hơn 2% tổng khối lượng của dầu đã được làm giàu. Trên quy mô thương mại, dầu bất kỳ còn lại như vậy được thu hồi vào mẻ tiếp theo của dầu từ loài nhuyễn thể cho thiết bị chiết.

[0117] Trước khi phân tích astaxanthin và phospholipit, dầu đã được làm giàu được làm nóng trong lò ở 55°C trong thời gian 1 giờ. Việc này cho phép mẫu là đủ lỏng để khuấy để đạt được mẫu đồng nhất để phân tích.

[0118] Bảng 1-2 tóm tắt khối lượng, và hàm lượng phospholipit (PL) và astaxanthin (Asta) đối với dầu nạp, dầu chiết chiết được và dầu đã được làm giàu. Rất ít phospholipit (<1g/100g chiết phẩm) và astaxanthin (<2mg/100g chiết phẩm) được chiết đồng thời. Nói chung, khối lượng của chiết phẩm thu được từ quy trình làm giàu là 98% chiết phẩm lý thuyết cần để làm giàu đến 62% phospholipit.

Bảng 1-2: Tóm tắt hàm lượng Phospholipit (PL) và Astaxanthin (Asta)

	Khối lượng (g)	Khối lượng (% nạp)	%PL (g/100g)	khối lượng PL (g)	PL (%) nạp)	Asta (mg/100g)	khối lượng Asta (mg)	Asta (%) nạp)
Nạp	5870,0	100	42,5	2494,8	100	21	1232,7	100
Chiết	1939,0	33	1,0	19,4	0,8	1,7	32,3	2,6
Làm giàu	3835,6	65,3	62,0	2378,1	95,3	24	902,5	74,7
Tổng ra	5774,6	98,4		2397,5	96,1		952,9	77,3

Bảng 1-3 và bảng 1-4 tóm tắt hàm lượng thành phần của dầu đã được làm giàu

Bảng 1-3: Phân tích PL ở mẫu dầu từ loài nhuyễn thể theo ^{31}P NMR

Phospholipit (PL)		% tổng trọng lượng PL	g/100g mẫu
Phosphatidylcholin	PC	72,9	45,2
Alkyl axyl phosphatidylcholin	AAPC	10,0	6,2
Phosphatidylinositol	PI	1,3	0,8

Phospholipit (PL)		% tổng trọng lượng PL	g/100g mẫu
Phosphatidylserin	PS	0,7	0,4
Lysophosphatidylcholin	LPC	7,6	4,7
Lyso alkyl axyl phosphatidylcholin	LAAPC	0,6	0,4
Phosphatidyletanolamin	PE	1,1	0,7
Alkyl axyl phosphatidyletanolamin	AAPE	1,3	0,8
Cardiolipin + N-axyl phosphatidyletanolamin	CL/NAPE	3,8	2,4
Lysophosphatidyletanolamin	LPE	0,5	0,3
Lyso alkyl axyl phosphatidyletanolamin	LAAPE	0,2	0,1
Tổng hàm lượng PL			62,0

Bảng 1-4: Phân tích axit béo theo GC

Axit béo	g/100g mẫu (được thể hiện là FFA)
14:0	4,3
15:0	0,3
16:0	14,9
16:1 n-9	0,3
16:1 n-7	2,4
16:1 n-5	0,4
i17:0	0,2
16:2	0,7
17:1	0,2
i18:0	0,3
16:4 n-1	0,3
18:0	0,8
18:1 n-9	6,2
18:1 n-7	4,4
18:1 n-5	0,2
18:2 n-6	1,3
18:3 n-3	0,9
18:4 n-3	2,2
20:1 n-9	0,5

Axit béo	g/100g mẫu (được thể hiện là FFA)
20:1 n-7	0,2
20:4 n-6	0,3
20:4 n-3	0,3
20:5 n-3 (EPA)	13,6
22:1 n-11	0,6
21:5 n-3	0,4
22:5 n-3	0,4
22:6 n-3 DHA	8,2
Khác	1,1
Tổng n-3	26,0
Tổng axit béo	66,5

Ví dụ 2 -

[0119] Phần chiết lipid từ con trai được điều chế theo WO97/09992 và được sử dụng ở dạng PCSO-524[®] (Pharmalink International Limited, Hong Kong). Dầu từ loài nhuyễn thể điều chế được theo quy trình này của Ví dụ 1, có hàm lượng thành phần như nêu trong bảng 1-3 và bảng 1-4 nêu trên.

Điều chế mẫu

[0120] Các mẫu tươi mới được điều chế hằng ngày. Các mẫu được trộn bằng cách đảo lộn trước khi lấy mẫu. Các mẫu được cân trong các ống ly tâm loại dung tích 1,5ml và pha đến 100mg/ml bằng ethanol để điều chế nguyên liệu. Hỗn hợp được điều chế bằng cách cân dầu theo tỷ lệ chính xác và tiếp đó pha đến nồng độ bằng ethanol. Các dung dịch pha loãng theo bậc của dung dịch gốc được pha trong ethanol. Tiếp đó, các dịch pha loãng theo bậc được pha loãng (1 trong 100) trong môi trường nuôi cấy tế bào trước khi được bổ sung vào tế bào (lặp lại ba lần) với các dịch pha loãng cuối cùng 1 trong 10. Bước này tạo ra nồng độ etan 0,1% đối với tất cả các liều và các đối chứng. Dầu từ loài nhuyễn thể chứa khoảng 62% trọng lượng phospholipit. Phần chiết lipid từ con trai được sử dụng ở dạng PCSO-524[®].

[0121] Các chữ viết tắt được dùng trong việc thể hiện các kết quả được nêu trong Bảng 2-1 dưới đây:

Bảng 2-1: Các chữ viết tắt

Chữ viết tắt	Mô tả
LY	PCSO-524 [®]
Nhuễn thể	Dầu từ loài nhuyễn thể (62%PL)
90%	Hỗn hợp bao gồm 90% trọng lượng LY và 10% trọng lượng loài nhuyễn thể.
75%	Hỗn hợp bao gồm 75% trọng lượng LY và 25% trọng lượng loài nhuyễn thể
50%	Hỗn hợp bao gồm 50% trọng lượng LY và 50% trọng lượng loài nhuyễn thể
Oliu	dầu ô liu loại thực phẩm
1400W	CAS No 214358-33-5
Dexa	Dexamethason
Điclo	Điclofenac

Thử nghiệm

[0122] Hoạt tính kháng viêm được xác định ở tế bào đơn nhân lớn của chuột đã được kích thích bằng lipopolysaccharit (LPS) và interferon γ (IFN γ), các tế bào RAW264.7 được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy tế bào chuẩn và được ủ với LPS và IFN γ khi có hoặc không có các hợp chất thử nghiệm/các chiết xuất khác nhau và các đối chứng tích cực. Mức độ sản sinh các chất trung gian gây viêm, kể cả NO, PGE₂ và LTB₄, các xytokin TNF α và IL-6, được đo theo các phương pháp đã được thiết lập bằng cách sử dụng các kit thương mại. Mỗi mẫu được thử với ít nhất là 3 nồng độ (bằng cách sử dụng 3 bản sao, nồng độ tối đa là 100 μ g/ml) (n=9), với các đối chứng nội bộ liên quan (Bảng 2-2). Mức độ độc tế bào của từng mẫu cũng được xác định theo thử nghiệm MTT. Không phát hiện được độc tính tế bào đối với nồng độ bất kỳ đã được thử.

[0123] Các thông số thử nghiệm đối với mỗi thử nghiệm được tóm tắt trong Bảng 2-2. Một cách vắn tắt, để thực hiện thử nghiệm kháng viêm, tế bào RAW264.7 đã nuôi cấy được đếm và được cấy lên đĩa (0,8 x 10⁵ tế bào/lỗ) vào các đĩa loại 96 lỗ và ủ trong thời gian cấy đĩa đã được chỉ định. Tiếp đó, môi trường được hút ra và thay thế bằng môi trường mới, tiếp theo là bổ sung các hợp chất thử nghiệm. Các hợp chất được ủ trong thời gian 1 giờ trước khi bổ sung chất kích thích vào. Sau đó, các đĩa này được ủ trong khoảng thời gian từ 4 giờ đến 18 giờ và dịch nổi được phân tích về thực thể trung gian đang được quan tâm, sức sống của tế bào còn lại được xác định theo MTT.

[0124] Đối chứng tích cực được chọn lọc trên cơ sở mức độ sử dụng phổ biến của chúng

trong các thử nghiệm tương tự, kể cả N-(3-(aminometyl)benzyl)axetamidin (1400W), chất ức chế liên kết chặt chẽ chậm đối với nitric-oxid synthaza để cảm ứng (iNOS) (xem tài liệu: Garvey, E. P., *et al*, *J Biol Chem*, 1997, 21:272(8):4959-63), và dexamethason, chất ức chế xytokin thường được sử dụng. Diclofenac là tác nhân kháng viêm chung loại không steroid và chất ức chế đã biết của xyclooxygenaza (COX) mà tạo ra PGE₂.

Bảng 2-2: Các thông số thử nghiệm

Thử nghiệm	Thời gian cấy trên đĩa	Kích thích	Thời gian ủ	Nhà cung cấp kit	Đối chứng được sử dụng
NO	48 giờ	LPS (50ng/ml) IF γ (50 đơn vị/ml)	18 giờ	Griess Reagent	1400W (Cayman)
TNF α	48 giờ	LPS (50ng/ml) IF γ (50 đơn vị/ml)	18 giờ	Peprtech (USA)	Dexamethason (do Sigma cung cấp)
IL-6	48 giờ	LPS (50ng/ml) IF γ (50 đơn vị/ml)	18 giờ	Peprtech (USA)	Dexamethason (do Sigma cung cấp)
PGE ₂	24 giờ	LPS (50ng/ml) IF γ (50 đơn vị/ml)	18 giờ	Cayman Chemical (USA)	Diclofenac (do Sigma cung cấp)

Kết quả

1. Thử nghiệm nitơ oxit

[0125] NO là chất chuyển hóa gốc, mà đã được thấy có nhiều chức năng sinh lý vừa làm phân tử phát tín hiệu và vừa làm tác nhân có độc tính ở bệnh viêm (xem tài liệu: Coleman, 2001). NO thu được từ việc oxy hóa L-arginin nhờ ba loại nitơ oxit synthaza (NOS); các dạng cơ định, NOS của tế bào thần kinh và NOS của màng trong, và dạng dễ cảm ứng, iNOS, ban đầu được bộc lộ ở tế bào đơn nhân lớn của chuột (xem tài liệu: Nathan & Xie, 1994; Stuehr & Marletta, 1985). Dạng dễ cảm ứng được hoạt hóa một cách liên tục sau khi đã được biểu hiện, và do đó được điều tiết ở mức độ phiên mã nhờ NF- κ B, đã được kích thích bởi các phân tử viêm kiểu LPS và IFN- γ . Việc sản sinh NO nhờ các gene iNOS của thời gian trễ trước khi NO được tạo ra ở mức ổn định cao hơn nhiều (nM) (xem tài liệu: Nathan & Xie, 1994). Dạng dễ cảm ứng của NOS có thể liên quan nhất đến bệnh viêm và do lượng NO sản sinh ra cao hơn NO nên nó dễ được đánh giá *in vitro* hơn.

[0126] NO là phân tử phát tín hiệu bất thường. Do không có thụ thể đặc hiệu ở bề mặt tế bào cho NO nên nó đi vào các tế bào một cách bừa bãi, trong đó tác dụng phụ thuộc vào loại tế bào và nồng độ NO, do đó tạo ra nhiều loại đáp ứng sinh lý. NO khiến độ thấm mạch tăng, mức độ giãn mạch và việc sản sinh ra các gốc mà gây ra hiện tượng phá hủy mô và loại bỏ tác nhân gây bệnh (xem tài liệu: Guzik, Korbust, & Adamek-Guzik, 2003). Các thay đổi sinh lý này liên quan đến bệnh viêm với lưu lượng máu tăng, cho phép nhiều tế bào miễn dịch hơn đi vào mô bị tác động bằng cách đó phá hủy tác nhân gây bệnh.

[0127] Các kết quả về thử nghiệm ức chế NO được thể hiện trên Hình 1A và Hình 1B và Bảng 2-3

Bảng 2-3: IC₅₀ đối với mức độ ức chế NO

	LY	Nhuỷn thể	90%LY	75%LY	Dầu oliu	1400W
IC ₅₀	~107	~286	44,8	40,9	Không hoạt tính	1,6

2. Yếu tố hoại tử khối u - alpha

[0128] TNF α là protein phát tín hiệu của tế bào (xytokin) chủ yếu tham gia vào đáp ứng viêm pha cấp. Tế bào đơn nhân lớn là nguồn TNF α chính, mặc dù nó có thể được giải phóng bởi nhiều loại tế bào khác như tế bào lympho CD4+, các tế bào diệt tự nhiên (NK), bạch cầu trung tính, tế bào nuôi, tế bào ưa eosin, và tế bào thần kinh. TNF α được tạo ra bằng cách hoạt hóa MAPK và NF- κ B. Nó hoạt động để tăng mức độ sản sinh chính nó và mức độ sản sinh xytokin viêm khác như interleukin-1 beta (IL-1 β). TNF α gây sốt, cảm ứng quá trình làm chết tế bào theo chương trình, chứng suy mòn, bệnh viêm và ức chế hiện tượng tạo khối u và sao chép virus. TNF α liên quan đến nhiều tình trạng bệnh, bao gồm, hiện tượng nhiễm trùng, chấn thương, chứng thiếu máu cục bộ, bệnh hen, bỏng, hội chứng rối loạn tiêu hóa, bệnh Alzheimer, ung thư, chứng trầm cảm nặng, bệnh viêm khớp và bệnh xơ cứng rải rác (xem các tài liệu: Cairns, Panacek, Harken, & Banerjee, 2000; Dowlati et al., 2010; Swardfager et al., 2010).

[0129] Các kết quả đối với thử nghiệm ức chế TNF α được thể hiện trên hình 2A và hình 2B và Bảng 2-4.

Bảng 2-4: IC₅₀ đối với sự ức chế TNF α

	LY	Nhuỷn thể	90%LY	75%LY	Dầu oliu	Dexa
--	----	-----------	-------	-------	----------	------

IC ₅₀	~238,7	~103,3	89	57	DNF*	3,328e-005
------------------	--------	--------	----	----	------	------------

* không khớp mô hình toán học của đường cong đáp ứng liều lượng

3. Interleukin-6

[0130] Giống như TNF α , IL-6 được xem là xytokin tiền viêm. IL-6 được tiết ra bởi tế bào T và tế bào đơn nhân lớn mà kích thích đáp ứng miễn dịch. IL-6 chịu trách nhiệm về mức tăng sản sinh bạch cầu trung tính ở tủy xương. Nó hỗ trợ sự phát triển của tế bào B và kháng sự biệt hóa của tế bào T thành tế bào T điều hòa. Nó có khả năng vượt qua ngưỡng máu não và khởi đầu quá trình tổng hợp PGE₂ ở vùng dưới đồi, nhờ đó làm thay đổi điểm thiết lập nhiệt độ thân thể (xem tài liệu: Banks, Kastin, & Gutierrez, 1994).

[0131] Các kết quả đối với thử nghiệm ức chế IL-6 được thể hiện trên hình 3A và hình 3B và Bảng 2-5

Bảng 2-5: IC₅₀ đối với ức chế IL-6

	LY	Nhuỷn thể	90%LY	75%LY	Dầu oliu	Dexa
IC ₅₀	22,4	13,4	11,5	10,4	~106,8	1,19

4. Prostaglandin E₂

[0132] Prostaglandin E₂ (PGE₂) là một trong số các lipid trung gian tạo ra được từ axit arachidonic (AA) nhờ hoạt động của enzym xyclooxygenaza (COX) và liên quan đến gây sốt, cảm giác đau, và viêm. Aspirin và các thuốc kháng viêm không steroid (NSAIDs) ức chế quá trình sinh tổng hợp prostanoit (kể cả PGE₂), gây ra tác dụng hạ sốt, giảm đau, và kháng viêm (xem các tài liệu: Kawahara, K., *et al*, 2015, và Kawabata, A., 2011).

[0133] Các kết quả được thể hiện trên hình 4A và hình 4B và Bảng 2-6.

