



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt nam (VN)**

CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 

1-0019630

(51)⁷ **A61K 31/19, A61P 9/00**

(13) **B**

(21) 1-2014-02654

(22) 04.01.2013

(86) PCT/US2013/020398 04.01.2013

(87) WO2013/103902 11.07.2013

(30) 61/583,796 06.01.2012 US

61/664,047 25.06.2012 US

61/669,940 10.07.2012 US

61/680,622 07.08.2012 US

61/710,517 05.10.2012 US

61/713,388 12.10.2012 US

(45) 27.08.2018 365

(43) 25.02.2015 323

(73) 1. OMThera Pharmaceuticals, Inc. (US)

1800 Concord Pike, Wilmington DE 19803, United States of America

2. Chrysalis Pharma AG (CH)

Chilchgasse 8, CH-6072 Sachseln, Switzerland

(72) MAINES, Timothy, J. (US), MACHIELSE, Bernardus N M (US), MEHTA, Bharat

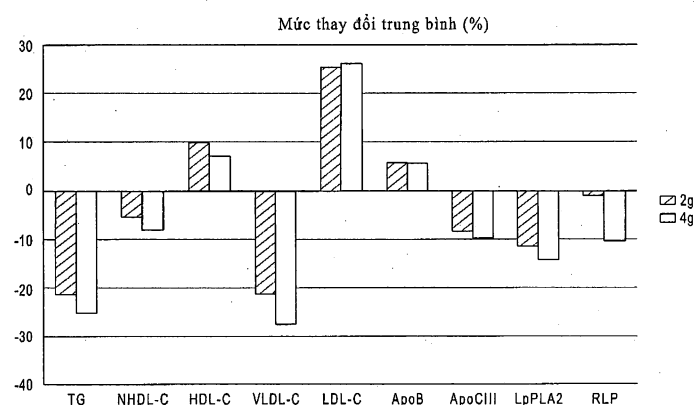
M. (US), WISLER, Gerald (US), DAVIDSON, Michael (US), WOOD, Peter Ralph

(GB)

(74) Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) **DƯỢC PHẨM GIÀU AXIT ĐOCOSAPENTAENOIC (DPA) CHỨA AXIT BÉO ĐA BẤT BẢO HÒA OMEGA-3 Ở DẠNG AXIT TỰ DO**

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm giàu axit docosapentaenoic (DPA) chứa axit béo đa bất bão hòa ở dạng axit tự do, và quy trình tinh chế dược phẩm này từ dầu cá. Dược phẩm này được dùng để điều trị chứng tăng triglycerit huyết (200 mg/dl - 500 mg/dl) bằng việc dùng bổ sung statin, điều trị để làm tăng tỉ lệ EPA:AA huyết tương, điều trị để làm giảm hàm lượng ApoCIII, và điều trị để làm giảm hoặc ngăn ngừa tính kháng với các chất ức chế kết tụ tiểu cầu.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến được phẩm giàu DPA chứa axit béo đa bất bão hòa ở dạng axit tự do, được phẩm dạng liều đơn vị và kit liều chứa nó và quy trình tinh chế được phẩm này từ dầu cá.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Dược phẩm giàu axit béo đa bất bão hòa (polyunsaturated fatty acid - "PUFA") omega-3 (" ω -3" hoặc "n-3") được nghiên cứu để chỉ định điều trị nhiều bệnh lâm sàng.

Các sản phẩm này, có nguồn gốc từ các nguồn tự nhiên, thường là dầu cá, là chế phẩm không đồng nhất, và chứa nhiều loại PUFA omega-3, PUFA omega-6 khác nhau, và các thành phần phụ khác, bao gồm các axit béo bão hòa và đơn bất bão hòa. Tác dụng lâm sàng quan sát được thường được cho là của toàn bộ chế phẩm, mặc dù vậy các loại PUFA có mặt với lượng lớn nhất trong hỗn hợp này, thường là EPA và DHA, được tin là góp phần cơ bản vào tác dụng lâm sàng thu được. Do là chế phẩm không đồng nhất, nên các sản phẩm này phải bao gồm một số loại axit béo đa bất bão hòa bắt buộc, mỗi loại nằm trong khoảng tỉ lệ phần trăm dung sai xác định. Chế phẩm này còn phải hạn chế một số thành phần không mong muốn, có nguồn gốc từ nguồn tự nhiên, như một số các tạp chất môi trường, và thành phần có thể được tạo ra trong các quy trình tinh chế.

Thành phần tối ưu có thể khác nhau tùy theo chỉ định lâm sàng dự định. Tuy nhiên, ngay cả đối với chỉ định lâm sàng được phê chuẩn đầu tiên để điều trị chứng tăng triglycerit huyết nặng (TG > 500 mg/dl), vẫn chưa xác định được thành phần tối ưu.

Do đó, trong dược phẩm chứa PUFA omega-3 được phê chuẩn đầu tiên để điều trị chứng tăng triglycerit huyết nặng, axit eicosapentaenoic ("EPA") và axit docosahexaenoic ("DHA") ở dạng este etyl có tỉ lệ trọng lượng xấp xỉ 46:38 (EPA:DHA), với EPA và DHA cùng nhau chiếm khoảng 84% tất cả các loại PUFA

trong chế phẩm. Ngược lại, sản phẩm được phê chuẩn gần đây, Vascepa® (trước đây được gọi là AMR101), được phê chuẩn cho cùng chỉ định lâm sàng, chứa EPA tinh khiết >96% ở dạng este etyl, gần như không chứa DHA. Dược phẩm dinh dưỡng OMAX3 được bán dưới dạng thực phẩm bổ sung và được quảng cáo là góp phần làm giảm mức triglycerit, chứa EPA và DHA với tỉ lệ trọng lượng khoảng 4,1:1, trong đó EPA và DHA cũng ở dạng este etyl, sản phẩm này chứa EPA và DHA với lượng nhiều hơn 84% trọng lượng và các axit béo omega-3 với lượng nhiều hơn 90% khối lượng.

Khoảng biến thiên rộng của các thành phần này phản ánh sự không chắc chắn đối với thành phần tối ưu cho chỉ định lâm sàng này.

Sự không chắc chắn này một phần là do để cạnh tranh các mục tiêu lâm sàng. Ví dụ, loại PUFA omega-3, DHA, đã biết là có hiệu lực hơn trong việc làm giảm triglycerit huyết thanh so với EPA, nhưng cũng có xu hướng làm tăng mức LDL lớn hơn, Mori et al., *Am. J. Clin. Nutr.* 71:1085-94 (2000), Grimsgaard et al., *Am. J. Clin. Nutr.* 66:649 - 59 (1997); việc tăng LDL được cho là tác dụng không mong muốn lâm sàng ở các đối tượng có nguy cơ cao mắc bệnh tim mạch. Mặc dù việc giảm kết tụ tiểu cầu và tạo cục đông máu bằng PUFA omega-3 thường là mong muốn lâm sàng, nhưng việc tăng tiềm tàng thời gian chảy máu gợi ý rằng cần bổ sung một lượng nhất định loại PUFA omega-6, axit arachidonic ("AA"), vào dược phẩm giàu PUFA omega-3. Xem công bố đơn Mỹ trước khi cấp bằng số 2010/0160435.

Khó khăn trong việc xác định thành phần tối ưu một phần còn do sự hoán chuyển enzym giữa một số loại PUFA omega-3, và do sự cạnh tranh giữa các axit béo đa bất bão hòa omega-3 và omega-6 đối với enzym chung trong các con đường sinh tổng hợp tương ứng của chúng với các PUFA thực phẩm mạch trung bình (xem Fig.1).

Một thử thách nữa trong việc thiết kế thành phần tối ưu là sự biến đổi sinh khả dụng của các chế phẩm chứa PUFA được dùng qua đường miệng. Sự hấp thu PUFA ở dạng este etyl đã biết là phụ thuộc vào, ví dụ, sự có mặt của lipaza tụy, được giải phóng để đáp ứng lại với chất béo tiêu hóa. Do đó, sự hấp thu este etyl PUFA là không hiệu quả, và có nhiều biến đổi, cả giữa các đối tượng khác nhau lẫn ở đối tượng cá thể bất kỳ, tùy thuộc vào việc nạp chất béo trong chế độ ăn. Xem Lawson et al., "Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free acids, or ethyl esters," *Biochem Biophys*

Res Commun. 152:328-35 (1988); Lawson et al., Biochem. Biophys Res Commun. 156:960-3 (1988). Mức hấp thu đặc biệt giảm ở các đối tượng có chế độ ăn ít chất béo, là chế độ ăn được áp dụng cho các đối tượng có mức triglyxerit huyết thanh tăng hoặc bệnh tim mạch.