Bảng 2-6: IC₅₀ đối với việc ức chế PG-E₂

LY	Nhuỷn thể	90% LY	75% Ly	50% LY	Điclo fenac	Dầu oliu
Không có hoạt tính	Không có hoạt tính	~112	~118	55,3	0,12	DNF*

* không khớp mô hình toán học của đường cong đáp ứng liều lượng

Tóm tắt kết quả

[0134] Phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể được thể hiện trong hệ thử nghiệm này ở nồng độ được thử để ức chế riêng rẽ NO, TNF α và IL-6, nhưng không ức chế PGE₂.

[0135] Tổ hợp gồm phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể có hiệu quả hơn phần chiết lipid từ con trai hoặc dầu từ loài nhuyễn thể riêng rẽ trong việc ức chế NO, TNF α và IL-6. Theo thử nghiệm PGE₂, cả phần chiết lipid từ con trai lẫn dầu từ loài nhuyễn thể riêng rẽ đều không thể hiện hoạt tính ức chế, nhưng khi tổ hợp thì thể hiện tác dụng ức chế.

Ví dụ 3 – Tính hiệp đồng

[0136] Phần chiết lipid từ con trai điều chế được theo WO97/09992 và sử dụng ở dạng PCSO-524[®]. Dầu từ loài nhuyễn thể được điều chế theo quy trình này của Ví dụ 1, có hàm lượng thành phần như nêu trong bảng 1-3 và bảng 1-4 nêu trên.

Các mẫu, điều chế và tổ hợp

[0137] Các mẫu nguyên liệu của PCSO-524[®] và dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng phospholipit cao được trộn bằng cách đảo lộn trước khi lấy mẫu thử nghiệm. Các mẫu được cân trong các ống ly tâm loại dung tích 15ml và được pha đến 100mg/ml bằng etanol để điều chế nguyên liệu. Các hỗn hợp này được điều chế bằng cách trộn dầu đã được pha loãng theo tỷ lệ chính xác. Các dung dịch pha loãng theo bậc được pha trong etanol. Tiếp đó, các dịch pha loãng theo bậc được pha loãng (1 trong 100) trong môi trường nuôi cấy tế bào trước khi được bổ sung vào các tế bào (lặp lại ba lần) với các dịch pha loãng cuối cùng 1 trong 10. Việc này tạo ra nồng độ etan 0,1% đối với tất cả các liều và các đối chứng. Các liều này được điều chế mới hằng ngày. **Error! Reference source not found.**3-1 thể hiện các chữ viết tắt được dùng cho từng mẫu.

Bảng 3-1: Chữ viết tắt tên mẫu

Chữ viết tắt	Mô tả
LY	PCSO-524 [®]
Nhuyễn thể	Dầu từ loài nhuyễn thể đã được làm giàu (62% PL)

Chữ viết tắt	Mô tả
LY90	Hỗn hợp bao gồm 90% trọng lượng LY và 10% trọng lượng loài nhuyễn thể
LY80	Hỗn hợp bao gồm 80% trọng lượng LY và 20% trọng lượng loài nhuyễn thể
LY70	Hỗn hợp bao gồm 70% trọng lượng LY và 30% trọng lượng loài nhuyễn thể
LY65	Hỗn hợp bao gồm 65% trọng lượng LY và 35% trọng lượng loài nhuyễn thể
LY60	Hỗn hợp bao gồm 60% trọng lượng LY và 40% trọng lượng loài nhuyễn thể
LY55	Hỗn hợp bao gồm 55% trọng lượng LY và 45% trọng lượng loài nhuyễn thể
LY50	Hỗn hợp bao gồm 50% trọng lượng LY và 50% trọng lượng loài nhuyễn thể
LY45	Hỗn hợp bao gồm 45% trọng lượng LY và 55% trọng lượng loài nhuyễn thể
LY40	Hỗn hợp bao gồm 40% trọng lượng LY và 60% trọng lượng loài nhuyễn thể
LY35	Hỗn hợp bao gồm 35% trọng lượng LY và 65% trọng lượng loài nhuyễn thể
LY30	Hỗn hợp bao gồm 30% trọng lượng LY và 70% trọng lượng loài nhuyễn thể
LY20	Hỗn hợp bao gồm 20% trọng lượng LY và 80% trọng lượng loài nhuyễn thể
LY10	Hỗn hợp bao gồm 10% trọng lượng LY và 90% trọng lượng loài nhuyễn thể
Oliu	Dầu ô liu hạng thực phẩm
1400W	CAS No 214358-33-5
Dexa	Dexamethason
CI	Khoảng tin cậy

Thử nghiệm

[0138] Hoạt tính kháng viêm được xác định ở tế bào đơn nhân lớn của chuột đã được kích thích bằng lipopolysacarit (LPS) và interferon γ (IFN γ), các tế bào RAW264.7 được nuôi cấy trong tiêu chuẩn môi trường nuôi cấy tế bào (DMEM, huyết thanh bào thai bê 5%) và ủ khi có hoặc không có các hợp chất thử nghiệm/các chiết xuất khác nhau và các đối chứng. Mức độ sản sinh các chất trung gian gây viêm, kể cả NO, các xytokin TNF α và IL-6, được đo theo các phương pháp đã được thiết lập bằng cách sử dụng kit ELISA thương mại (các nhà cung cấp đã được liệt kê trong

[0139]

[0140] **Bảng 3-2).** Từng mẫu được thử với ít nhất là 6 nồng độ (bằng cách sử dụng 3 lần lặp lại, nồng độ tối đa là 100 μ g/ml) (n=9), với các đối chứng nội bộ liên quan (được thể hiện trong

[0141]

[0142] **Bảng 3-2).** Mức độ độc đối với tế bào của từng mẫu được thử được xác định theo thử nghiệm MTT. Không phát hiện được độc tính đối với tế bào ở nồng độ bất kỳ đã được thử.

[0143] Các thông số thử nghiệm đối với mỗi thử nghiệm được tóm tắt trong

[0144]

[0145] **Bảng 3-2.** Một cách vắn tắt, đối với các thử nghiệm NO, TNF α và IL-6, tế bào RAW264.7 đã được nuôi cấy được đếm và được cấy lên đĩa ($0,8 \times 10^5$ tế bào/lỗ) ở các đĩa loại 96 lỗ và ủ trong thời gian 48 giờ. Tiếp đó, môi trường được hút ra và thay thế bằng môi trường mới, tiếp theo là bổ sung các hợp chất thử nghiệm vào. Các hợp chất được ủ trong thời gian 1 giờ trước khi bổ sung chất kích thích vào. Sau đó, các đĩa này được ủ trong thời gian 18 giờ và dịch nổi được phân tích về thực thể trung gian đang được quan tâm, mức sống còn lại của tế bào được xác định theo MTT.

[0146] Đối chứng tích cực được chọn lọc trên cơ sở mức độ sử dụng chúng phổ biến ở các thử nghiệm tương tự, kể cả N-(3-(aminometyl)benzyl)axetamidin (1400W), chất ức chế liên kết chặt chẽ chậm đối với nitric-oxid synthaza để cảm ứng (iNOS) (xem tài liệu: Garvey et al., 1997), và dexamethason, chất ức chế xytokin thường được sử dụng.

Bảng 3-2: Các thử nghiệm kháng viêm và các đối chứng tích cực

Thử nghiệm	Thời gian cấy đĩa	Kích thích	Thời gian ủ	Nhà cung cấp kit	Đối chứng tích cực
NO	48 giờ	LPS (50ng/ml), IFN γ (50 đơn vị/ml)	18 giờ	Griess Reagent	1400W (Cayman)
TNF α	48 giờ	LPS (50ng/ml), IFN γ (50 đơn vị/ml)	18 giờ	Peptotech (USA)	Dexamethason (do Sigma cung cấp)
IL-6	48 giờ	LPS (50ng/ml), IFN γ (50 đơn vị/ml)	18 giờ	Biogems (USA)	Dexamethason (do Sigma cung cấp)

Tính toán mức độ hiệp đồng

[0147] Mức độ hiệp đồng được thể hiện ở dạng chỉ số tổ hợp (Combination Index). Chỉ số tổ hợp hiệp đồng (CI) và trọng số isobologram IC₅₀ được tính bằng cách sử dụng phần mềm Compsyn. Đường cong đáp ứng liều lượng tạo ra được theo GraphPad Prism được chuyển thành 10 điểm thể hiện đường cong. Tiếp đó, 10 điểm này được nhập vào chương trình Compsyn mà tạo ra đường cong để khớp các điểm dữ liệu. Tốt hơn, nếu phương pháp này hầu như sao chép hoàn toàn đường cong đáp ứng liều lượng theo chương trình về tính hiệp đồng. Sau đó, đường cong khớp Compsyn được sử dụng để tính mức độ hiệp đồng. Mô hình

về mức độ hiệp đồng trên khoảng đã được thử có thể được quan sát ở đồ thị isobologram, mà dựng đồ thị mức đóng góp tương đối của mỗi thành phần vào hoạt tính ở IC_{50} . Có đường thẳng nối giữa hai thuốc được trộn (Biavatti, 2009). Các trị số dưới đường này biểu thị tính hiệp đồng, trên đường này được xem là cộng hợp và cao hơn đường này là đối kháng.

Kết quả

1. Thử nghiệm nitơ oxit

[0148] Các tổ hợp được thử nghiệm để xác định liệu chúng có thể hiện tác dụng ức chế hiệp đồng đối với phân tử phát tín hiệu viêm NO hay không. Trước hết, các tổ hợp được thử nghiệm với mức gia tăng 10%. Tổ hợp có hoạt tính nhất quan sát được là LY60. Sau đó, mức gia tăng 5% nữa được thử quanh LY60.

[0149] Các đường cong đáp ứng liều của các tổ hợp đã được thử LY90 đến LY10 được thể hiện trên các Hình 5A, 5B, 6A và 6B. Các trị số IC_{50} đối với mức độ ức chế NO và chỉ số tổ hợp được thể hiện trong các bảng 3-3 và 3-4. Chỉ số tổ hợp thấp hơn 1 biểu thị tính hiệp đồng. Đồ thị isobologram đối với mức gia tăng 10% được thể hiện trên hình 7.

Bảng 3-3: Các trị số IC_{50} đối với các tổ hợp ức chế NO LY90 đến LY10

	LY	K	LY90	LY8 0	LY7 0	LY60	LY5 0	LY4 0	LY3 0	LY2 0	LY1 0	1400W
IC_{50} ($\mu g/ml$)	204	265	105	109	74	67	83	85	111	125	134	25
95% CI ($\mu g/ml$)	136 đến 392	144 đến 1108	87 đến 136	88 đến 144	63 đến 90	59 đến 77	64 đến 117	68 đến 115	81 đến 183	98 đến 194	98 đến 248	21 đến 32

Bảng 3-4: IC_{50} (CI) và chỉ số tổ hợp đối với các tổ hợp ức chế NO LY75 đến LY45

	LY75	LY70	LY65	LY60	LY55	LY50	LY45
IC_{50} ($\mu g/ml$)	123	68	84	65	86	79	84
95% CI đối với IC_{50} ($\mu g/ml$)	97 đến 160	65 đến 85	69 đến 96	60 đến 73	70 đến 90	69 đến 89	73 đến 100
Chỉ số tổ hợp	0,80	0,50	0,55	0,48	0,54	0,77	0,61

2. Thử nghiệm $TNF\alpha$

[0150] Các tổ hợp được thử nghiệm để xác định liệu chúng có thể hiện tác dụng ức chế hiệp đồng đối với xytokin viêm $\text{TNF}\alpha$ hay không. Trước hết, các tổ hợp này được thử nghiệm với mức gia tăng 10%. Tổ hợp có hoạt tính nhất quan sát được là LY50. Sau đó, các mức gia tăng 5% nữa được thử nghiệm xung quanh LY50.

[0151] Các đường cong đáp ứng liều của các tổ hợp đã được thử nghiệm LY90 đến LY10 được thể hiện trên các Hình 8A, 8B, 8C, 9A và 9B. Các trị số IC_{50} về mức ức chế $\text{TNF}\alpha$ và chỉ số tổ hợp được thể hiện trong bảng 3-5 và bảng 3-6. Chỉ số tổ hợp thấp hơn 1 biểu thị tính hiệp đồng. Đồ thị isobologram đối với các mức gia tăng 10% được thể hiện trên hình 10.

Bảng 3-5: Các trị số IC_{50} về mức độ ức chế TNF

	LY	K	LY90	LY80	LY70	LY60	LY50	LY40	LY30	LY20	LY10
IC_{50}	~606	~966	-	56	64	53	43	48	64	61	77
95% CI	-	-	-	49 đến 67	- đến 75	44 đến 64	35 đến 50	37 đến 58	- đến 71	39 đến 90	56 đến 134

*- không thể ước tính được

Bảng 3-6: IC_{50} và CI đối với LY70 đến LY35 (n=9)

	LY70	LY65	LY60	LY55	LY50	LY45	LY40	LY35
IC_{50}	91	80	78	68	69	90	70	73
95% CI	64 đến 189	60 đến 137	64 đến 98	54 đến 87	60 đến 80	68 đến 128	57 đến 89	59 đến 92
Chỉ số tổ hợp	0,14	0,12	0,114	0,097	0,096	0,123	0,094	0,095

3. Thử nghiệm IL-6

[0152] Các tổ hợp được thử nghiệm để xác định liệu chúng có thể hiện tác dụng ức chế hiệp đồng đối với xytokin viêm IL-6. Trước hết, các tổ hợp được thử nghiệm với mức gia tăng 10%. Tổ hợp có hoạt tính nhất quan sát được là LY60. Sau đó, các mức gia tăng 5% được thử nghiệm xung quanh LY60.

[0153] Các đường cong đáp ứng liều của các tổ hợp đã được thử nghiệm LY90 đến LY10 được thể hiện trên các Hình 11A, 11B, 12A và 12B. Các trị số IC_{50} về mức độ ức chế IL-6 và chỉ số tổ hợp được thể hiện trong bảng 3-7 và bảng 3-8. Chỉ số tổ hợp thấp hơn 1 biểu thị tính hiệp đồng. Đồ thị isobologram đối với các mức gia tăng 10% được thể hiện trên hình 13.

Bảng 3-7: IC₅₀ về mức độ ức chế IL-6 (n=3)

	LY	K	LY9 0	LY8 0	LY7 0	LY6 0	LY5 0	LY4 0	LY3 0	LY2 0	LY1 0	Dex
IC ₅₀ (µg/ml)	173	114	~ 100	53	36	34	37	52	41	60	~ 60	0,010
95% CI (µg/ml)	104 đến 1311	92 đến 191		41 đến 61	29 đến 45	27 đến 42	30 đến 44	44 đến 60	32 đến 51	50 đến 72		0,004 đến 0,03

Bảng 3-8: IC₅₀ và chỉ số tổ hợp về mức độ ức chế IL-6

	LY70	LY65	LY60	LY55	LY50	LY45	LY40	LY35	LY30
IC ₅₀	36	39	34	43	37	49	52	41	41
95% CI	29 đến 45	33 đến 45	27 đến 42	37 đến -	30 đến 44	40 đến 58	44 đến 60	30 đến 54	32 đến 51
Chỉ số tổ hợp		0,27	0,23	0,31	0,27	0,37	0,4	0,32	0,32

Tóm tắt kết quả

[0154] Hệ thử nghiệm này thể hiện rằng phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, được sử dụng trong tổ hợp, đáp ứng các tiêu chí toán học về tính hiệp đồng trong việc ức chế NO, TNFα và IL-6.

Ví dụ 4 – Khảo sát bệnh nhân

[0155] Các bệnh nhân bị đau các loại / mắc các tình trạng bệnh lý viêm được dùng tổ hợp gồm phần chiết lipid từ con trai (ở dạng PCSO-542) và dầu từ loài nhuyễn thể (61% PL) theo tỷ lệ giữa PCSO-542 và dầu từ loài nhuyễn thể 75:25, ở dạng viên nang. Thành phần của viên nang này được thể hiện trong bảng 4-1.