Đối với dược phẩm chứa PUFA đặc biệt mong muốn bất kì, quy trình tinh chế được thiết kế để tạo ra sản phẩm cuối có thành phần axit béo bắt buộc nằm trong khoảng tỉ lệ dung sai định trước và hạn chế một số thành phần không mong muốn đến mức thấp hơn giới hạn dung sai định trước nhất định, với hiệu suất đủ để làm cho quy trình này khả thi về mặt thương mại và có thể chấp nhận được về mặt môi trường. Các khác biệt trong chế phẩm mong muốn cuối quyết định các khác biệt trong quy trình tinh chế.

Tuy nhiên, các bước quy trình khác nhau đã biết đều là các giải pháp trung gian gây khó khăn cho việc điều chỉnh và tối ưu hóa quy trình tinh chế thích ứng với thành phần cụ thể. Ví dụ, việc tạo phức thể bao ure (tạo hợp chất thể bao (clathration)) với sự có mặt của etanol thường được sử dụng để loại bỏ các axit béo mạch dài bão hòa và đơn bất bão hòa, làm tăng tỉ lệ tương đối của các axit béo đa bất bão hòa omega-3 mạch dài mong muốn trong chế phẩm thu được. Quá ít ure làm giảm độ giàu PUFA omega-3 mạch dài. Tuy nhiên, dư ure có thể dẫn đến một lượng các thành phần không mong muốn, và có khả năng dẫn đến, ở nhiệt độ và thời gian phản ứng đã cho bất kì, tăng sự sản sinh etyl carbamat, một chất sinh ung thư bị cấm, trên giới hạn thấp đã được xác định. Các lựa chọn thay thế việc tạo phức ure hiện nay cũng gặp các khó khăn khác.

Do đó, cần có các dược phẩm cải thiện giàu axit béo đa bất bão hòa omega-3, đặc biệt để điều trị chứng tăng triglyxerit huyết và rối loạn lipid máu hỗn hợp, và các quy trình cải thiện để tinh chế các chế phẩm này từ dầu cá.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất dược phẩm giàu DPA chứa các axit béo đa bất bão hòa omega-3 ở dạng axit tự do. Việc làm giàu hàm lượng DPA là kết quả không được dự tính trước và bất ngờ của quy trình sản xuất ở quy mô thương mại. Các dược phẩm giàu DPA này đã được chứng tỏ là có hiệu quả dược lý và

lâm sàng khác biệt trong các thử nghiệm in vitro và trong các thử nghiệm lâm sàng ở người.

Sáng chế cũng mô tả các phương pháp điều trị bệnh. Theo một loạt các phương án điều trị, phương pháp điều trị chứng tăng triglycerit huyết nặng ($TG > 500 \text{ mg/dl}$) được mô tả. Theo một loạt các phương án điều trị khác, phương pháp điều trị chứng tăng triglycerit huyết ($200 \text{ mg/dl} - 500 \text{ mg/dl}$) bằng việc dùng bổ sung statin và được phẩm được nêu trong bản mô tả này được mô tả. Các phương pháp điều trị khác bao gồm, không kể những cái khác, điều trị để làm tăng tỉ lệ EPA:AA huyết tương, điều trị để làm giảm hàm lượng ApoCIII, và điều trị để làm giảm hoặc ngăn ngừa tính kháng với các chất ức chế kết tụ tiểu cầu.

Sáng chế cũng đề xuất quy trình bào chế được phẩm ở quy mô thương mại, bao gồm các quy trình có bước tạo phức ure trong đó mỗi nguyên liệu trung gian đã chuyển hóa este có thành phần xác định được đưa vào bước tạo phức ure bằng cách sử dụng một lượng ure nằm trong khoảng được xác định theo công thức của quy trình mới.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện con đường sinh tổng hợp axit béo đa bất bão hòa mạch dài omega-3 và omega-6 từ các axit béo thiết yếu có chiều dài mạch trung gian (trung bình) đã biết của người.

Fig.2 là sơ đồ thể hiện quy trình được nêu làm ví dụ để điều chế nguyên liệu trung gian là este etyl PUFA.

Fig.3A là sơ đồ thể hiện kết quả tinh chế tương đối trung bình của các nhóm axit béo bằng bước tạo phức ure trong đó các lượng ure được xác định theo công thức được bổ sung vào nguyên liệu trung gian este etyl PUFA có thành phần xác định.

Fig.3B minh họa kết quả tinh chế khác biệt trung bình của các loại este etyl PUFA omega-3 và omega-6 riêng rẽ khi các lượng ure được xác định theo công thức được bổ sung vào nguyên liệu trung gian este etyl PUFA có thành phần xác định.

Fig.4 là phác đồ điều trị minh họa thiết kế nghiên cứu lâm sàng ECLIPSE, được mô tả thêm trong ví dụ 7.

Fig.5 so sánh sinh khả dụng của tổng EPA + DHA (thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu) sau liều đơn (4 g) Lovaza® trong các giai đoạn ăn nhiều và ít chất béo.

Fig.6 so sánh sinh khả dụng của tổng EPA+DHA (thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu) sau liều đơn (4g) Lovaza® ("EE-FA") hoặc Epanova®, một chế phẩm giàu DPA chứa PUFA omega-3 ở dạng axit tự do ("FFA"), trong giai đoạn ăn nhiều chất béo.

Fig.7 so sánh tổng nồng độ EPA+DHA trong huyết tương (thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu) sau liều đơn (4g) Lovaza® hoặc Epanova® trong giai đoạn ăn ít chất béo.

Fig.8 so sánh tổng nồng độ EPA trong huyết tương (thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu) sau liều đơn (4g) Lovaza® hoặc Epanova® trong giai đoạn ăn ít chất béo.

Fig.9 so sánh tổng nồng độ DHA trong huyết tương (thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu) sau liều đơn (4g) Lovaza® hoặc Epanova® trong giai đoạn ăn ít chất béo.

Các Fig.10A và 10B thể hiện các đáp ứng AUC_{0-t} của từng đối tượng trong giai đoạn ăn ít chất béo và nhiều chất béo, được thể hiện dưới dạng tỉ lệ (%) của AUC_{0-t} trong giai đoạn ăn ít chất béo so với AUC_{0-t} trong giai đoạn ăn nhiều chất béo. Các tỉ lệ âm không được vẽ đồ thị.

Fig.11 là phác đồ điều trị minh họa thiết kế thử nghiệm sinh khả dụng tương đối 14 ngày, được mô tả thêm trong ví dụ 8 (dòng thời gian không theo tỉ lệ).

Fig.12A là đồ thị thể hiện tổng nồng độ EPA+DHA không được hiệu chỉnh trung bình so với thời gian (thang tuyến tính) đối với việc điều trị bằng Lovaza® so với điều trị bằng Epanova® trong thử nghiệm sinh khả dụng tương đối 14 ngày, được mô tả thêm trong ví dụ 8.

Fig.12B là biểu đồ thể hiện sự chênh lệch của EPA+DHA không được hiệu chỉnh (nmol/ml) đối với các thời điểm được nhóm trên Fig.12A.

Fig.13 là đồ thị thể hiện tổng nồng độ EPA+DHA trung bình trong huyết tương được hiệu chỉnh so với mức ban đầu so với thời gian (thang tuyến tính) đối với việc điều trị bằng Lovaza® so với điều trị bằng Epanova® trong nghiên cứu sinh khả dụng tương đối 14 ngày.

Fig.14A là biểu đồ thể hiện mức tăng từ thời điểm ban đầu đến trạng thái ổn định về hàm lượng trong máu không được hiệu chỉnh đối với EPA+DHA trong các nhánh dùng Lovaza® và Epanova® trong nghiên cứu sinh khả dụng tương đối 14 ngày.

Fig.14B là biểu đồ thể hiện mức tăng từ thời điểm ban đầu đến trạng thái ổn định về C_{avg} không được hiệu chỉnh đối với EPA+DHA trong các nhánh dùng Lovaza® và Epanova® trong nghiên cứu sinh khả dụng tương đối 14 ngày.

Fig.15A là biểu đồ thể hiện mức tăng từ thời điểm ban đầu đến trạng thái ổn định về tổng hàm lượng trong máu của DHA trong các nhánh dùng Lovaza® và Epanova® trong nghiên cứu sinh khả dụng tương đối 14 ngày.

Fig.15B là biểu đồ thể hiện mức tăng từ thời điểm ban đầu đến trạng thái ổn định về hàm lượng C_{avg} của DHA trong nhóm dùng Epanova® so với nhóm dùng Lovaza® trong nghiên cứu sinh khả dụng tương đối 14 ngày.

Fig.16A là biểu đồ thể hiện mức tăng từ thời điểm ban đầu đến trạng thái ổn định về tổng hàm lượng trong máu của EPA trong các nhánh dùng Lovaza® và Epanova® trong nghiên cứu sinh khả dụng tương đối 14 ngày.

Fig.16B là biểu đồ thể hiện mức tăng từ thời điểm ban đầu đến trạng thái ổn định về hàm lượng C_{avg} EPA trong các nhóm dùng Epanova® và Lovaza® trong nghiên cứu sinh khả dụng tương đối 14 ngày.

Fig.17 thể hiện sơ đồ điều trị minh họa thiết kế nghiên cứu EVOLVE, được mô tả thêm trong ví dụ 10.

Fig.18 thể hiện chi tiết hơn thiết kế thử nghiệm EVOLVE, xác định thời điểm của các lần khám trong nghiên cứu.

Fig.19 thể hiện sự bố trí các đối tượng trong thử nghiệm EVOLVE.

Các Fig.20A - 20D thể hiện các hàm lượng trung bình trong huyết tương ở thời điểm ban đầu và kết thúc điều trị ("EOT" - end-of-treatment) (tính theo $\mu\text{g/ml}$) của EPA (Fig.20A), DHA (Fig.20B), DPA (Fig.20C) và AA (Fig.20D), đối với mỗi nhánh điều trị trong thử nghiệm EVOLVE.

Fig.20E thể hiện sự so sánh các hàm lượng EPA trung bình ở thời điểm ban đầu và EOT của thử nghiệm ECLIPSE được mô tả trong ví dụ 7, nghiên cứu sinh khả dụng 14 ngày được mô tả trong ví dụ 8, nghiên cứu tương tác thuốc-thuốc statin (statin drug-drug interaction - "STATIN DDI") được mô tả trong ví dụ 11, mỗi nhánh điều trị cũng như nhánh đối chứng của thử nghiệm EVOLVE được mô tả trong ví dụ 10, và các giá trị được báo cáo trước đó trong tài liệu đối với thử nghiệm JELIS không liên quan ("JELIS"), sử dụng chế phẩm omega-3 khác.

Các Fig.21A - 21D là biểu đồ thể hiện các hàm lượng trung vị trong huyết tương ở thời điểm ban đầu và kết thúc điều trị ("EOT") (tính theo $\mu\text{g/ml}$) của EPA (Fig.21A), DHA (Fig.21B), DPA (Fig.21C), và AA (Fig.21D) trong thử nghiệm EVOLVE.

Các Fig.22A và 22B là biểu đồ thể hiện mức thay đổi từ thời điểm ban đầu đến EOT về hàm lượng tuyệt đối trong huyết tương (tính theo $\mu\text{g/ml}$) của AA, DHA, EPA, và DPA, trong mỗi nhánh điều trị của thử nghiệm EVOLVE. Fig.22A là biểu đồ thể hiện mức thay đổi trung bình; Fig.22B là biểu đồ thể hiện mức thay đổi trung vị.

Fig.23A là biểu đồ thể hiện mức thay đổi trung bình từ thời điểm ban đầu đến EOT, tính theo tỉ lệ phần trăm của giá trị ban đầu, của AA, DHA, EPA, và DPA trong mỗi nhánh điều trị của thử nghiệm EVOLVE. Fig.23B là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị từ thời điểm ban đầu đến EOT.

Các Fig.24A - 24I là biểu đồ thể hiện các hàm lượng trung bình trong huyết tương ở thời điểm ban đầu và EOT (tính theo mg/dl , ngoại trừ LpPLA2 tính theo ng/ml) trong thử nghiệm EVOLVE đối với triglycerit (Fig.24A), Non-HDL-C (Non-high-density

lipoprotein cholesterol - Cholesterol không có lipoprotein tỉ trọng cao) (Fig.24B), HDL-C (Fig.24C), V-LDL-C (Fig.24D), LDL-C (Fig.24E), ApoB (Fig.24F), ApoCIII (Fig.24G), RLP (Fig.24H), LpPLA2 (Fig.24I).

Các Fig.25A - 25I là biểu đồ thể hiện các hàm lượng trung vị trong huyết tương ở thời điểm ban đầu và EOT (tính theo mg/dl, ngoại trừ LpPLA2 tính theo ng/ml) trong thử nghiệm EVOLVE đối với triglycerit (Fig.25A), Non-HDL-C (Fig.25B), HDL-C (Fig.25C), V-LDL-C (Fig.25D), LDL-C (Fig.25E), ApoB (Fig.25F), ApoCIII (Fig.25G), RLP (Fig.25H), LpPLA2 (Fig.25I).

Các Fig.26A và 26B là biểu đồ thể hiện mức thay đổi từ thời điểm ban đầu đến EOT về hàm lượng tuyệt đối trong huyết tương (tính theo mg/dl) trong thử nghiệm EVOLVE của triglycerit ("TG"), Non-HDL-C ("NHDL-C"), HDL-C, VLDL-C, và LDL-C đối với mỗi nhánh điều trị của thử nghiệm EVOLVE, với Fig.26A là biểu đồ thể hiện mức thay đổi trung bình và Fig.26B là biểu đồ thể hiện mức thay đổi trung vị.

Fig.27 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ các đối tượng trong thử nghiệm EVOLVE, được biểu diễn trên trục Y, có hàm lượng triglycerit giảm ở mức tỉ lệ phần trăm được biểu diễn trên trục X, đối với liều 2g và liều 4g Epanova®.

Fig.28A là biểu đồ thể hiện mức thay đổi trung bình từ thời điểm ban đầu đến EOT, tính theo tỉ lệ phần trăm của giá trị ban đầu, của TG, non-HDL-c ("NHDL-C"), HDL-C, VLDL-C, LDL-C, ApoB, ApoCIII, LpLPA2, và RLP trong mỗi nhánh điều trị của thử nghiệm EVOLVE, với Fig.28B là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị từ thời điểm ban đầu đến EOT.

Fig.29 là biểu đồ thể hiện mức độ thay đổi (trị số tuyệt đối) của tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị so với thời điểm ban đầu về hàm lượng trong huyết tương của EPA, DHA, DPA, AA, TG, NHDL-C, và HDL-C giữa các liều 2g và 4g Epanova® trong thử nghiệm EVOLVE.

Fig.30 minh họa dữ liệu so sánh của Epanova®, đo được trong thử nghiệm EVOLVE, và dữ liệu được báo cáo bởi nguồn khác của AMR-101 (Vascepa), ở các liều được chỉ định, về hàm lượng TG.

Fig.31 minh họa dữ liệu so sánh của Epanova[®], đo được trong thử nghiệm EVOLVE, và AMR-101 (Vascepa), về các thông số lipit máu khác nhau. Dữ liệu của AMR-101 được báo cáo bởi nguồn khác. (*) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,05, (**) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,01, và (***) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,001.

Fig.32 minh họa dữ liệu so sánh của các liều Epanova[®] 2g và 4g, xác định được trong thử nghiệm EVOLVE, và liều Lovaza[®] 4 g, về các thông số lipit máu khác nhau. Dữ liệu của Lovaza[®] được báo cáo bởi nguồn khác. (*) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,05, (**) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,01, và (***) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,001.

Fig.33 minh họa dữ liệu so sánh của các liều Epanova[®] 2g và 4g, được đánh giá trong thử nghiệm EVOLVE, và liều Lovaza[®] 4 g, được báo cáo bởi nguồn khác, về hàm lượng TG. Các chỉ số trên cho thấy dữ liệu có nguồn gốc từ (1) thử nghiệm EVOLVE, (2) phân tích tổng hợp từ Lovaza[®] New Drug Application ("NDA") (3) Nhãn sản phẩm được FDA phê chuẩn Lovaza[®] và (4) nghiên cứu Takeda. (*) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,05, (**) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,01, và (***) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,001.

Fig.34 là biểu đồ thể hiện sự tương quan giữa tỉ lệ phần trăm thay đổi về LDL và tỉ lệ phần trăm thay đổi về ApoCIII, khi được đo trong thử nghiệm EVOLVE.

Fig.35 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi trung bình bình phương tối thiểu (LS) so với thời điểm ban đầu đối với một nhóm đối tượng trong thử nghiệm EVOLVE có hàm lượng TG ban đầu lớn hơn hoặc bằng 750 mg/dl, đối với nhánh điều trị được chỉ định của nghiên cứu EVOLVE, như được mô tả thêm trong ví dụ 10. (*) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,05, (**) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,01, và (***) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,001.

Fig.36 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi trung bình bình phương tối thiểu (LS) so với thời điểm ban đầu đối với một nhóm đối tượng bị bệnh đái tháo đường typ II, đối với nhánh điều trị được chỉ định của nghiên cứu EVOLVE, như được mô tả trong ví dụ 10. (*) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,05, (**) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,01, và (***) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,001.