Bảng 4-1: Thành phần của viên nang chứa 150mg hỗn hợp dầu

Thành phần	% trọng lượng
Thành phần nhồi	
Dầu oliu	66,67%
dầu từ loài nhuyễn thể (<i>Perna canaliculus</i>) PCSO-542*	25% (37,5mg)
dầu từ loài nhuyễn thể * (<i>Euphausia superba</i>)	8,33% (12,5mg)
Thành phần của lớp vỏ (trước khi sấy khô)	
Gelatin (của bò)	46,5
Glyxerin	12,6
Sorbtol	6,00

nước	34,9
------	------

*chứa 0,15% trọng lượng vitamin E

(tức là khoảng 0,056mg/viên nang)

[0156] Liều lượng thường nằm trong khoảng từ 2 đến 8 viên nang mỗi ngày, trên một, hai hoặc ba liều. Trước khi bắt đầu việc điều trị bệnh bằng tổ hợp này, các bệnh nhân thường dùng một hoặc nhiều NSAIDS, kể cả paracetamol hoặc ibuprofen, để quản lý cơn đau. Các kết quả được thể hiện trong bảng 4-2.

Bảng 4-2: Tóm tắt kết quả ở bệnh nhân

Bệnh nhân (giới tính/lứa tuổi)	Tình trạng bệnh lý	Mức độ đau trước khi điều trị (1 đến 10)	Mức độ đau sau khi điều trị (1 đến 10)	Các nhận xét khác
Nữ, 80 đến 84 tuổi	Đau nhiều ở đầu gối và vai	8	4	Mắc tình trạng trong 3 đến 12 năm. Cải thiện sau 2 đến 3 tuần điều trị (2 viên nang mỗi ngày).
Nam, 60 đến 64 tuổi	Hẹp ống sống thắt lưng	6 đến 8	0	Mắc tình trạng trong 2 đến 3 năm. Cải thiện sau 4 đến 5 ngày điều trị (6 đến 8 viên nang/ngày).
Nam, 40 đến 44 tuổi	Đau thắt lưng	7	4	Mắc tình trạng trong 15 năm. Cải thiện sau 7 ngày điều trị bệnh (3 viên nang/ngày).
Nữ, 45 đến 49 tuổi	Đau lưng mãn tính	8	4 đến 5	Mắc tình trạng trong thời gian 2 năm. Cải thiện sau 2 đến 3 tuần điều trị (3 viên nang/ngày).
Nam, 50 đến 54 tuổi	Đau khớp ở tay-tổn thương thần kinh/sưng khớp đốt ngón tay	6	2	Mắc tình trạng trong thời gian 2 năm. Cải thiện sau khi 1 tuần điều trị (3 viên nang/ngày).
Nam, 50 đến 54 tuổi	Đau lưng mạn tính—thoát vị đĩa đệm	2 đến 8, tùy theo hoạt động	2 đến 3	Mắc tình trạng trong 25 năm. Cải thiện sau 3 ngày điều trị bệnh (4 viên nang/ngày).
Nữ, 65 đến 69 tuổi	Đau đầu gối và vai mạn tính	10	5	Mắc tình trạng trong 5 năm. Cải thiện sau 2 tuần điều trị (4 viên nang/ngày).

Bệnh nhân (giới tính/lứa tuổi)	Tình trạng bệnh lý	Mức độ đau trước khi điều trị (1 đến 10)	Mức độ đau sau khi điều trị (1 đến 10)	Các nhận xét khác
Nam, 20 đến 24 tuổi	Dị ứng nặng – ho, viêm hốc mũi và chảy nước mũi	8	5	Mắc tình trạng trong 4 năm. Cải thiện sau 3 tuần điều trị (4 viên nang/ngày).
Nam, 40 đến 44 tuổi	Đau lưng – thoát vị đĩa đệm	9	5	Mắc tình trạng trong 8 năm. Cải thiện sau 3 tuần điều trị
Nữ, 50 đến 54 tuổi	Đau lưng	7	01 đến 1	Mắc tình trạng trong thời gian 1 tháng. Cải thiện sau khi 1 tuần điều trị
Nữ, 55 đến 59 tuổi	Loãng xương – đau thay đổi theo hoạt động	7 đến 8	1 đến 3	Mắc tình trạng trong 15 năm. Cải thiện sau khi 1½ tuần điều trị (4 viên nang/ngày).
Nam, 65 đến 69 tuổi	Đau đầu gối	8 đến 10	2 đến 3	Mắc tình trạng trong 14 năm. Cải thiện sau khi 1½ tuần điều trị (4 viên nang/ngày).
Nam, 50 đến 54 tuổi	Đau cổ, cứng gối	5	3	Mắc tình trạng trong vài năm. Cải thiện sau 3 tuần điều trị (3 viên nang/ngày).
Nam, 50 đến 54 tuổi	Đau người và đau ở gối và khuỷu tay sau phẫu thuật	7 đến 8	2 đến 3	Cải thiện sau vài ngày điều trị.
Nữ, 65 đến 69 tuổi	Viêm khớp/viêm gân ở khớp ngón tay	6	2	Mắc tình trạng trong vài tháng. Cải thiện sau vài ngày điều trị bệnh (6 viên nang/ngày).
Nữ	Bệnh viêm đa khớp dạng thấp	7	Đau khớp và đau giảm đáng kể	Mắc tình trạng trong hơn 10 năm. Cải thiện sau vài ngày điều trị bệnh (4 viên nang/ngày)
Nữ, 50 đến 54 tuổi	Hội chứng lupus/hội chứng đau do xơ cơ	8	4	Mắc tình trạng trong hơn 10 năm. Cải thiện sau 7 đến 8 ngày điều trị bệnh
Nam, 30 đến 34 tuổi	Đau vai, tăng sau khi	7	4	Cải thiện sau 2 tuần điều trị (4 viên nang/ngày)

Bệnh nhân (giới tính/lứa tuổi)	Tình trạng bệnh lý	Mức độ đau trước khi điều trị (1 đến 10)	Mức độ đau sau khi điều trị (1 đến 10)	Các nhận xét khác
	tập luyện			
Nữ	Tổn thương gối và mắt cá đã bị từ trước	5	3	Cải thiện sau 2 đến 3 tuần điều trị (4 viên nang/ngày)
Nam, 45 đến 49 tuổi	Thoát vị đĩa đệm, tổn thương vai và tay	10	Cải thiện chung	Mắc tình trạng trong vài tháng. Cải thiện sau khi 1 tuần điều trị (2 viên nang/ngày).
Nữ, 40 đến 44 tuổi	Gối không thoải mái (cảm giác kêu răng rắc)	4	0	Mắc tình trạng trong vài năm. Cải thiện sau 2 tuần điều trị (2 viên nang/ngày)
Nữ	Cứng khớp và đau lưng	Thay đổi hằng ngày	5 Cử động tay cải thiện	Mắc tình trạng trong vài năm. Cải thiện sau 1 tuần điều trị (2 viên nang/ngày)
Nữ, 55 đến 59 tuổi	Đau lưng	6	4	Mắc tình trạng trong vài năm. Cải thiện sau 2 tuần điều trị (3 viên nang/ngày)
Nam (già)	Đau khớp	6	2	Mắc tình trạng trong vài năm. Cải thiện sau 4 tuần điều trị (2 viên nang/ngày)
Nam	Đau vai và đau đầu gối	8	4	Mắc tình trạng trong vài năm. Cải thiện sau khi 1 tuần điều trị (2 viên nang/ngày)
Nam	Đau đầu gối	8	0	Cải thiện sau 1 tuần điều trị (4 viên nang/ngày).
Nữ	Viêm khớp	8	5	Cải thiện sau khi điều trị (4 viên nang/ngày)
Nam	Viêm khớp	8	5	Mắc tình trạng trong vài năm. Cải thiện sau khi điều trị (bệnh nhân thấy cải thiện hơn so với khi sử dụng Omega XL) (4 viên nang/ngày)
Nữ	Viêm khớp	6	3	Cải thiện sau khi điều trị (bệnh nhân thấy cải thiện hơn so với sử dụng Omega XL) (4 viên

Bệnh nhân (giới tính/lứa tuổi)	Tình trạng bệnh lý	Mức độ đau trước khi điều trị (1 đến 10)	Mức độ đau sau khi điều trị (1 đến 10)	Các nhận xét khác
				nang/ngày)

Tài liệu viện dẫn

- Biavatti, M. W. (2009). Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(3), 371-378.
- Cairns, C. B., Panacek, E. A., Harken, A. H., & Banerjee, A. (2000). Bench to bedside: Tumor necrosis factor-alpha: From inflammation to resuscitation. *Academic Emergency Medicine*, 7(8), 930-941.
- Coleman, J. W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol*, 1(8), 1397-1406.
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K., & Lanctot, K. L. (2010). A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. *Biological Psychiatry*, 67(5), 446-457. doi:10.1016/j.biopsych.2009.09.033
- Garvey, E. P., Oplinger, J. A., Furfine, E. S., Kiff, R. J., Laszlo, F., Whittle, B. J. R., & Knowles, R. G. (1997). 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 272(8), 4959-4963.
- Guzik, T. J., Korb, R., & Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*, 54(4), 469-487.
- Kawabata, A., (2011). Prostaglandin E₂ and Pain - An Update. *Biol Pharm Bull*, 34(8), 1170-1173
- Kawahara, K. (2015). Prostaglandin E₂-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1851 (4), 414-421
- Nathan, C., & Xie, Q. W. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 78(6), 915-918.
- Sinclair, A. J., Murphy, K. J. and Li, D. (2000) Marine lipids overview "news insights and lipid composition of Lyprinol". *Allerg Immunol (Paris)* 32(7), 261-271
- Stuehr, D. J., & Marletta, M. A. (1985). Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(22), 7738-7742.
- Swardfager, W., Lanctot, K., Rothenburg, L., Wong, A., Cappell, J., & Herrmann, N. (2010). A Meta-Analysis of Cytokines in Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry*, 68(10), 930-941.

YÊU CẦU BẢO HỘ

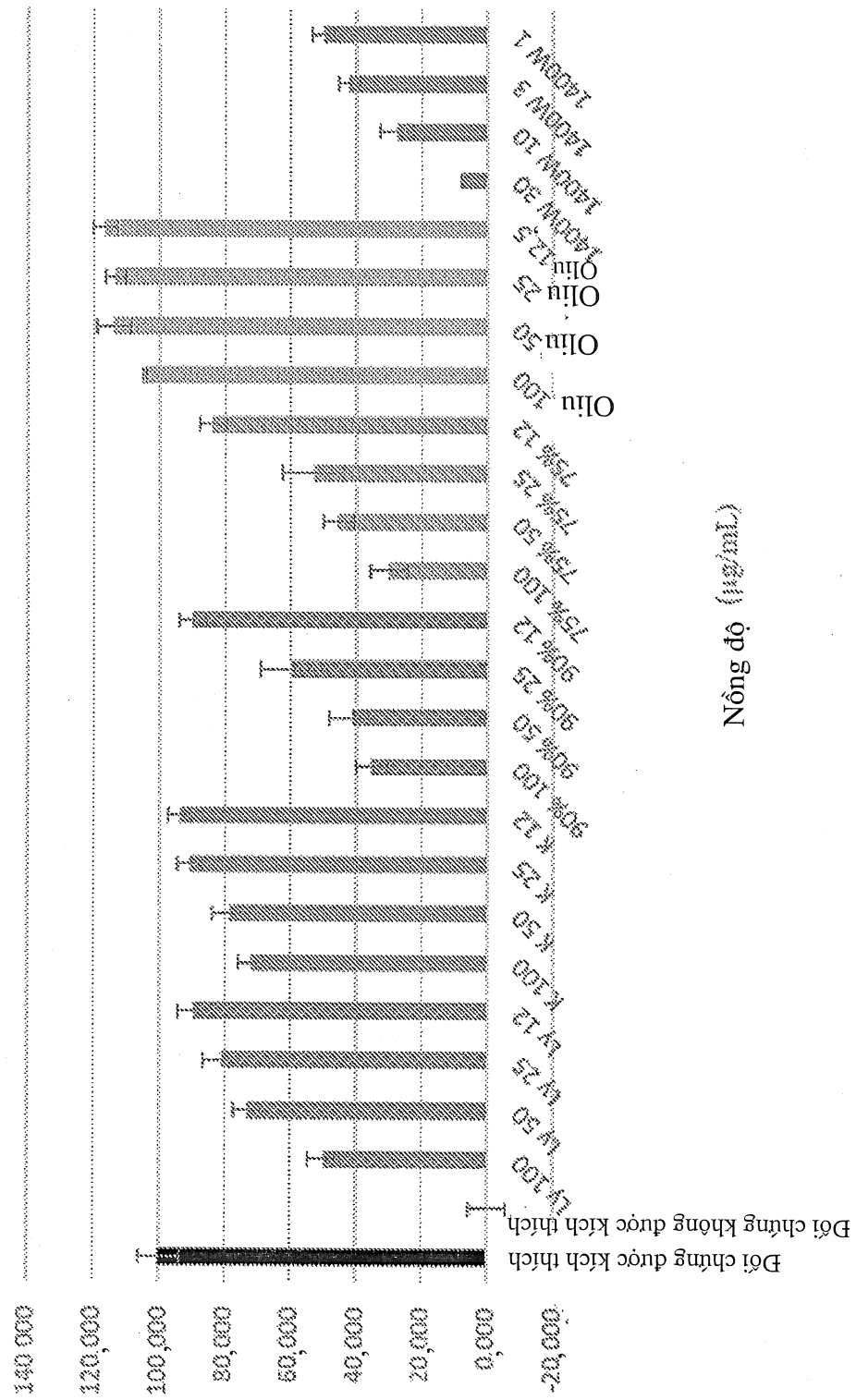
1. Tổ hợp gồm phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, trong đó tổ hợp này được làm thích ứng để dùng riêng rẽ hoặc đồng thời, trong đó phần chiết lipid từ con trai thu được từ *Perna canaliculus*, và trong đó tỷ lệ trọng lượng giữa phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể nằm trong khoảng 5:95 đến 99:1.
2. Tổ hợp theo điểm 1 ở dạng chế phẩm chứa phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể.
3. Tổ hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng phospholipid ít nhất là khoảng 40% trọng lượng, hoặc ít nhất là khoảng 50% trọng lượng, hoặc ít nhất là khoảng 60% trọng lượng.
4. Tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó dầu từ loài nhuyễn thể có hàm lượng nước khoảng 5% trọng lượng hoặc ít hơn; hoặc khoảng 3% trọng lượng hoặc ít hơn; hoặc khoảng 1% trọng lượng hoặc ít hơn; và/hoặc hàm lượng dung môi chiết 5% trọng lượng hoặc ít hơn; hoặc khoảng 3% trọng lượng hoặc ít hơn; hoặc khoảng 1% trọng lượng hoặc ít hơn.
5. Tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó tỷ lệ trọng lượng giữa phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể nằm trong khoảng 5:95 đến 95:5, hoặc khoảng 10:90 đến 90:10, như khoảng 10:90, hoặc khoảng 15:85, hoặc khoảng 20:80, hoặc khoảng 25:75, hoặc khoảng 30:70, hoặc khoảng 35:65, hoặc khoảng 40:60, hoặc khoảng 45:55, hoặc khoảng 50:50, hoặc khoảng 55:45, hoặc khoảng 60:40, hoặc khoảng 65:35, hoặc khoảng 70:30, hoặc khoảng 75:25, hoặc khoảng 80:20, hoặc khoảng 85:15, hoặc khoảng 90:10.
6. Tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 ở dạng liều lượng đơn vị dùng qua đường miệng.
7. Tổ hợp theo điểm 6, trong đó dạng liều lượng đơn vị dùng qua đường miệng là viên nang gel mềm.