Fig.37 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi trung bình bình phương tối thiểu (LS) so với thời điểm ban đầu đối với một nhóm đối tượng đang dùng phép trị liệu

statin đồng thời, đối với nhánh điều trị được chỉ định của nghiên cứu EVOLVE, như được mô tả trong ví dụ 10. (*) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,05, (**) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,01, và (***) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,001.

Fig.38 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm khác biệt trung bình bình phương tối thiểu (LS) so với đối chứng của triglycerit ("TG"), cholesterol không có lipoprotein tỉ trọng cao ("NHDL-C"), HDL-C, LDL-C, TC, VLDL-C, và TC/HDL-C, so sánh các đối tượng từ nghiên cứu EVOLVE được mô tả trong ví dụ 10, là đối tượng nhận phép trị liệu statin (STATIN) hoặc không nhận phép trị liệu statin (không-STATIN) đồng thời với việc điều trị bằng Epanova® liều 2g. (*) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,05, (**) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,01, và (***) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,001.

Fig.39 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị so với thời điểm ban đầu của TG, NHDL-C, HDL-C, LDL-C, TC, VLDL-C, và TC/HDL-C đối với một nhóm đối tượng trải qua phép trị liệu statin đồng thời, ở nhánh điều trị được chỉ định của nghiên cứu EVOLVE, được mô tả thêm trong ví dụ 10. (*) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,05, (**) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,01, và (***) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,001.

Fig.40 thể hiện sơ đồ điều trị minh họa thiết kế nghiên cứu ESPRIT, được mô tả thêm trong ví dụ 12.

Fig.41 thể hiện sự bố trí các đối tượng trong thử nghiệm ESPRIT.

Các Fig.42A và 42B là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi LS trung vị so với thời điểm ban đầu của EPA (Fig.42 A) và DHA (Fig.42B) từ nghiên cứu ESPRIT, được mô tả thêm trong ví dụ 12. (*) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,05, (**) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,01, và (***) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,001.

Fig.43 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi LS trung bình so với thời điểm ban đầu của TG, Non-HDL-C, và HDL-C. Dữ liệu được chỉ ra là từ nghiên cứu ESPRIT, được mô tả thêm trong ví dụ 12. (*) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,05, (**) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,01, và (***) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,001.

Fig.44 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi LS trung bình so với thời điểm ban đầu của ApoB, LDL-C, VLDL-C, và TC/HDL-C. Dữ liệu được chỉ ra là từ nghiên

cứu ESPRIT, được mô tả thêm trong ví dụ 12. (*) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,05, (**) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,01, và (***) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,001.

Fig.45 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị so với thời điểm ban đầu của TG, với các đối tượng được nhóm thành tam phân vị bởi hàm lượng TG ban đầu, đối với các đối tượng trong thử nghiệm ESPRIT.

Fig.46 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị so với thời điểm ban đầu của Non-HDL-C, với các đối tượng được nhóm thành tam phân vị bởi hàm lượng Non-HDL-C ban đầu, đối với các đối tượng trong thử nghiệm ESPRIT.

Fig.47 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị so với thời điểm ban đầu của LDL-C, với các đối tượng được nhóm thành tam phân vị bởi hàm lượng LDL-C ban đầu, đối với các đối tượng trong thử nghiệm ESPRIT.

Fig.48 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị so với thời điểm ban đầu của TG đối với mỗi nhánh điều trị của thử nghiệm ESPRIT, với các đối tượng được nhóm theo sự đồng nhất của statin được dùng trong phép trị liệu đồng thời.

Fig.49 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị so với thời điểm ban đầu của TG đối với mỗi nhánh điều trị của thử nghiệm ESPRIT, với các đối tượng được nhóm thành hai nhóm theo phép trị liệu statin dùng đồng thời có hiệu lực thấp hoặc cao.

Fig.50 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị so với thời điểm ban đầu của Non-HDL-C đối với mỗi nhánh điều trị của thử nghiệm ESPRIT, với các đối tượng được nhóm theo phép trị liệu statin dùng đồng thời có hiệu lực thấp hoặc cao.

Fig.51 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị so với thời điểm ban đầu của LDL-C đối với mỗi nhánh điều trị của thử nghiệm ESPRIT, với các đối tượng được nhóm thành hai nhóm theo phép trị liệu statin dùng đồng thời có hiệu lực thấp hoặc cao.

Fig.52 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị so với thời điểm ban đầu của TG, với các đối tượng trong mỗi nhánh điều trị của thử nghiệm ESPRIT được

nhóm thành ba nhóm theo TG ban đầu cao, EPA ban đầu cao, hoặc phép trị liệu rosuvastatin dùng đồng thời.

Fig.53 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi LS trung bình về sự phân bố kích thước hạt so với thời điểm ban đầu của các hạt V-LDL được nhóm theo kích thước, như được xác định trong thử nghiệm ESPRIT. (*) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,05, (**) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,01, và (***) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,001.

Fig.54 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi LS trung bình về sự phân bố kích thước hạt so với thời điểm ban đầu của các hạt LDL được nhóm theo kích thước đối với mỗi nhánh điều trị của thử nghiệm ESPRIT. (*) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,05, (**) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,01, và (***) biểu thị giá trị p nhỏ hơn 0,001.

Fig.55 là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị LS của kích thước hạt LDL, với các đối tượng được nhóm thành ba nhóm theo hàm lượng triglycerit EOT trong thử nghiệm ESPRIT.

Fig.56A thể hiện hàm lượng axit arachidonic (AA) trong huyết tương ở thời điểm ban đầu (tính theo $\mu\text{g/ml}$) đối với các đối tượng trong thử nghiệm lâm sàng được mô tả thêm trong ví dụ 11, được nhóm theo kiểu gen ở rs174546 SNP. Fig.56B thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi so với thời điểm ban đầu của hàm lượng AA trong huyết tương ở ngày 15 của quá trình điều trị bằng Epanova[®], được nhóm theo kiểu gen ở rs174546 SNP. Đối với mỗi kiểu gen, khoảng tứ phân vị được biểu thị bằng hộp, trung vị được biểu thị bằng đường nằm ngang bên trong của hộp tứ phân vị, và trung bình được biểu thị bởi hình thoi. Các giá trị ngoại lai được biểu diễn bởi các hình tròn rỗng. Các sợi râu kéo dài giá trị không ngoại lai từ tối thiểu đến tối đa. Điểm 1 xác nhận các đối tượng là đồng hợp tử ở các alen chính; Điểm 3 xác nhận các đối tượng là đồng hợp tử ở các alen phụ; và Điểm 2 thể hiện các dị hợp tử.

Mô tả chi tiết các phương án thực hiện sáng chế

Khái quát: Dược phẩm chứa các axit béo đa bất bão hòa omega-3 ở dạng axit tự do giàu DPA một cách bất ngờ có hiệu lực lâm sàng khác biệt

Việc tạo phức thể bao ure (tạo hợp chất thể bao) là bước chuẩn thường được sử dụng trong việc tinh chế dầu cá để loại bỏ các axit béo mạch dài bão hòa và đơn bất bão hòa, do đó, làm giàu các axit béo đa bất bão hòa omega-3 mạch dài mong muốn trong chế phẩm thu được. Tuy nhiên, dù sử dụng trong thời gian dài, và các nghiên cứu được thiết kế để mô tả ảnh hưởng của các thông số sinh hóa khác nhau lên quá trình này, nhưng độ giàu mà việc tạo phức ure tạo ra đối với từng loại axit béo đa bất bão hòa mạch dài vẫn không thể dự đoán được. Phần dư không dự đoán được trong quá trình tạo phức ure này, được kết hợp tiềm tàng để tạo ra etyl carbamat ở mức cao không cho phép, điều này bắt buộc phải xử lý thêm, ban đầu cản trở đối với việc loại bỏ tạo phức ure từ quy trình tinh chế ở quy mô thương mại để được sử dụng để tạo ra dược phẩm chứa PUFA omega-3 ở dạng axit tự do đáp ứng một số đặc tính chế phẩm mong muốn nhất định.

Tuy nhiên, như được mô tả thêm trong ví dụ 1, các nỗ lực trước kia để phát triển quy trình ở quy mô thương mại không dùng ure đã làm rõ rằng các quy trình này không thể chắc chắn tạo ra các mẻ sản phẩm đáp ứng các đặc tính cần thiết. Do đó, quy trình sử dụng việc tạo phức ure được tìm ra, và quy trình này phát hiện ra rằng việc kiểm soát chế phẩm nghiêm ngặt đối với các loại PUFA có mặt trong nguyên liệu trung gian este etyl, được kết hợp với việc sử dụng một lượng ure được xác định theo công thức, có thể chắc chắn thu được mẻ sản phẩm đáp ứng các đặc tính cần thiết, và không vượt quá các giới hạn etyl carbamat chấp nhận được.