8. Tổ hợp theo điểm 6 hoặc 7, trong đó dạng liều lượng đơn vị dùng qua đường miệng chứa khoảng từ 10mg đến 1,0g phần chiết lipid từ con trai; và/hoặc từ 10mg đến 1,0g dầu từ loài nhuyễn thể.
9. Tổ hợp theo điểm 8, trong đó dạng liều lượng đơn vị dùng qua đường miệng chứa khoảng 10mg, 20mg, 30mg, 40mg, 50mg, 100mg, 150mg, 200mg, 250mg, 300mg, 350mg, 400mg, 450mg, 500mg, 550mg, 600mg, 650mg, 700mg, 750mg, 800mg, 850mg, 900mg, 950mg hoặc khoảng 1g phần chiết lipid từ con trai; và/hoặc khoảng 10mg, 20mg, 30mg, 40mg, 50mg, 100mg, 150mg, 200mg, 250mg, 300mg, 350mg, 400mg, 450mg, 500mg, 550mg, 600mg, 650mg, 700mg, 750mg, 800mg, 850mg, 900mg, 950mg hoặc khoảng 1g dầu từ loài nhuyễn thể.
10. Tổ hợp theo điểm 9, trong đó dạng liều lượng đơn vị dùng qua đường miệng chứa khoảng 10mg đến 500mg phần chiết lipid từ con trai; và/hoặc khoảng 10mg đến 500mg dầu từ loài nhuyễn thể.
11. Tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số điểm từ 1 đến 10, trong đó dạng liều lượng đơn vị dùng qua đường miệng chứa khoảng 10mg đến 500mg tổ hợp chứa phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể.
12. Tổ hợp theo điểm 11, trong đó dạng liều lượng đơn vị dùng qua đường miệng chứa khoảng 50mg đến 300mg tổ hợp chứa phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể.
13. Tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó tổ hợp còn chứa một hoặc nhiều chất phụ gia và/hoặc chất mang dược dụng.
14. Tổ hợp theo điểm 13 chứa dầu làm chất mang, và tùy ý chất chống oxy hóa.
15. Tổ hợp theo điểm 14, trong đó dầu làm chất mang là dầu oliu.
16. Tổ hợp theo điểm 14 hoặc 15, trong đó dầu làm chất mang chiếm từ 10% trọng lượng đến 90% trọng lượng của tổng thành phần.

17. Tổ hợp theo điểm 14 hoặc 15, trong đó tỷ lệ trọng lượng giữa dầu làm chất mang với lượng tổ hợp gồm phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể nằm trong khoảng từ 3:1 đến khoảng 1:3.
18. Tổ hợp theo điểm 13, trong đó một hoặc nhiều chất phụ gia được chọn trong số các chất chống oxy hóa và vitamin A, vitamin D, vitamin E và vitamin K.
19. Tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18 bao gồm hoặc chủ yếu bao gồm phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể.
20. Tổ hợp để dùng trong việc điều trị viêm ở đối tượng, trong đó tổ hợp gồm phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, trong đó tổ hợp này được làm thích ứng để dùng riêng rẽ hoặc đồng thời, trong đó phần chiết lipid từ con trai thu được từ *Perna canaliculus*, và trong đó tỷ lệ trọng lượng giữa phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể nằm trong khoảng 5:95 đến 99:1.
21. Tổ hợp để dùng trong việc điều trị đau ở đối tượng, trong đó tổ hợp gồm phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, trong đó tổ hợp này được làm thích ứng để dùng riêng rẽ hoặc đồng thời, trong đó phần chiết lipid từ con trai thu được từ *Perna canaliculus*, và trong đó tỷ lệ trọng lượng giữa phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể nằm trong khoảng 5:95 đến 99:1.
22. Tổ hợp để dùng trong việc điều trị đau khớp hoặc cải thiện gồm phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể, trong đó tổ hợp này được làm thích ứng để dùng riêng rẽ hoặc đồng thời, trong đó phần chiết lipid từ con trai thu được từ *Perna canaliculus*, và trong đó tỷ lệ trọng lượng giữa phần chiết lipid từ con trai và dầu từ loài nhuyễn thể nằm trong khoảng 5:95 đến 99:1.

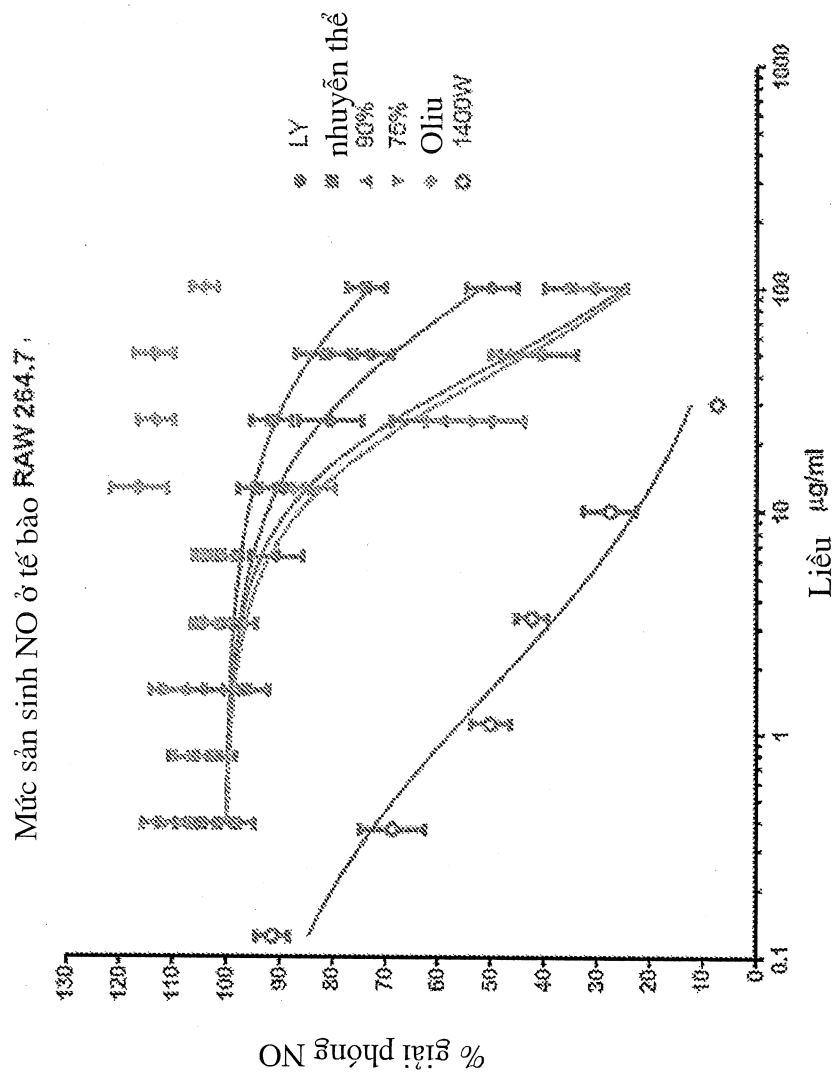
1/24

ức chế nitric oxit

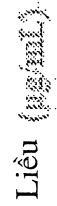
Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)