Như được mô tả trong ví dụ 2, bốn mẻ sản phẩm axit béo đa bất bão hòa ở dạng axit tự do được lấy làm ví dụ được điều chế bằng cách sử dụng bước tạo phức ure. Việc kiểm soát chế phẩm nghiêm ngặt được áp dụng cho nguyên liệu trung gian este etyl, chỉ sử dụng mẻ sản phẩm trong đó loại axit béo đa bất bão hòa xác định nằm trong khoảng giới hạn đã định, và các lượng ure được sử dụng nằm trong khoảng cần thiết bằng công thức tính ure. Tất cả bốn mẻ sản xuất của dược phẩm này được xác định là đáp ứng các đặc tính chế phẩm mong muốn.

Như mong đợi, bước tạo phức ure làm giảm hầu hết tỉ lệ phần trăm của các axit béo bão hòa và các axit béo đơn bất bão hòa trong chế phẩm thu được, từ đó làm giàu đáng kể các axit béo đa bất bão hòa. Xem Fig.3A. Tuy nhiên, bất ngờ là việc tiến hành tạo phức ure bằng cách sử dụng các lượng ure nằm trong khoảng được xác định theo

công thức có tác dụng khác biệt lên việc làm giàu của các loại axit béo đa bất bão hòa omega-3 và axit béo đa bất bão hòa omega-6 cụ thể.

Như được mô tả dưới đây trong ví dụ 3, loại axit docosapentaenoic omega-3, DPA (C22:5 n-3), được làm giàu, còn loại omega-6 tương ứng, có chiều dài mạch và độ bất bão hòa tương tự, axit docosapentaenoic (C22:5 n-6), bị giảm về mức độ. Tác dụng khác nhau của việc tạo phức ure lên việc làm giàu hai chất đồng phân này - cùng với sự khác biệt về nồng độ tương đối của chúng trong nguyên liệu trung gian este etyl - dẫn đến khác biệt bậc logarit của nồng độ của chúng trong dược phẩm, axit tự do, cuối ("API").

Các mẻ sản xuất khác được điều chế, và như được mô tả trong ví dụ 4, việc phân tích thành phần của 10 mẻ API thể hiện mức tăng DPA lặp lại trong chế phẩm cuối. Như được mô tả trong ví dụ 5, việc phân tích thành phần của 21 mẻ được điều chế bằng cách sử dụng việc tạo phức ure thể hiện sự khác biệt gấp 10 lần lặp lại được về nồng độ của loại omega-3, DPA, so với chất đồng phân của nó omega-6, axit docosapentaenoic (C22:5 n-6).

Ở nồng độ trung bình bằng 4,44% (a/a) qua 21 mẻ sản xuất, DPA là loại axit béo đa bất bão hòa có lượng lớn thứ ba trong API, chỉ ít hơn EPA và DHA. Ở mức này, nồng độ DPA cũng gấp khoảng 10 lần so với nồng độ được báo cáo đối với dược phẩm chứa các axit béo đa bất bão hòa omega-3 ở dạng axit tự do trước đó, được gọi bằng thuật ngữ Purepa, trong đó DPA được báo cáo là có mặt với hàm lượng bằng 0,5%. Xem Belluzzi et al., Dig. Dis. Sci. 39(12): 2589-2594 (1994).

Mặc dù DPA là chất trung gian trong quá trình sinh tổng hợp từ EPA thành DHA (xem Fig.), nhưng lại ít biết về các tác dụng sinh học cụ thể của DPA. Để làm rõ sự đóng góp tiềm năng của DPA vào hiệu lực lâm sàng của dược phẩm, các thử nghiệm mô tả sự biểu hiện gen được tiến hành bằng cách sử dụng các tế bào caxinom gan HepG2.

Như được mô tả thêm trong ví dụ 6, các tác dụng của DPA lên sự biểu hiện gen của tế bào gan dự đoán hiệu lực lâm sàng lớn hơn của chế phẩm giàu DPA.

Thử nghiệm mô tả biểu hiện gen thể hiện rằng DPA có hoạt tính sinh học đáng kể ở các nồng độ in vitro liên quan. Các tác dụng này khác biệt rõ rệt với các tác dụng thấy được đối với EPA và DHA.

Ở nồng độ liên quan, DPA được quan sát thấy là ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen trong nhiều con đường chuyển hóa, bao gồm các gen thuộc nhóm đã biết là liên quan đến các tác dụng lâm sàng của các axit béo đa bất bão hòa omega-3: các gen liên quan đến chuyển hóa lipid, các gen liên quan đến sinh lý học tim mạch, và các gen liên quan đến chứng viêm. Các tác dụng thứ cấp đáng kể cũng dự đoán được, với các thay đổi quan sát được trong sự biểu hiện gen mã hoá các protein mà chính các protein này lại ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen, và trong các gen mã hoá các protein ảnh hưởng đến sự cải biến sau phiên mã.

Các tác dụng cụ thể lên sự biểu hiện của một số gen liên quan đến chuyển hóa lipid gợi ý rằng DPA, ở nồng độ in vivo tương tự, góp phần vào việc cải thiện các thông số lipid liên quan đến lâm sàng khác nhau. Cụ thể là, việc điều chỉnh tăng ACADSB bởi DPA quan sát được, axyl-CoA dehydrogenaza mạch ngắn/phân nhánh, dự đoán hàm lượng triglycerit huyết thanh thấp hơn; việc điều chỉnh giảm HMGCR bởi DPA, tương tự với việc ức chế enzym HMG-CoA-reductaza được mã hoá bởi các statin, sẽ được dự đoán là dẫn đến sự giảm có lợi về tỉ lệ cholesterol toàn phần:HDL; và việc điều chỉnh giảm SQLE bởi DPA, bước hạn chế tốc độ trong quá trình tổng hợp sterol, tương tự cũng dự đoán sự giảm mức cholesterol toàn phần.

Thử nghiệm mô tả biểu hiện này cũng thể hiện ngưỡng liều đối với các tác dụng của DPA. Nồng độ thấp hơn được thử nghiệm, được chọn để bắt chước nồng độ DPA thấp hơn 10 lần trong chế phẩm chứa omega-3 dạng axit tự do trước đó, Purepa, ảnh hưởng đến sự biểu hiện của các gen ít hơn 10 lần so với nồng độ DPA cao hơn, được chọn để bắt chước kết quả được mong đợi từ được phẩm được mô tả trong bản mô tả này, chứng tỏ rằng nồng độ DPA thấp hơn tạo ra kết quả dưới giá trị ngưỡng, và được mong đợi để cung cấp liều in vivo thấp hơn liều trị liệu.

Các thử nghiệm lâm sàng trên người xác nhận hiệu lực lâm sàng khác biệt của được phẩm giàu DPA chứa các axit béo đa bất bão hòa omega-3 ở dạng axit tự do.

Ví dụ 7 thể hiện các kết quả của thử nghiệm lâm sàng ECLIPSE, nghiên cứu chéo 4 chiều nhãn mở, liều đơn, được ngẫu nhiên hóa so sánh sinh khả dụng của liều Lovaza® 4g với sinh khả dụng của liều 4g của dược phẩm giàu DPA chứa PUFA omega-3 ở dạng axit tự do được mô tả trong bản mô tả này (dưới đây, "Epanova®"), trong cả hai điều kiện ăn nhiều chất béo và ít chất béo. Theo nhãn sản phẩm được FDA phê chuẩn, mỗi viên nang Lovaza® 1 gam chứa ít nhất 900 mg este etyl của axit béo omega-3 có nguồn gốc từ dầu cá, chủ yếu là hỗn hợp este etyl của axit eicosapentaenoic (EPA - xấp xỉ 465 mg) và axit docosahexaenoic (DHA - xấp xỉ 375 mg). Mẻ Epanova® được sử dụng trong thử nghiệm này bao gồm 57,3% (a/a) EPA, 19,6% (a/a) DHA, và 6,2% (a/a) DPA, mỗi thành phần hầu hết ở dạng axit tự do.

Thay đổi được điều chỉnh theo thời điểm ban đầu về kiểu hấp thu của tổng EPA+DHA và EPA và DHA riêng rẽ (AUC) với Epanova® (PUFA omega-3 ở dạng axit tự do) lớn hơn đáng kể so với Lovaza® (este etyl PUFA omega-3) trong giai đoạn ăn nhiều chất béo và đột ngột tốt hơn trong giai đoạn ăn ít chất béo. Ngoài ra, có ảnh hưởng sâu sắc của hàm lượng chất béo của chế độ ăn lên sinh khả dụng của Lovaza®, còn sinh khả dụng của Epanova® có thể dễ dự đoán hơn, do chỉ ảnh hưởng vừa phải bởi chế độ ăn.