Hình 1A

2/24

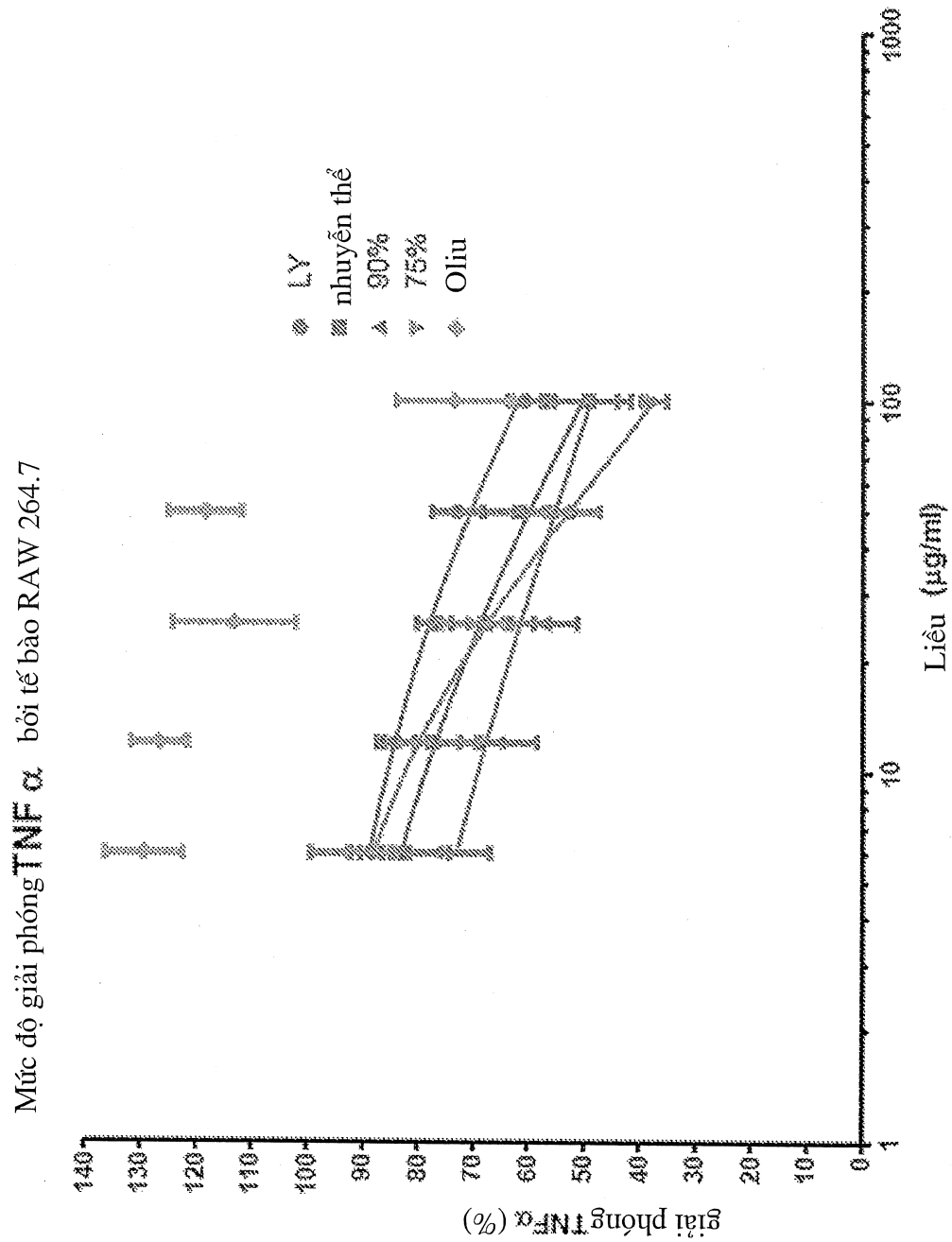


Hình 1B

ức chế TNF- α 

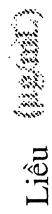
Hình 2A

4/24



Hình 2B

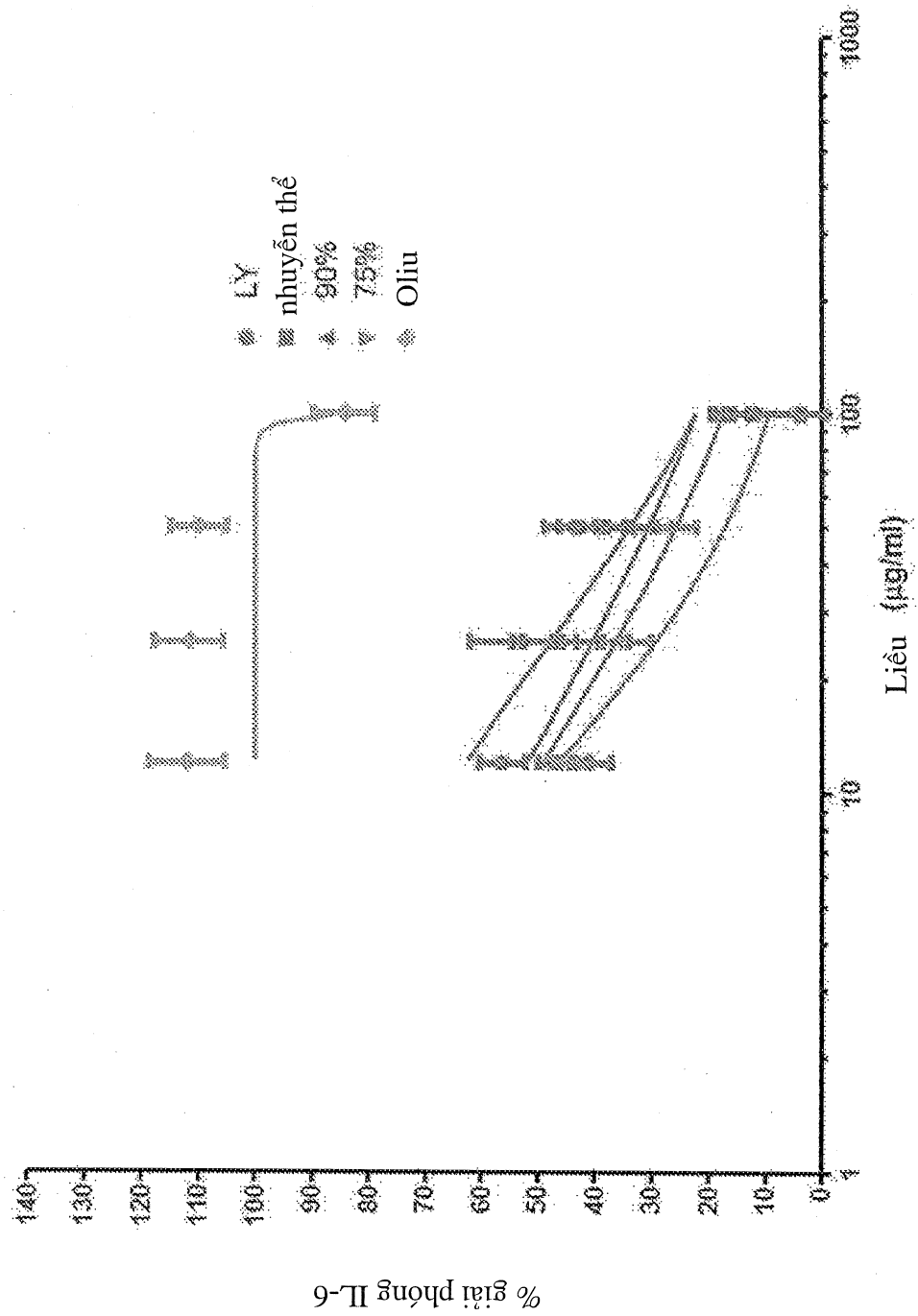
ức chế IL-6



Hình 3A

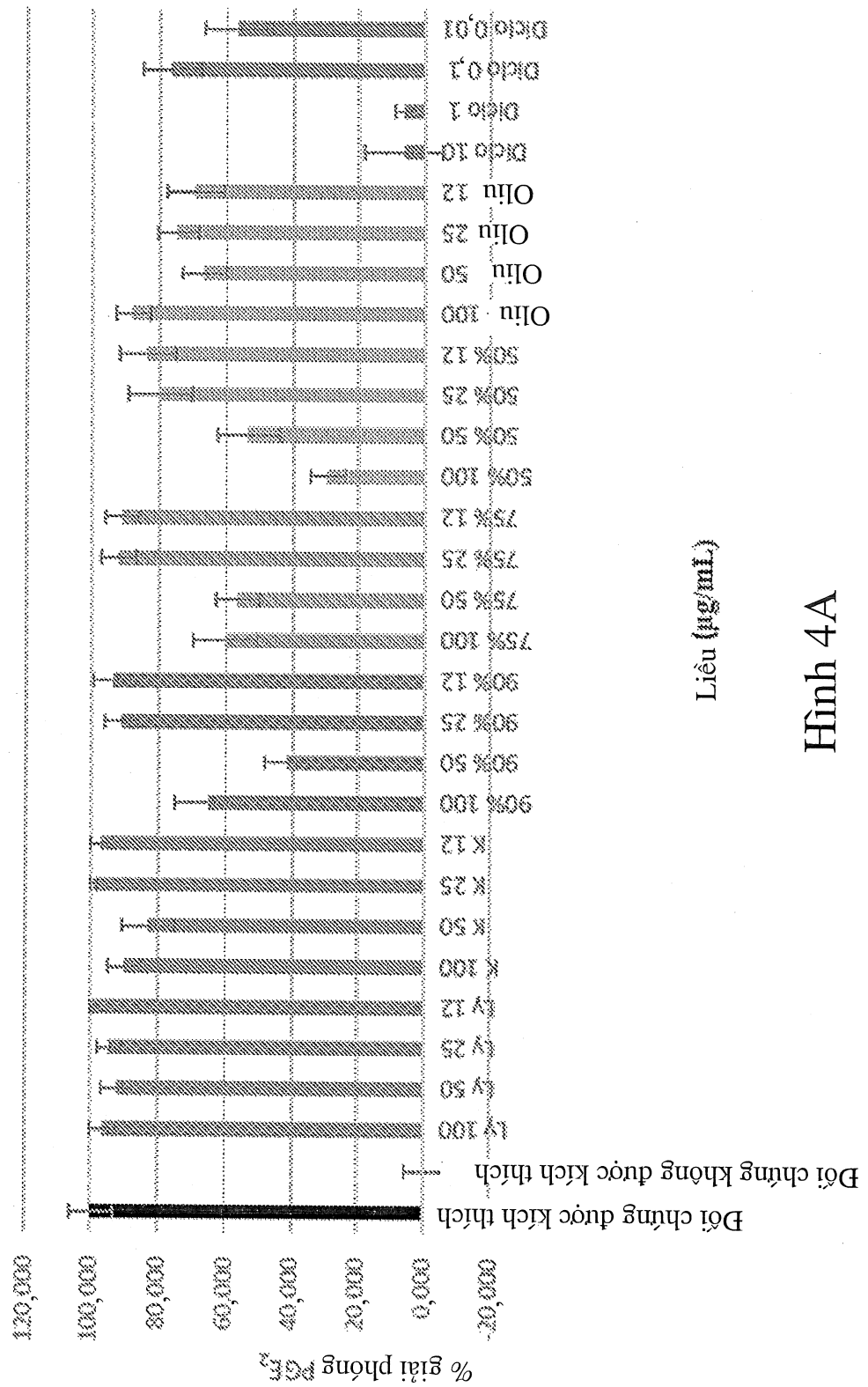
6/24

Mức độ giải phóng IL-6 bởi tế bào RAW 264.7



Hình 3B

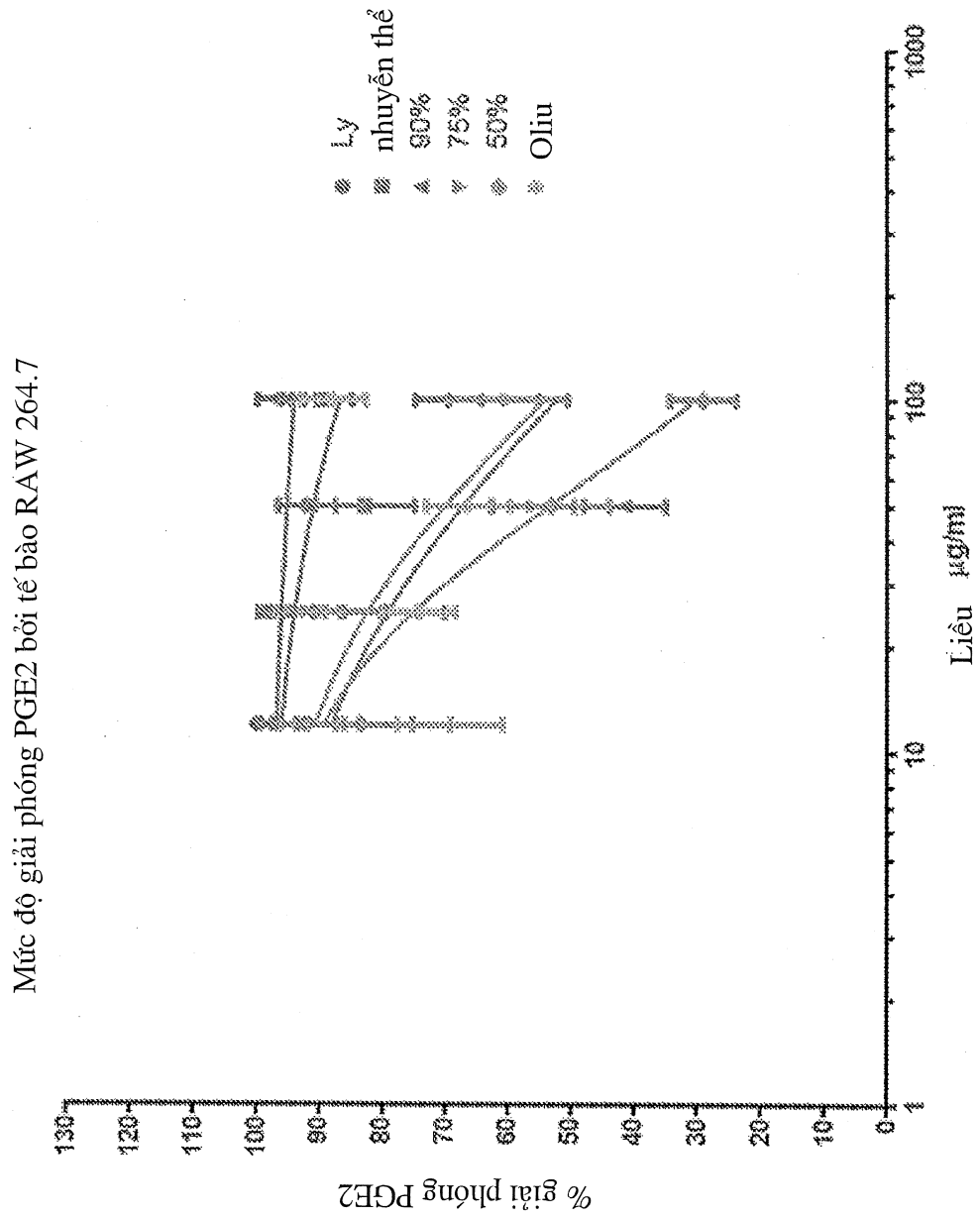
7/24

ức chế PG-E₂

Liều (µg/mL)

Hình 4A

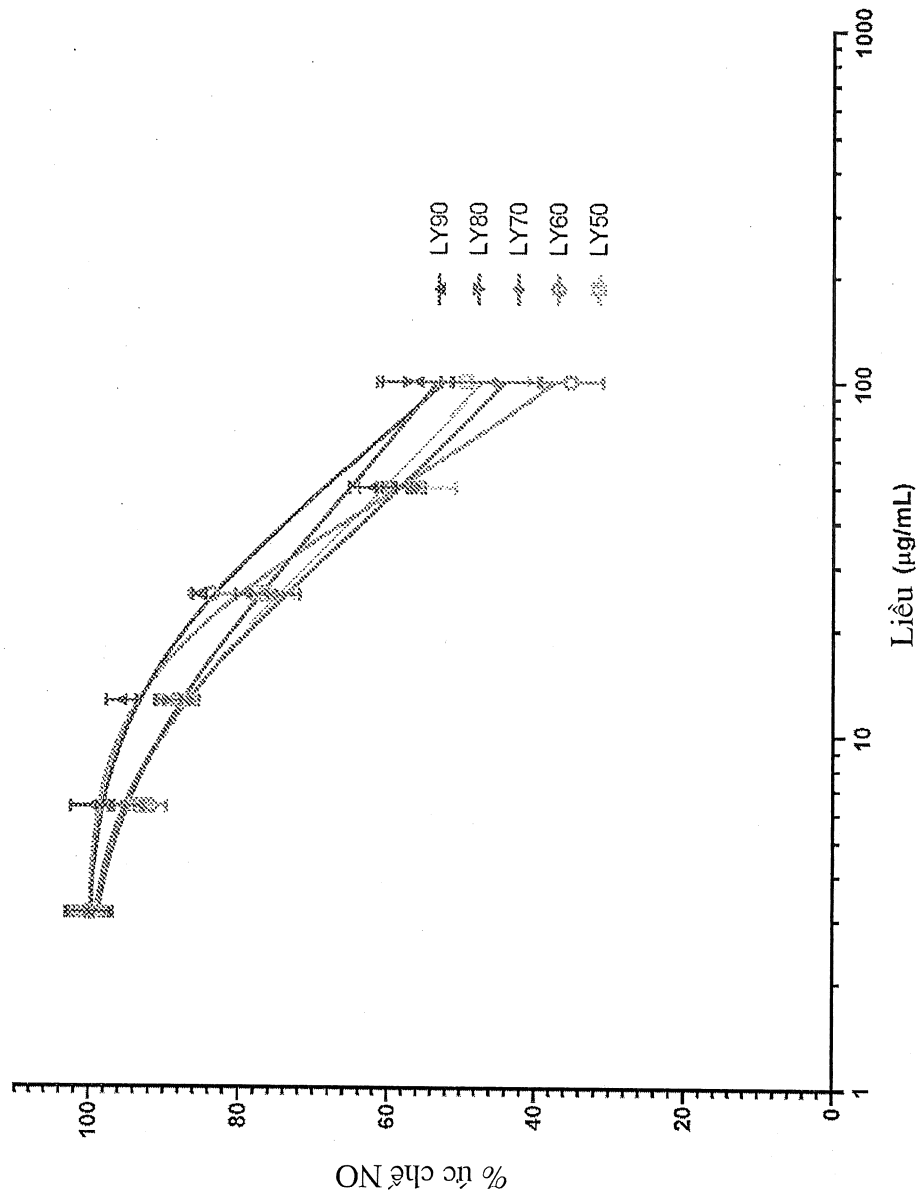
8/24



Hình 4B

9/24

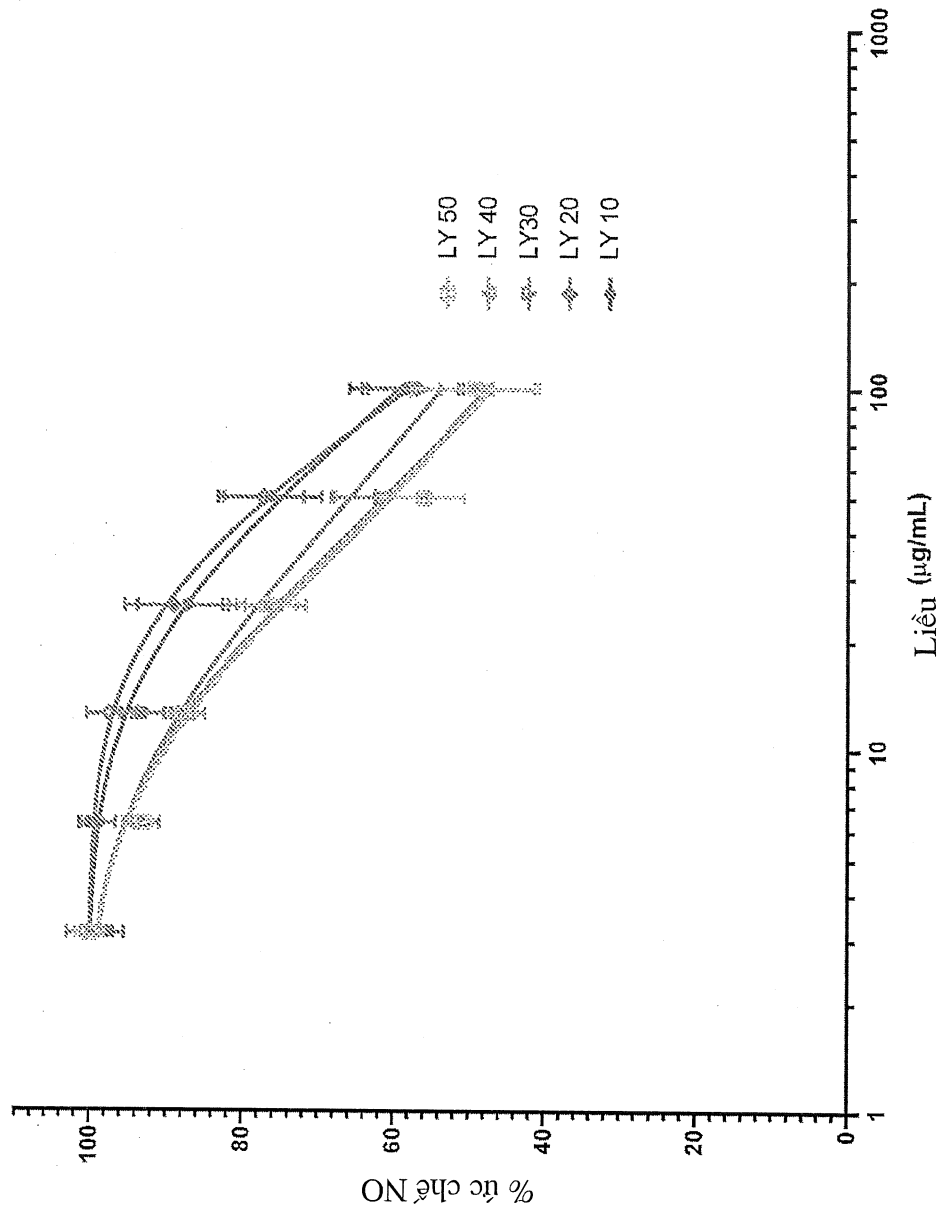
Mức độ giải phóng NO ở tế bào RAW 264.7 đã được kích thích bởi LPS và $\text{INF-}\gamma$



Hình 5A

10/24

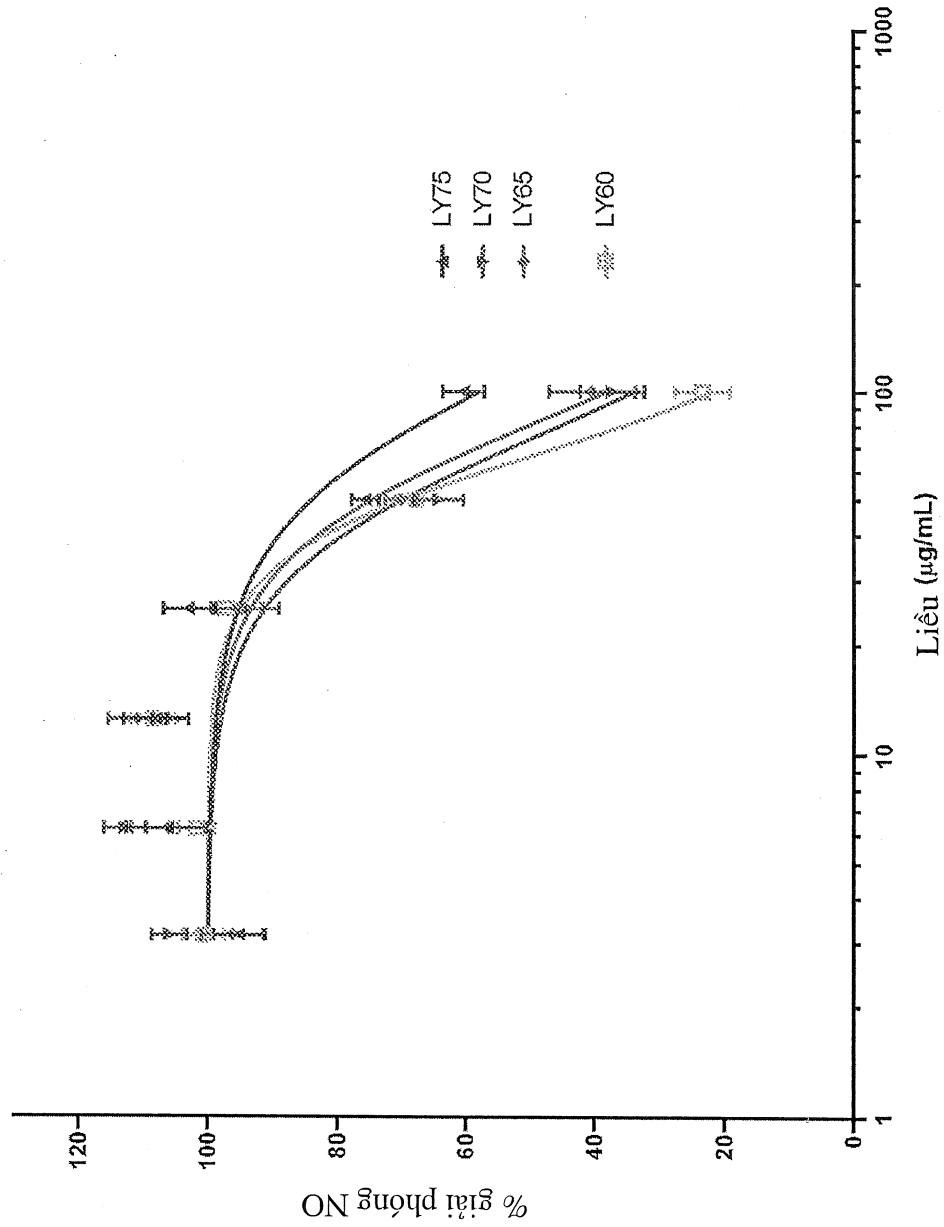
Mức độ giải phóng NO ở tế bào RAW 264.7 đã được kích thích bởi LPS và $\text{INF}\gamma$.