Sinh khả dụng độc lập với chất béo nổi trội của Epanova® so với Lovaza® là quan trọng về mặt lâm sàng, khi xem xét khuyến cáo của NCEP ATP III rằng các đối tượng bị chứng tăng triglycerit huyết và rối loạn lipid máu cần tuân thủ chế độ ăn ít chất béo trong khi trị liệu hỗ trợ.

Ví dụ 8 thể hiện các kết quả từ nghiên cứu sinh khả dụng 14 ngày, thể hiện rằng việc tăng sinh khả dụng quan sát được trong thử nghiệm ECLIPSE liều đơn được duy trì, thậm chí tăng, trong 2 tuần sau khi dùng liều. Ngoài ra, các dữ liệu cụ thể theo đối tượng riêng lẻ minh họa rằng đối tượng có đáp ứng ít nhất với Epanova® vẫn có Cmax EPA+DHA ngày-14 lớn hơn so với đối tượng có đáp ứng tốt nhất với Lovaza®.

Ví dụ 10 thể hiện các kết quả của thử nghiệm EVOLVE, nghiên cứu được đối chứng bằng dầu oliu, mùôi, 12 tuần, của các bệnh nhân được chọn dựa trên hàm lượng triglycerit cao, nằm trong khoảng từ 500-2.000 mg/dl (chứng tăng triglycerit huyết nặng). Chỉ tiêu lâm sàng chính của nghiên cứu là tỉ lệ phần trăm thay đổi về hàm lượng

triglycerit huyết tương từ thời điểm ban đầu đến kết thúc điều trị ("EOT"). Chỉ tiêu lâm sàng phụ là tỉ lệ phần trăm thay đổi về cholesterol không có lipoprotein tỷ trọng cao ("non-HDL-C") trong huyết tương từ thời điểm ban đầu đến EOT.

Như có thể thấy từ các Fig.20-23, quá trình điều trị 12 tuần bằng Epanova® gây tăng mạnh hàm lượng của EPA, DHA, và DPA huyết tương.

Việc tăng hàm lượng của EPA, DHA, và DPA huyết tương được đi kèm với việc giảm đáng kể hàm lượng AA huyết tương, với chế độ liều 4g ảnh hưởng đến mức giảm trung bình là 18%, mức giảm trung vị là 25,9%, và mức giảm trung bình bình phương tối thiểu (least squares - "LS") là 23,2%. Việc giảm hàm lượng axit arachidonic huyết tương này được quan sát thấy mặc dù dùng axit arachidonic ngoại sinh, có mặt ở mức 2,446% (a/a) trong mỡ Epanova® được sử dụng trong thử nghiệm này.

Việc tăng hàm lượng EPA huyết tương cùng với việc giảm hàm lượng AA huyết tương gây ra sự cải thiện đáng kể về tỉ lệ EPA/AA, từ khoảng 0,10 ở thời điểm ban đầu đến khoảng 0,67 (trung bình) và 0,62 (trung vị) ở kết thúc điều trị ("EOT") ở liều 4g. Tỉ lệ EPA/AA đã được báo cáo là cấu thành yếu tố nguy cơ độc lập đối với bệnh xơ vữa động mạch vành, Nakamura & Maegawa, Endocrine Abstracts (2012) 29 OC19.1, với tỉ lệ thấp hơn liên quan đến tiến triển bệnh xơ vữa động mạch vành ở các bệnh nhân bị bệnh động mạch vành được điều trị bằng statin, Nozue et al., Am J Cardiol. 2013 Jan 1;111(1):6-1 (ePub ahead of print).

Ngoài ra, việc điều trị bằng Epanova® dẫn đến làm giảm đáng kể hàm lượng triglycerit (xem các Fig.26A và 26B), giảm non-HDL-C và VLDL-C, và tăng HDL-C. Hàm lượng LDL-C được tăng lên, kết quả quan sát này có thể được cho là do tăng kích thước hạt LDL khi điều trị (được bàn luận thêm trong ví dụ 12).

Thử nghiệm EVOLVE cũng thể hiện rằng Apolipoprotein CIII (ApoCIII) được giảm một cách đáng kể khi điều trị bằng Epanova®. Hàm lượng ApoCIII tăng đã thấy là yếu tố dự đoán độc lập đối với nguy cơ bệnh tim mạch (cardiovascular heart disease - CHD), còn hàm lượng ApoCIII giảm nói chung liên quan đến việc bảo vệ khỏi CHD, và cũng có liên quan đến việc tăng tuổi thọ.

Sinh khả dụng cực kì cao của PUFA omega-3 trong Epanova[®] đã phát hiện ra các khác biệt bất ngờ và chưa biết trước đó về đáp ứng được động học trong số các loại PUFA khác nhau.

Fig.29 là biểu đồ thể hiện mức độ thay đổi của tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị so với thời điểm ban đầu về hàm lượng trong huyết tương của EPA, DHA, DPA, AA, TG, non-HDL-C, và HDL-C (trị số tuyệt đối) giữa các liều 2g và 4g Epanova[®]. Với mức tăng ít hoặc không tăng hàm lượng DHA và DPA huyết tương khi nhân đôi liều Epanova[®] từ 2g đến 4g mỗi ngày, mức độ thay đổi (độ dốc) của tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị so với thời điểm ban đầu là gần bằng không, dự đoán hàm lượng DHA và DPA huyết tương sẽ tăng thêm ít nếu liều được tăng lên nữa. Mức bằng phẳng tương tự của đáp ứng cũng thấy trong hàm lượng triglycerit, hàm lượng HDL-C, và hàm lượng non-HDL-C (số liệu không được chỉ ra).

Ngược lại, mức độ thay đổi đối với EPA vẫn cao, với độ dốc bằng 0,59; việc tăng hơn nữa hàm lượng EPA huyết tương được mong đợi đạt được nhờ tăng liều Epanova[®] trên 4g mỗi ngày. Một cách đáng kể, mức độ thay đổi (giảm) hàm lượng AA khi nhân đôi liều Epanova[®] từ 2g đến 4g mỗi ngày thậm chí còn cao hơn mức độ thay đổi đối với EPA; việc giảm hơn nữa hàm lượng AA huyết tương được mong đợi khi liều Epanova[®] được tăng lên trên 4g/ngày. Do đó, Epanova[®] thể hiện hiệu lực chưa từng thấy về khả năng làm tăng hàm lượng EPA, giảm hàm lượng AA, và cải thiện tỉ lệ EPA:AA.

Như được thể hiện trên Fig.38, một nhóm đối tượng trong nhánh điều trị liều 2g của thử nghiệm EVOLVE nhận phép trị liệu statin đồng thời biểu hiện mức thay đổi tỉ lệ phần trăm lớn hơn (chênh lệch LS trung bình), so với đối chứng, đối với TG, non-HDL-C, HDL-C, LDL-C, TC, VLDL-C, và TC/HDL-C, khi so sánh với nhóm đối tượng trong nhánh điều trị liều 2g mà không nhận phép trị liệu statin đồng thời. Các đối tượng nhận phép trị liệu statin đồng thời thể hiện đáp ứng phụ thuộc liều với Epanova[®], như được thể hiện trong dữ liệu so sánh đối với Epanova[®] 2g và Epanova[®] 4g được trình bày trên Fig.39.

Ví dụ 12 mô tả thử nghiệm lâm sàng ESPRIT, được tiến hành đối với các bệnh nhân nghiên cứu đang dùng phép trị liệu statin ở thời điểm ban đầu với hàm lượng triglycerit nằm trong khoảng 200-500 mg/dl, thấp hơn so với các bệnh nhân bị chứng

tăng triglyxerit huyết nặng được tuyển chọn vào nghiên cứu EVOLVE được mô tả trong ví dụ 10.

Quan sát thấy sự giảm triglyxerit phụ thuộc liều, sự giảm non-HDL-C, và sự tăng HDL-C, khi so sánh với giả được dầu oliu (xem Fig.43). Ngoài ra, cũng quan sát thấy sự giảm VLDL-C và TC/HDL-C phụ thuộc liều (xem Fig.44). Đồng thời, các kết quả (được tóm tắt trên các Fig.42 - 44) thể hiện hiệu lực của Epanova® làm thuốc bổ sung vào phép trị liệu statin ở các bệnh nhân có hàm lượng triglyxerit nằm trong khoảng 200 -500 mg/dl.