Hình 5B

11/24

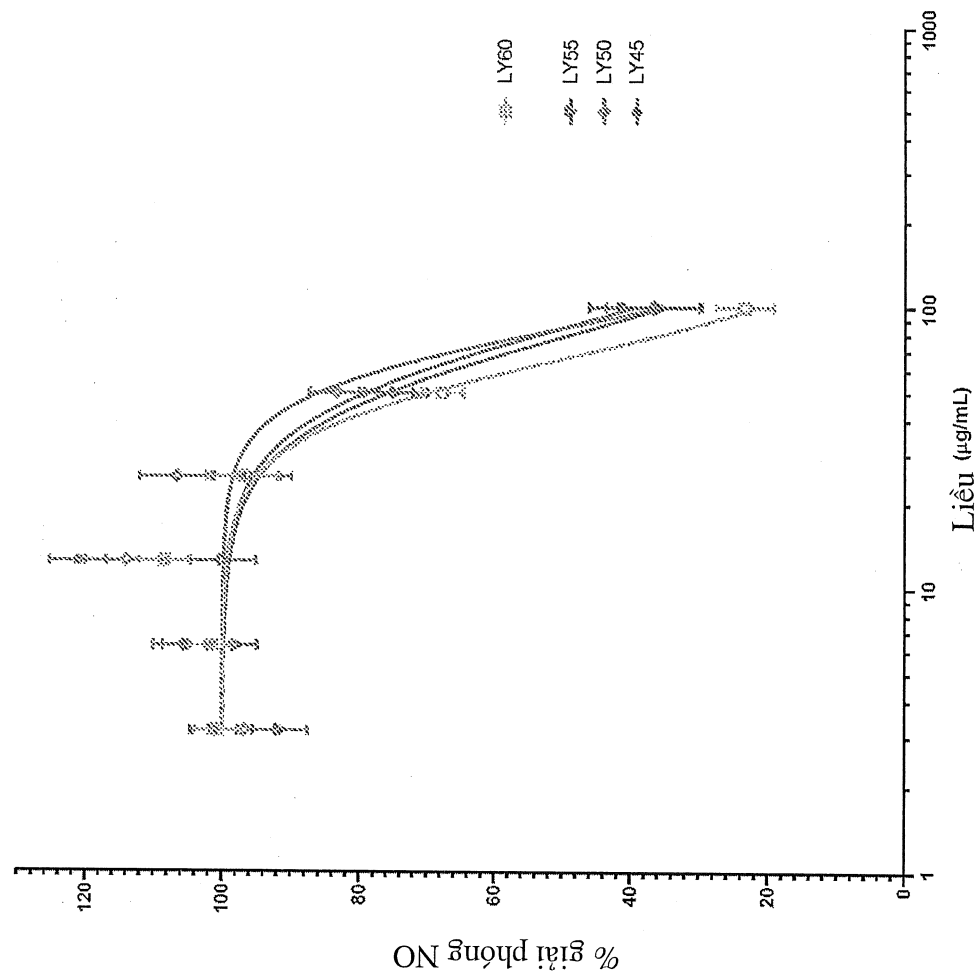
Mức độ giải phóng NO ở tế bào RAW 264.7 đã được kích thích bởi LPS và $\text{INF-}\gamma$



Hình 6A

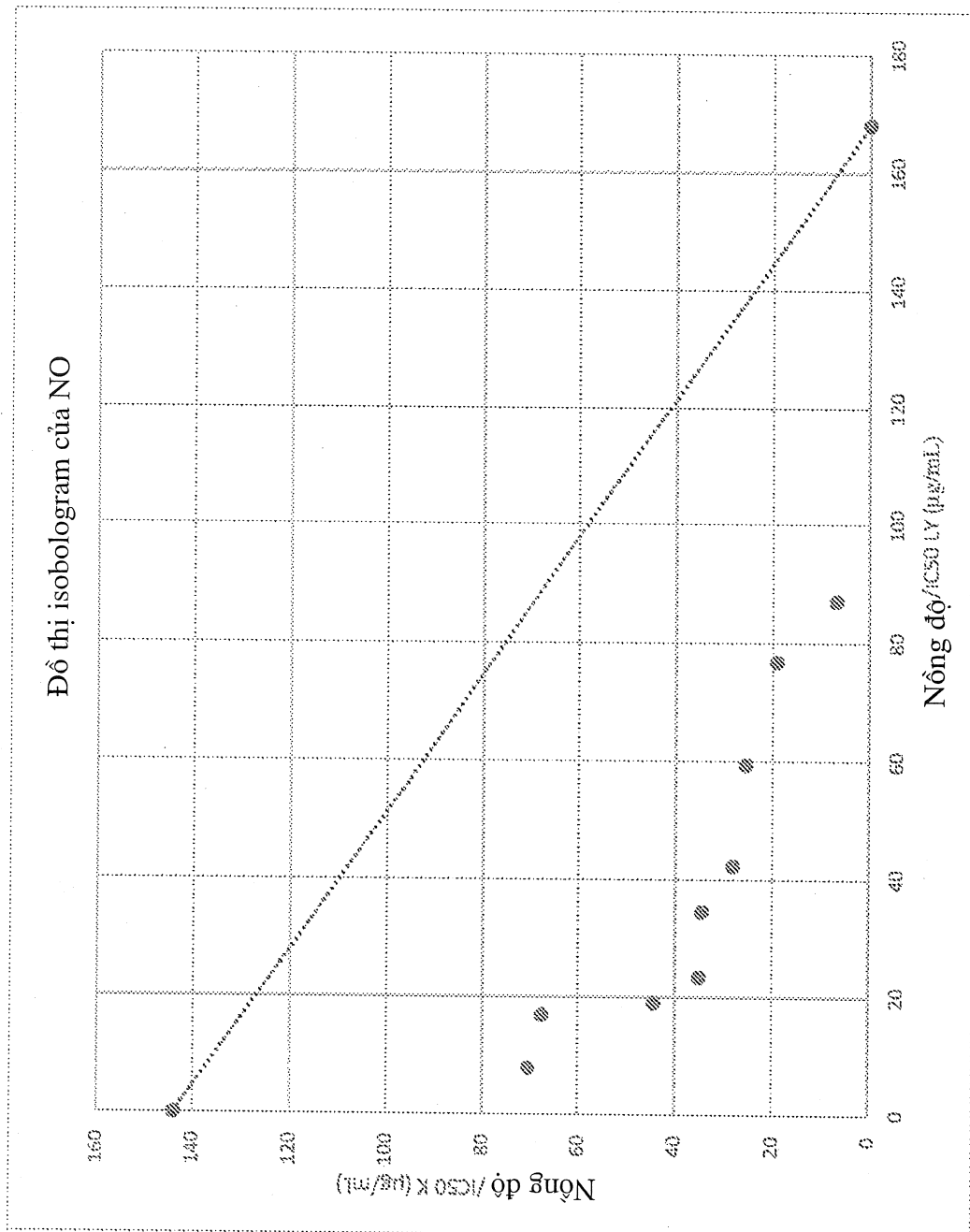
12/24

Mức độ giải phóng NO ở tế bào RAW 264.7 đã được kích thích bởi LPS và $\text{INF-}\gamma$



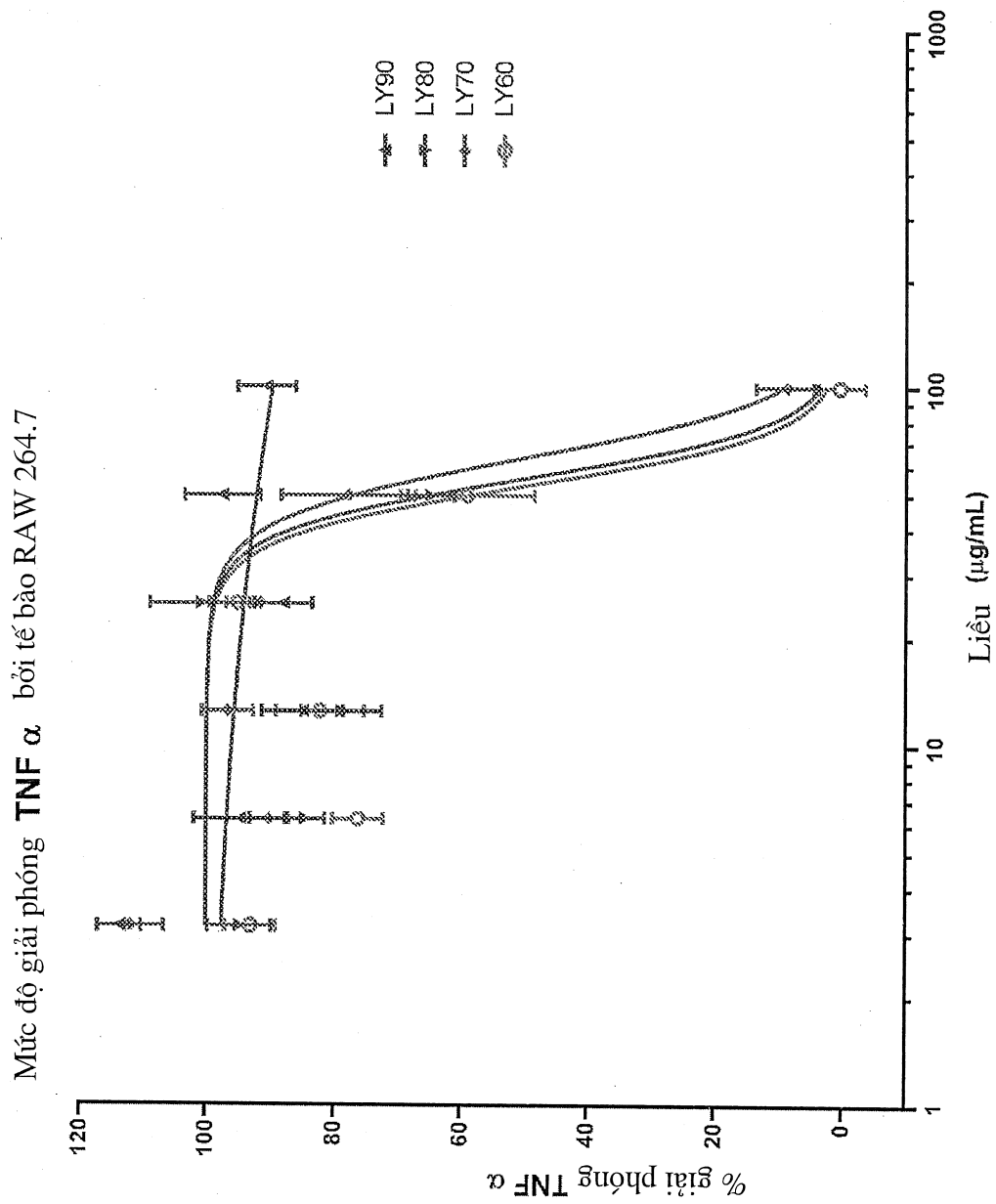
Hình 6B

13/24



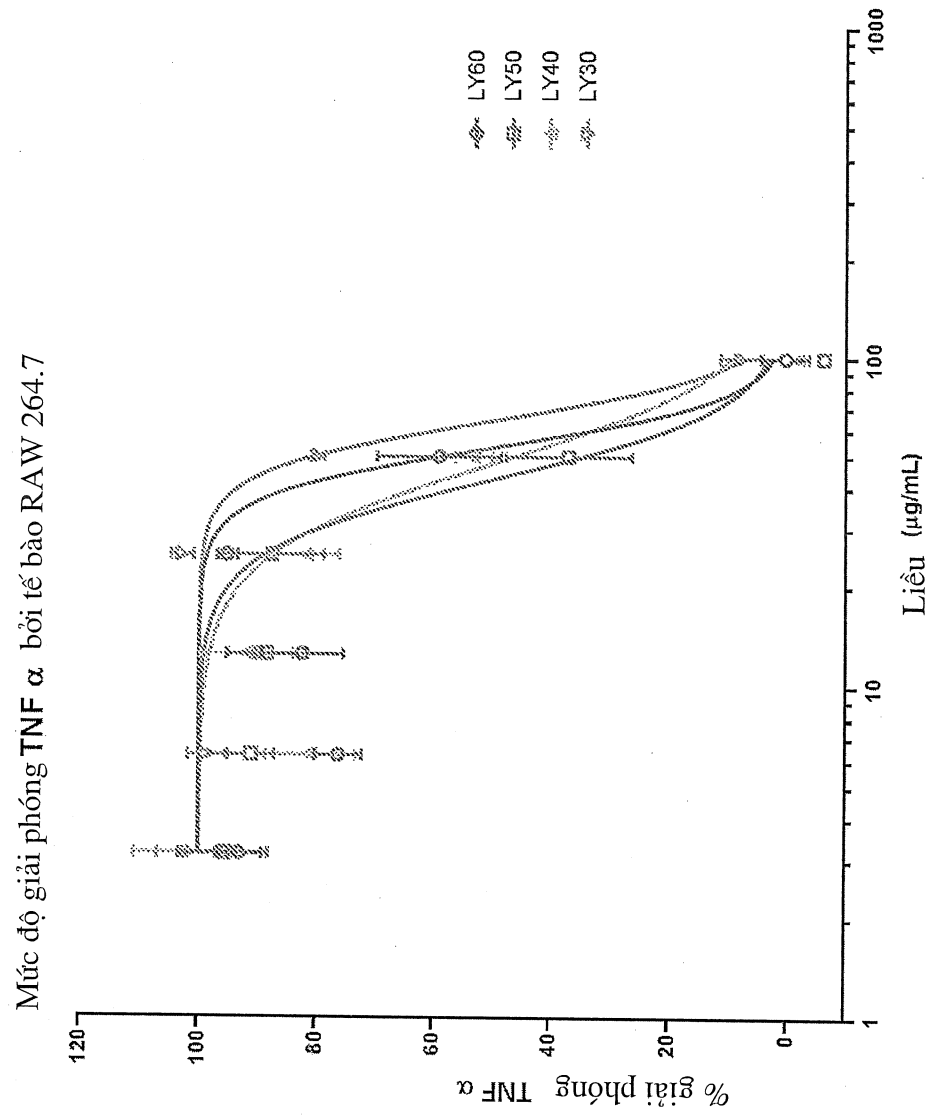
Hình 7

14/24



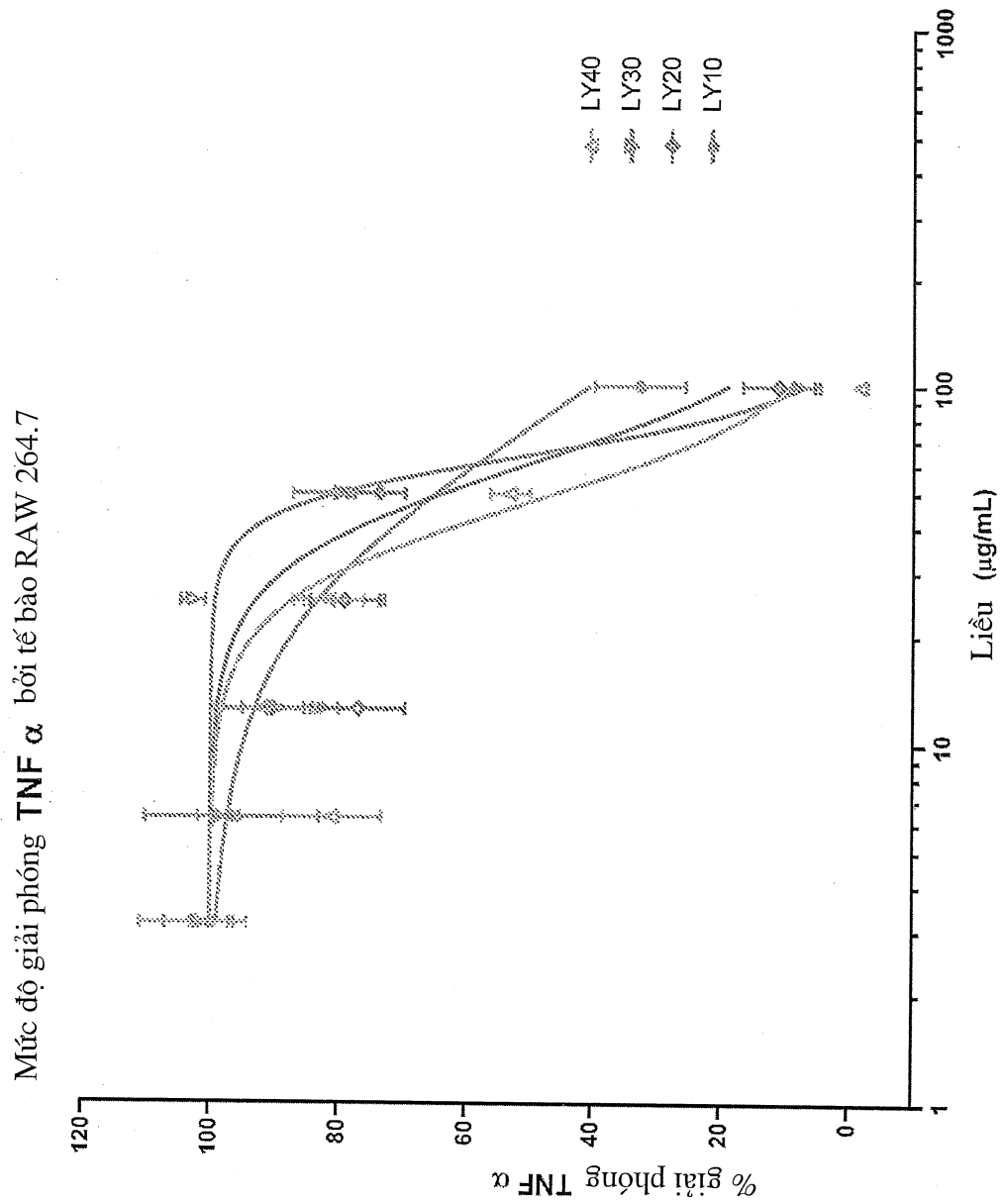
Hình 8A

15/24



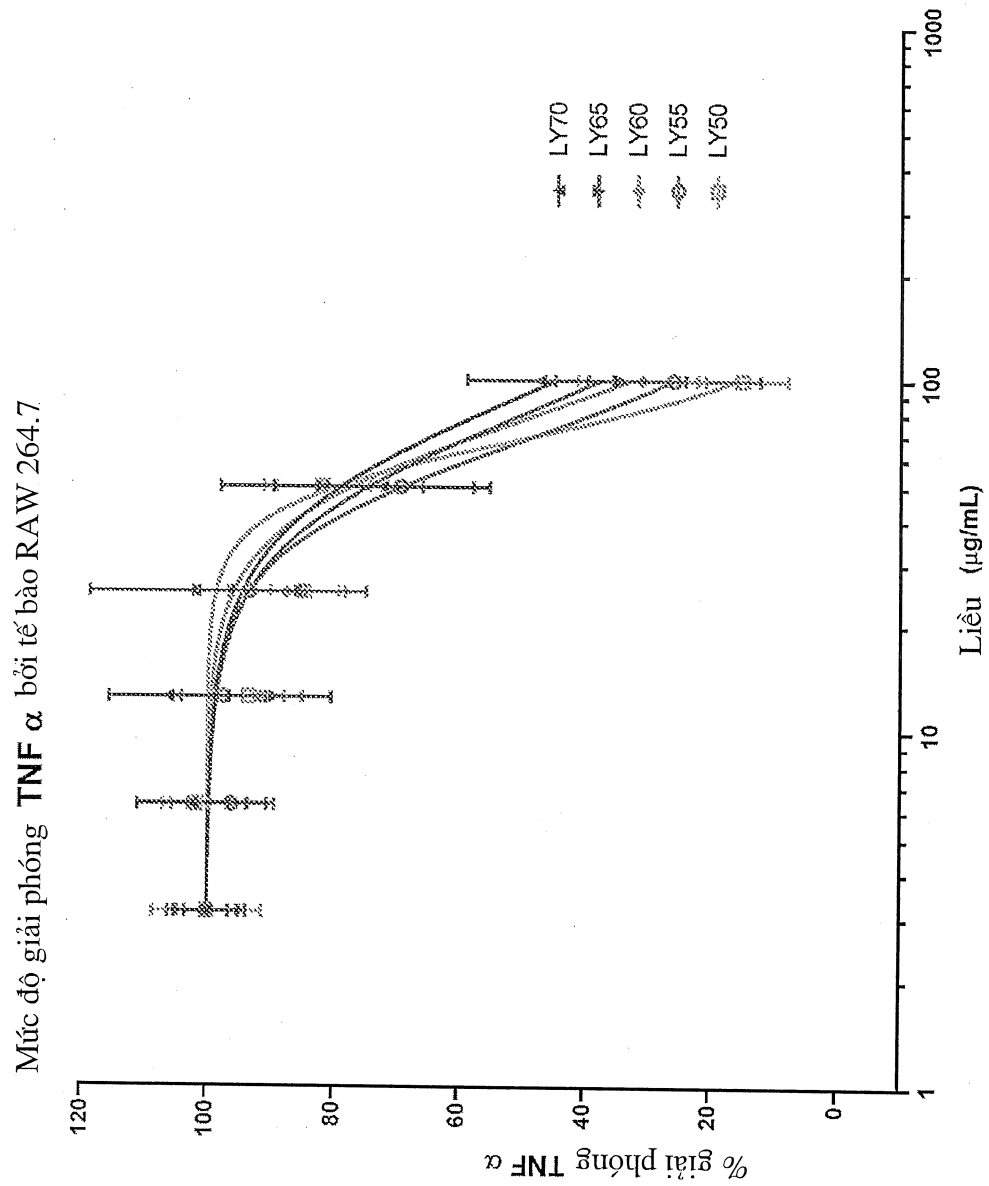
Hình 8B

16/24



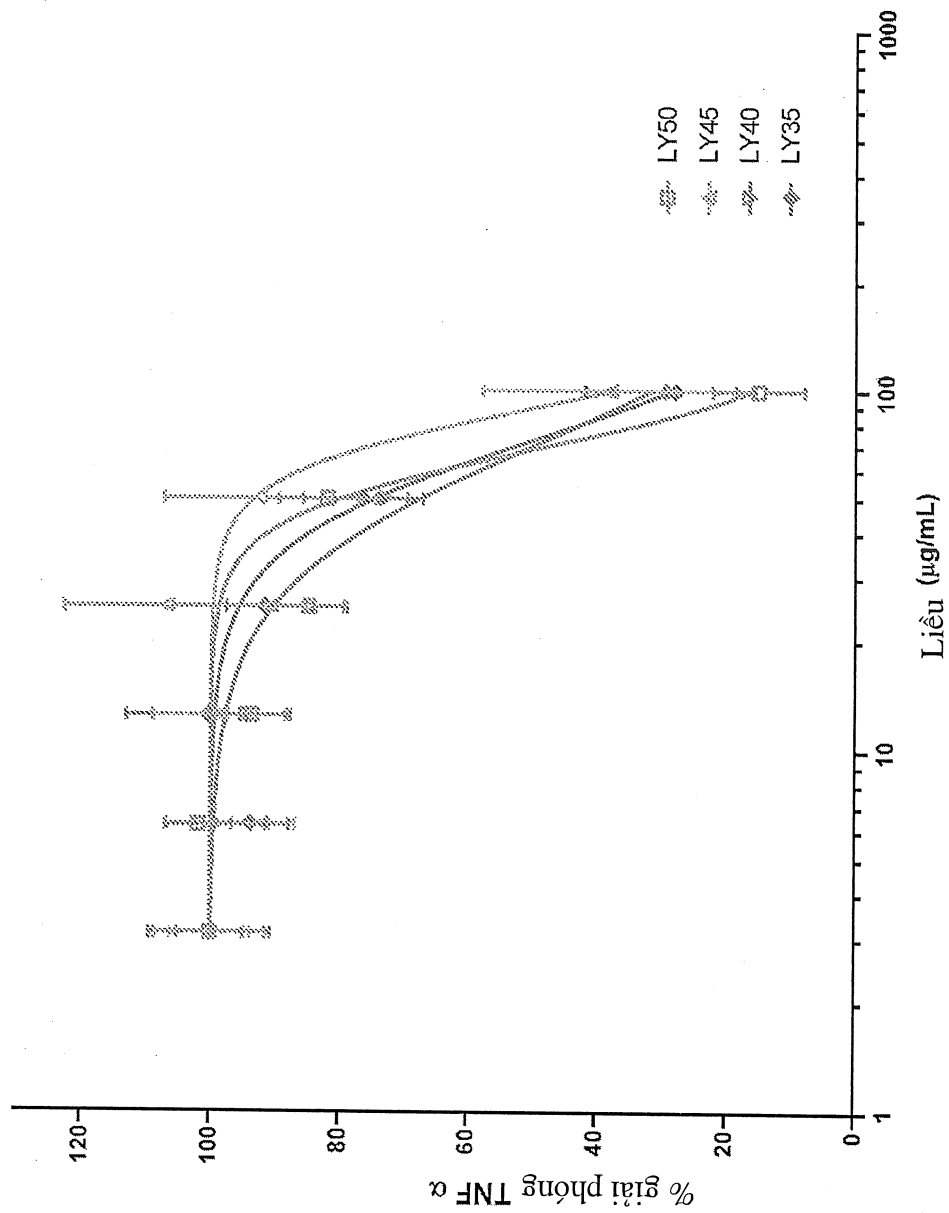
Hình 8C

17/24



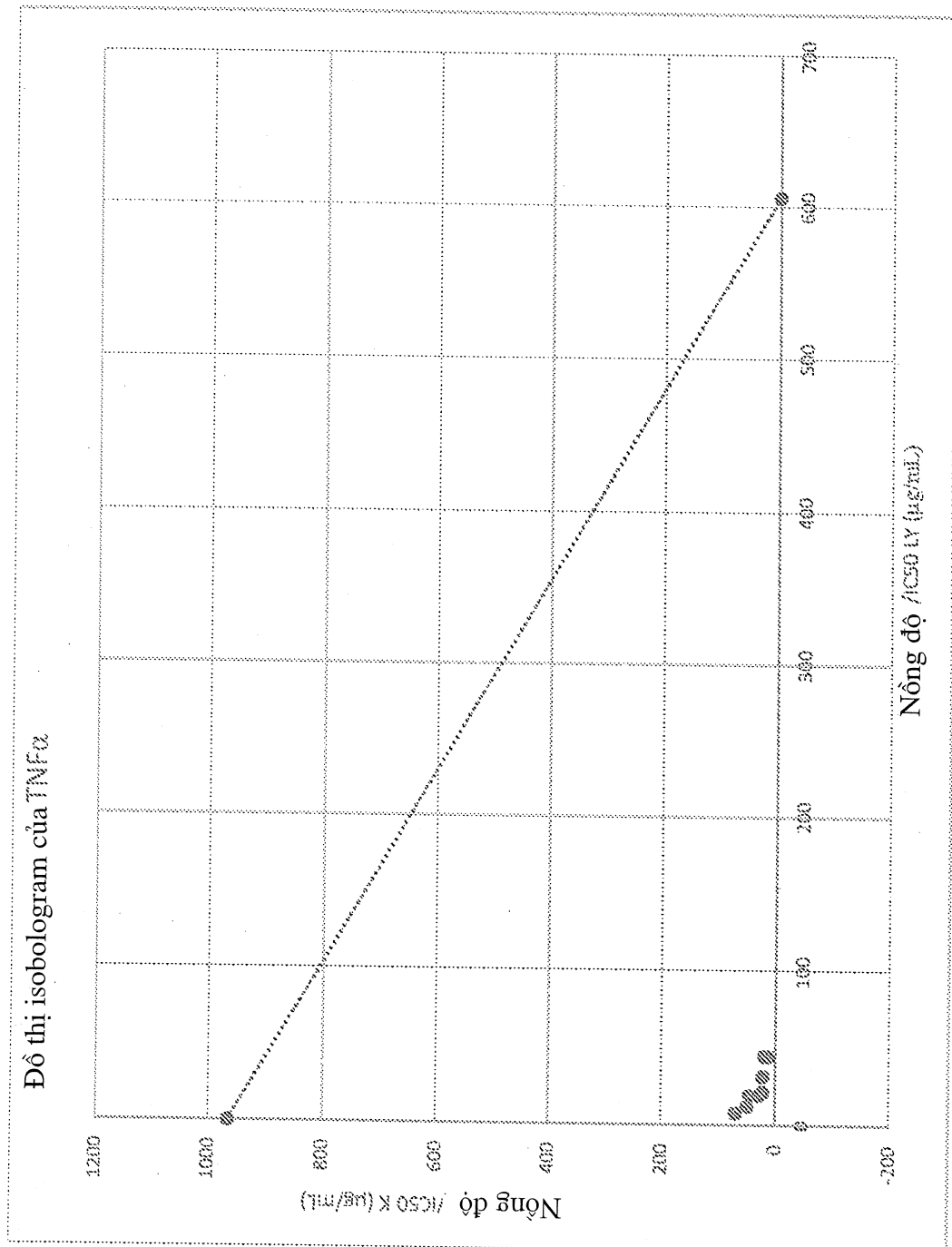
Hình 9A

18/24

Mức độ giải phóng $\text{TNF } \alpha$ bởi tế bào RAW 264.7

Hình 9B

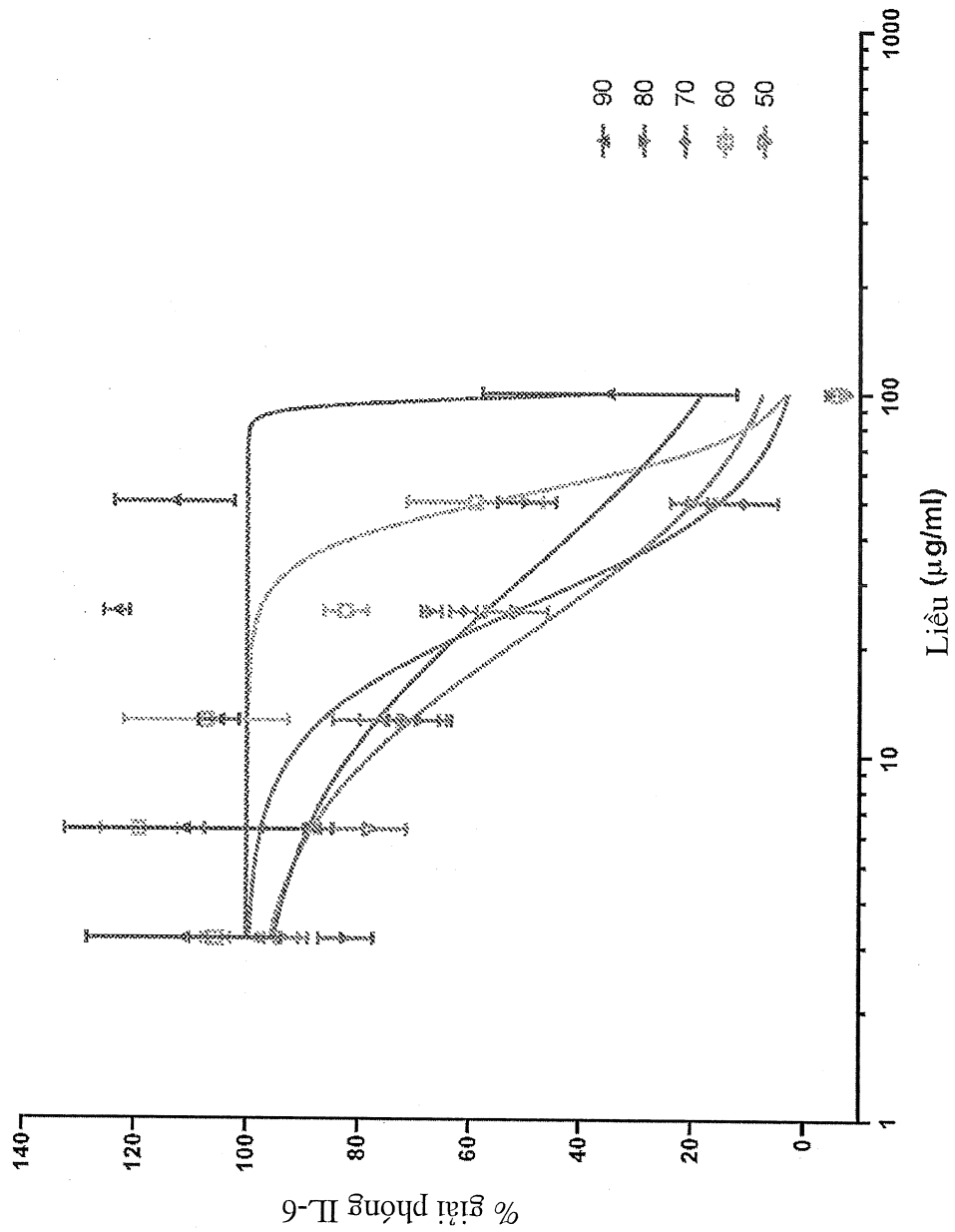