Các Fig.45-52 minh họa rằng Epanova® có hiệu quả làm thuốc bổ sung cho cả hai statin có hiệu lực thấp và hiệu lực cao, trong phạm vi tình trạng bệnh của bệnh nhân ở thời điểm ban đầu. Như được thấy trên Fig.48, quan sát thấy sự giảm hàm lượng TG đối với các bệnh nhân nhận phép trị liệu rosuvastatin, atorvastatin, và simvastatin đồng thời. Quan sát thấy các tác dụng có ý nghĩa thống kê lên hàm lượng triglyxerit, non-HDL-C, và LDL-C không quan tâm xem các statin có hiệu lực thấp hoặc hiệu lực cao được dùng đồng thời, như được thể hiện trên các Fig.49-51.

Chế phẩm chứa omega-3 giàu DPA ở dạng axit tự do

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chế phẩm cải thiện chứa axit béo đa bất bão hòa ("PUFA") ở dạng axit tự do. Theo các phương án khác, chế phẩm này là được phẩm thích hợp để dùng qua đường miệng. Theo các phương án khác, chế phẩm này là được phẩm dinh dưỡng thích hợp để dùng qua đường miệng.

Các phương án điển hình

Chế phẩm chứa nhiều loại PUFA omega-3, mỗi loại hầu hết ở dạng axit tự do.

Chế phẩm chứa axit eicosapentaenoic (C20:5 n-3) ("EPA," còn được gọi là axit timnođonic), axit docosahexaenoic (C22:6 n-3) ("DHA," còn được gọi là axit cervonic), và axit docosapentaenoic (C22:5 n-3) ("DPA", còn được gọi là axit clupodonic), mỗi loại hầu hết ở dạng axit tự do.

Chế phẩm này chứa EPA với lượng, được tính theo tỉ lệ phần trăm diện tích trên sắc ký đồ GC của tất cả các axit béo trong chế phẩm, ít nhất là khoảng 45% ("45% (a/a)"). Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa EPA, với lượng ít nhất là 46% (a/a) 47% (a/a), 48% (a/a), 49% (a/a), hoặc ít nhất là 50% (a/a). Theo một số phương án, chế phẩm này chứa EPA với lượng ít nhất là 51% (a/a), ít nhất là 52% (a/a), ít nhất là 53% (a/a), ít nhất là 54% (a/a), ít nhất là 55% (a/a), ít nhất là 56% (a/a), ít nhất là 57% (a/a), ít nhất là 58% (a/a), thậm chí ít nhất là 59% (a/a), ít nhất là 60% (a/a), ít nhất là 61% (a/a), 62% (a/a), 63% (a/a), 64% (a/a), hoặc 65% (a/a).

Theo một số phương án, chế phẩm này chứa EPA với lượng nằm trong khoảng từ 45 đến 65% (a/a). Theo các phương án thực hiện cụ thể, EPA có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 50% (a/a) đến 60% (a/a). Theo các phương án khác nhau, EPA có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 52% (a/a) đến 58,0% (a/a). Theo một số phương án, EPA có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 55% (a/a) đến 56% (a/a). Theo một số phương án, EPA có mặt với lượng khoảng 55% (a/a).

Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa EPA với lượng, được tính theo tỉ lệ phần trăm trọng lượng của tất cả các axit béo trong chế phẩm ("% (m/m)"), nằm trong khoảng từ 50% (m/m) đến 60% (m/m). Theo một số phương án, EPA có mặt với lượng khoảng 55% (a/a).

Chế phẩm này chứa DHA với lượng ít nhất là 13% (a/a). Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa DHA với lượng ít nhất là 14% (a/a), ít nhất là 15% (a/a), ít nhất là 16% (a/a), ít nhất là 17% (a/a), ít nhất là 18% (a/a), ít nhất là 19% (a/a), hoặc ít nhất là 20% (a/a). Trong các phương án được chọn, chế phẩm này chứa DHA với lượng ít nhất là 21% (a/a), ít nhất là 22% (a/a), ít nhất là 23% (a/a), ít nhất là 24% (a/a), thậm chí ít nhất là 25% (a/a).

Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa DHA với lượng nằm trong khoảng từ 13% (a/a) đến 25% (a/a). Theo một số phương án, DHA có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 15% (a/a) đến 25% (a/a). Theo một số phương án, DHA có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 17% (a/a) đến 23% (a/a). Theo một số phương án, DHA có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 19% (a/a) đến 20% (a/a).

Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa DHA với lượng nằm trong khoảng từ 15% (m/m) đến 25% (m/m). Theo một số phương án, DHA có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 17% (m/m) đến 23% (m/m). Theo một số phương án, DHA có mặt với lượng khoảng 20% (m/m).

Chế phẩm này chứa DPA với lượng ít nhất là 1% (a/a). Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa DPA với lượng ít nhất là 1,5% (a/a), 2% (a/a), 2,5% (a/a), 3% (a/a), 3,5% (a/a), 4% (a/a), 4,5% (a/a), thậm chí ít nhất là 5% (a/a). Trong các phương án được chọn, chế phẩm này chứa DPA với lượng ít nhất là 6% (a/a), ít nhất là 7% (a/a), ít nhất là 8% (a/a), hoặc ít nhất là 9% (a/a).

Theo nhiều phương án khác, chế phẩm này chứa DPA với lượng nằm trong khoảng từ 1% (a/a) đến 8% (a/a). Theo một số phương án, chế phẩm này chứa DPA với lượng nằm trong khoảng từ 2% (a/a) đến 7% (a/a). Trong các phương án được chọn, chế phẩm này chứa DPA với lượng nằm trong khoảng từ 3% (a/a) đến 6% (a/a). Theo các phương án thực hiện cụ thể, chế phẩm này chứa DPA với lượng nằm trong khoảng từ 4% (a/a) đến 5% (a/a).

Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa DPA, được tính theo tỉ lệ phần trăm trọng lượng của tất cả các axit béo trong chế phẩm, với lượng không ít hơn 1% (m/m). Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa DPA với lượng nằm trong khoảng từ 1% (m/m) đến 8% (m/m). Theo các phương án thực hiện cụ thể, chế phẩm này chứa DPA với lượng không quá 10% (m/m).

Chế phẩm này chứa EPA và DHA với tổng lượng ít nhất là khoảng 60% (a/a). Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa EPA và DHA với tổng lượng ít nhất là khoảng 61% (a/a), 62% (a/a), 63% (a/a), 64% (a/a), 65% (a/a), 66% (a/a), 67% (a/a), 68% (a/a), 69% (a/a), hoặc ít nhất là 70% (a/a). Theo các phương án cụ thể, chế phẩm này chứa EPA và DHA với tổng lượng ít nhất là 71% (a/a), 72% (a/a), 73% (a/a), 74% (a/a), 75% (a/a), 76% (a/a), 77% (a/a), 78% (a/a), 79% (a/a), thậm chí ít nhất là 80% (a/a). Theo một số phương án, chế phẩm này chứa EPA và DHA với tổng lượng ít nhất là 81% (a/a), 82% (a/a), ít nhất là 83% (a/a), 84% (a/a), thậm chí ít nhất là 85% (a/a).

Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa EPA và DHA với lượng nằm trong khoảng từ 70,0% (m/m) đến 80,0% (m/m). Theo một số phương án, chế phẩm này chứa khoảng 75% (m/m) EPA cộng với DHA.

Chế phẩm này chứa EPA, DHA, và DPA với tổng lượng ít nhất là 61% (a/a). Theo các phương án điển hình, chế phẩm này chứa EPA, DHA, và DPA với tổng lượng ít nhất là 62% (a/a), 63% (a/a), 64% (a/a), 65% (a/a), 66% (a/a), ít nhất là 67% (a/a), ít nhất là 68% (a/a), ít nhất là 69% (a/a), hoặc ít nhất là 70% (a/a). Theo một số phương án, chế phẩm này chứa EPA, DHA, và DPA với tổng lượng ít nhất là 71% (a/a), 72% (a/a), 73% (a/a), 74% (a/a), 75% (a/a), 76% (a/a), 77% (a/a), 78% (a/a), 79% (a/a), 80% (a/a), thậm chí ít nhất là 81% (a/a), 82% (a/a), 83% (a/a), 84% (a/a), 85% (a/a), 86% (a/a), 87% (a/a), thậm chí ít nhất là 88% (a/a).

Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa EPA, DHA, và DPA với tổng lượng nằm trong khoảng từ 70% (a/a) đến 90% (a/a).

Theo một loạt các phương án cụ thể, EPA có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 55% (a/a) đến 56% (a/a); DHA có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 19% (a/a) đến 20% (a/a); và DPA có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 4% (a/a) đến 5% (a/a).

Theo một số phương án, chế phẩm này còn chứa một hoặc nhiều loại axit béo đa bất bão hòa omega-3 được chọn từ nhóm bao gồm: axit α -linolenic (C18:3 n-3), axit moroctic (C18:4 n-3, còn được gọi là axit stearidonic), axit eicosatrienoic (C20:3 n-3), axit eicosatetraenoic (C20:4 n-3), và axit heneicosapentaenoic (C21:5 n-3).