19/24



Hình 10

20/24

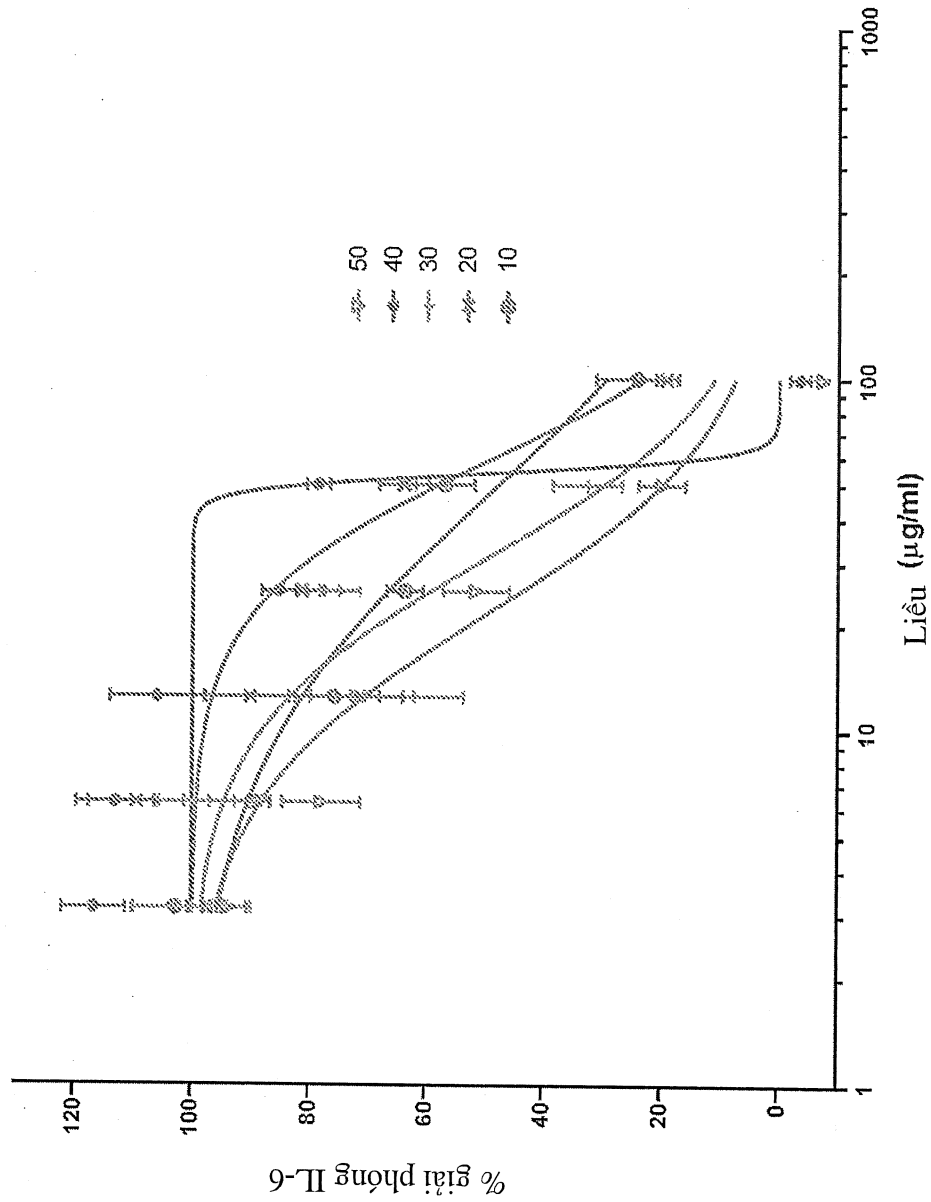
Mức độ giải phóng IL-6 từ tế bào RAW264.7



Hình 11A

21/24

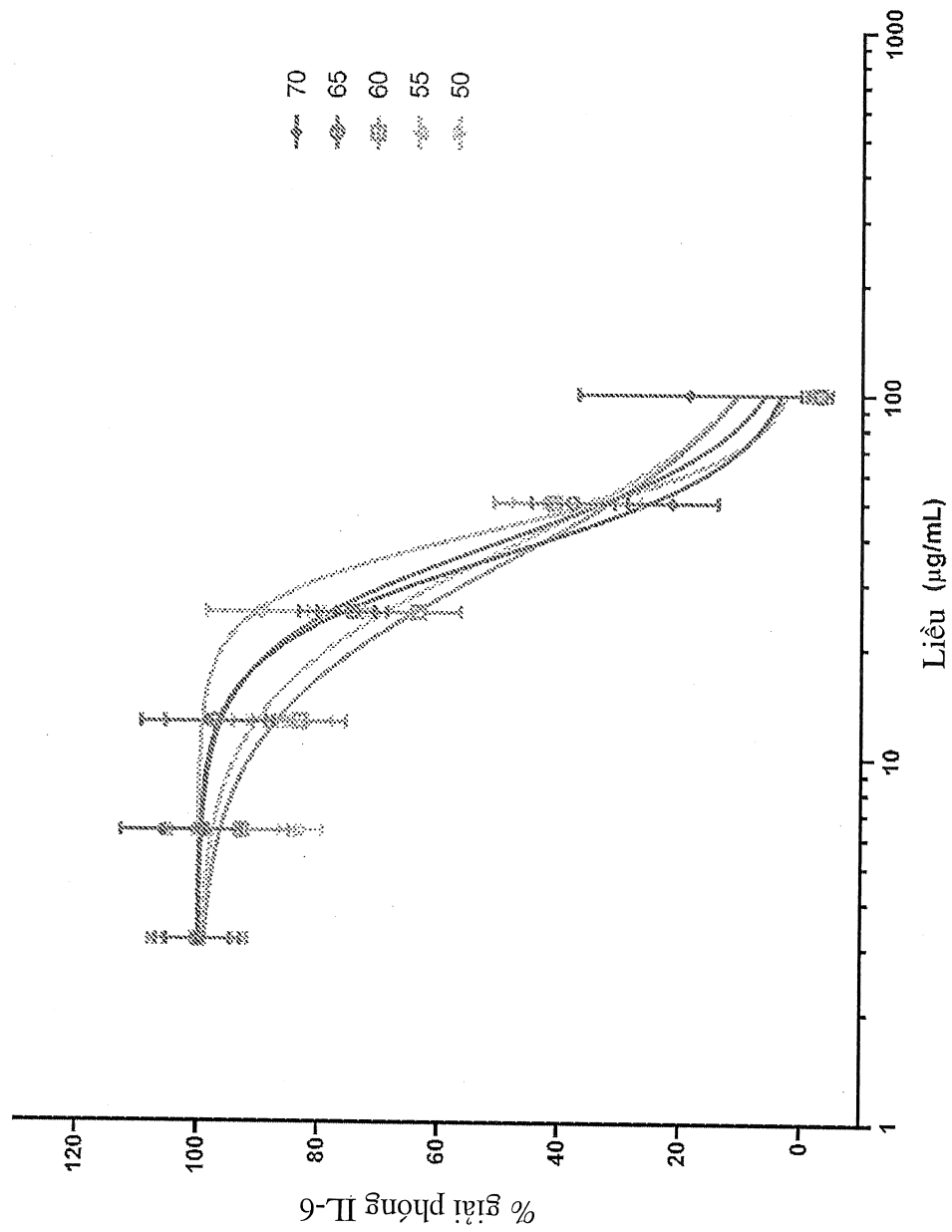
Mức độ giải phóng IL-6 từ tế bào RAW264.7



Hình 11B

22/24

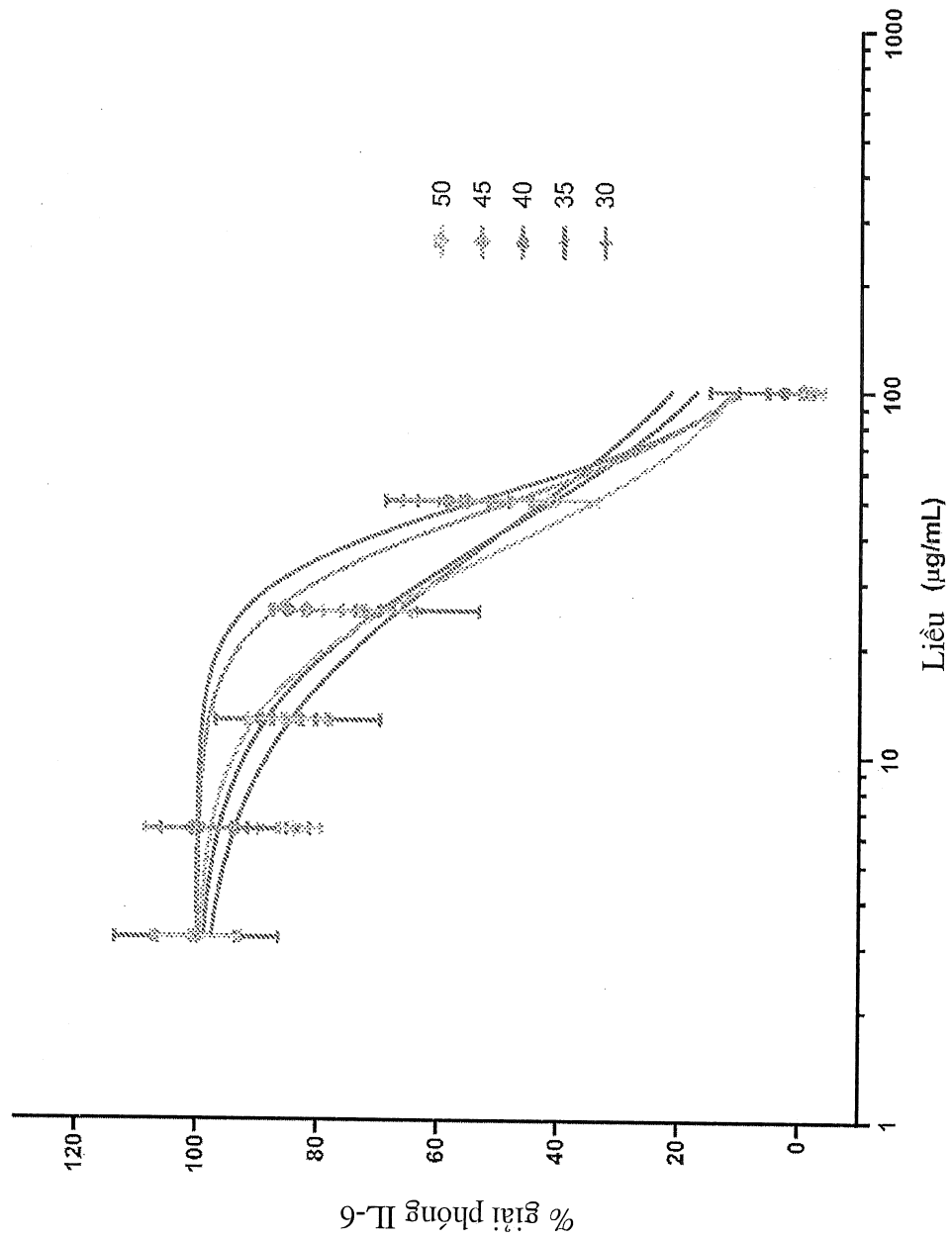
Mức độ giải phóng IL-6 từ tế bào RAW264.7



Hình 12A

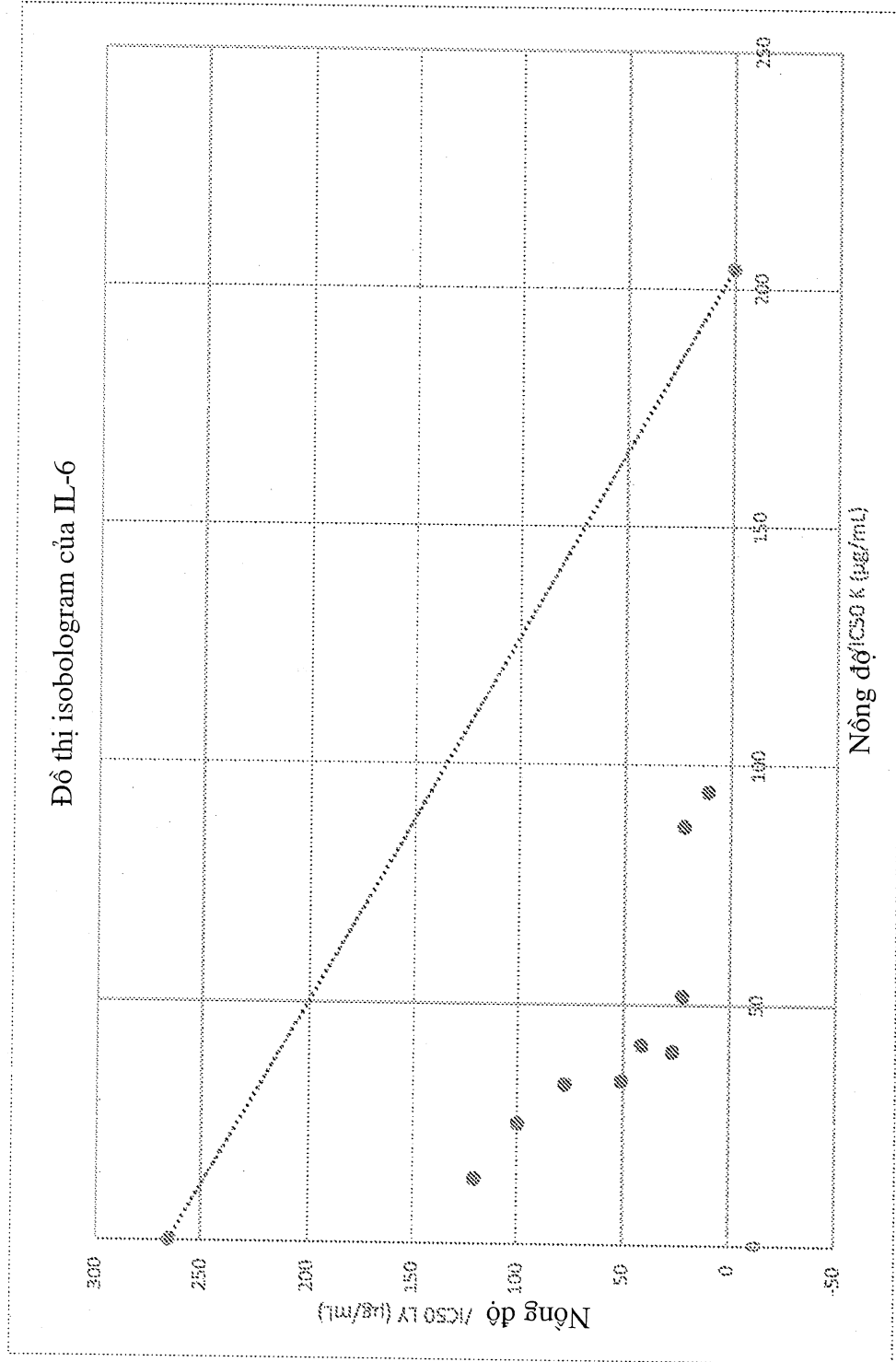
23/24

Mức độ giải phóng IL-6 từ tế bào RAW264.7



Hình 12B

24/24



Hình 13