Theo các phương án cụ thể, chế phẩm này chứa EPA, DHA, DPA, và axit moroctic, mỗi loại hầu hết ở dạng axit tự do. Theo nhiều phương án khác, chế phẩm này chứa EPA, DHA, DPA, axit moroctic, và axit heneicosapentaenoic, mỗi loại hầu hết ở dạng axit tự do. Theo các phương án cụ thể, chế phẩm này chứa EPA, DHA, DPA, axit moroctic, axit heneicosapentaenoic, và axit eicosatetraenoic, mỗi loại hầu hết ở dạng axit tự do. Trong các phương án được chọn, chế phẩm này chứa EPA, DHA, DPA, axit α -linolenic (C18:3 n-3), axit moroctic (C18:4 n-3), axit eicosatrienoic (C20:3 n-3), axit eicosatetraenoic (C20:4 n-3), và axit heneicosapentaenoic (C21:5 n-3).

Theo các phương án khác nhau, tổng các axit béo omega-3 - được xác định là tổng của axit alpha-linolenic (C18:3 n-3), axit moroctic (C18:4 n-3), axit eicosatrienoic (C20:3 n-3), axit eicosatetraenoic (C20:4 n-3), axit eicosapentaenoic (EPA) (C20:5 n-3), axit heneicosapentaenoic (C21:5 n-3), axit docosapentaenoic (C22:5 n-3) và axit docosahexaenoic (DHA) (C22:6 n-3) - chiếm từ 80% (a/a) đến 95% (a/a) của tất cả các axit béo trong chế phẩm. Theo nhiều phương án khác, tổng các axit béo omega-3 chiếm từ 80 đến 95% (m/m) của tất cả các axit béo trong chế phẩm.

Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này còn chứa một hoặc nhiều loại PUFA omega-6, mỗi loại hầu hết ở dạng axit tự do.

Theo một số phương án, chế phẩm này chứa một hoặc nhiều loại PUFA omega-6 được chọn từ nhóm bao gồm axit linoleic (C18:2 n-6), axit gama-linolenic (C18:3 n-6), axit eicosadienoic (C20:2 n-6), axit dihomogama-linolenic (C20:3 n-6) ("DGLA"), axit arachidonic (C20:4 n-6) ("AA"), và axit docosapentaenoic (C22:5 n-6, còn được gọi là axit osbond).

Theo các phương án cụ thể, chế phẩm này chứa axit linoleic (C18:2 n-6), axit gama-linolenic (C18:3 n-6), axit eicosadienoic (C20:2 n-6), axit dihomogama-linolenic (C20:3 n-6) ("DGLA"), axit arachidonic (C20:4 n-6) ("AA"), và axit docosapentaenoic (C22:5 n-6), mỗi loại hầu hết ở dạng axit tự do.

Theo các phương án khác nhau, AA có mặt với lượng không quá 5% (a/a) của các axit béo trong chế phẩm. Theo một số phương án, AA chiếm không quá 4,5% (a/a) của các axit béo trong chế phẩm. Theo các phương án cụ thể, AA có mặt với lượng không quá 4% (a/a) của các axit béo trong chế phẩm.

Theo một số phương án, AA có mặt với lượng không quá 5% (m/m) của các axit béo trong chế phẩm. Theo một số phương án, AA chiếm không quá 4,5% (m/m) của các axit béo trong chế phẩm. Theo một số phương án cụ thể, AA có mặt với lượng không quá 4% (m/m) của các axit béo trong chế phẩm.

Theo một số phương án, tổng các axit béo đa bất bão hòa omega-6 - được định nghĩa là tổng của axit linoleic (C18:2 n-6), axit gama-linolenic (C18:3 n-6), axit eicosadienoic (C20:2 n-6), axit dihomogama-linolenic (C20:3 n-6), axit arachidonic

(C20:4 n-6) và axit docosapentaenoic (C22:5 n-6) - chiếm không quá 10% (a/a) của các axit béo trong chế phẩm. Theo một số phương án, tổng các axit béo đa bất bão hòa omega-6 - được định nghĩa là tổng của axit linoleic (C18:2 n-6), axit gamma-linolenic (C18:3 n-6), axit eicosadienoic (C20:2 n-6), axit dihomogamma-linolenic (C20:3 n-6), axit arachidonic (C20:4 n-6) và axit docosapentaenoic (C22:5 n-6) - chiếm không quá 10% (m/m) của các axit béo trong chế phẩm.

Theo các phương án cụ thể, chế phẩm này được đưa ra trong Bảng 11, với mỗi loại PUFA được xác định trong đó nằm trong khoảng từ -3SD đến +3SD của giá trị trung bình được nêu tương ứng. Theo một số phương án, mỗi loại PUFA được xác định trong đó nằm trong khoảng từ -2SD đến +2SD của giá trị trung bình được nêu tương ứng. Theo một số phương án, mỗi loại này nằm trong khoảng từ -1SD đến +1SD của giá trị trung bình được nêu tương ứng.

Theo các phương án được chọn, chế phẩm này được đưa ra trong Bảng 13, với mỗi loại PUFA được xác định trong đó nằm trong khoảng từ -3SD đến +3SD của giá trị trung bình được nêu tương ứng. Theo một số phương án, mỗi loại này nằm trong khoảng từ -2SD đến +2SD của giá trị trung bình được nêu tương ứng. Theo một số phương án, mỗi loại PUFA nằm trong khoảng từ -1SD đến +1SD của giá trị trung bình được nêu tương ứng.

Theo một số phương án, các axit béo đa bất bão hòa không phải là axit béo đa bất bão hòa omega-3 và omega-6 có mặt với lượng không quá 5% (a/a). Theo các phương án khác nhau, các axit béo đa bất bão hòa không phải là axit béo đa bất bão hòa omega-3 và omega-6 có mặt với lượng không quá 5% (m/m).

Theo nhiều phương án khác, ít nhất 90% của mỗi trong số các loại PUFA omega-3 trong chế phẩm là ở dạng axit tự do. Theo một số phương án, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, thậm chí ít nhất 99% của mỗi loại PUFA omega-3 trong chế phẩm có mặt ở dạng axit tự do. Theo các phương án để làm mẫu, ít nhất 90% của tổng hàm lượng axit béo đa bất bão hòa omega-3 trong chế phẩm có mặt ở dạng axit tự do. Theo một số phương án, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%,

thậm chí ít nhất là 99% của tổng hàm lượng axit béo đa bất bão hòa omega-3 trong chế phẩm có mặt ở dạng axit tự do.

Theo các phương án khác nhau, ít nhất 90% của mỗi trong số các loại PUFA omega-6 trong chế phẩm là ở dạng axit tự do. Theo một số phương án, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, thậm chí ít nhất 99% của mỗi loại PUFA omega-6 trong chế phẩm có mặt ở dạng axit tự do. Theo các phương án để làm mẫu, ít nhất 90% của tổng hàm lượng axit béo đa bất bão hòa omega-6 trong chế phẩm có mặt ở dạng axit tự do.

Theo các phương án khác nhau, ít nhất 90% của tổng các axit béo đa bất bão hòa trong chế phẩm có mặt ở dạng axit tự do. Theo một số phương án, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, thậm chí ít nhất là 99% của tổng các axit béo đa bất bão hòa trong chế phẩm có mặt ở dạng axit tự do.

Theo các phương án điển hình, chế phẩm này chứa axit béo bão hòa với lượng không quá 3,0% (a/a) và axit béo đơn bất bão hòa với lượng không quá 5,0% (a/a). Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa axit béo bão hòa với lượng không quá 3,0% (m/m) và axit béo đơn bất bão hòa với lượng không quá 5,0% (m/m).

Theo các phương án điển hình, chế phẩm này còn chứa hữu ích chất chống oxy hoá. Theo một số phương án, chất chống oxy hoá này là hydroxylanisol được butyl hóa (BHA). Theo một số phương án, chất chống oxy hoá này là alpha-tocopherol. Theo một số phương án, alpha-tocopherol có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,20 - 0,40% (m m). Theo các phương án khác nhau, alpha-tocopherol có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,25 - 0,35% (m/m). Theo các phương án thực hiện cụ thể, alpha-tocopherol có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,27 - 0,33% (m/m).

Theo các phương án điển hình, chế phẩm này chứa không quá khoảng 0,1 ppm etyl carbamat. Theo một số phương án, chế phẩm này chứa không quá 0,1 ppm etyl carbamat. Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa ít hơn 0,1 ppm etyl carbamat.

Các phương án bổ sung

Theo một số phương án bổ sung, chế phẩm này chứa EPA với lượng, được tính theo tỉ lệ phần trăm diện tích trên sắc ký đồ GC của tất cả các axit béo trong chế phẩm, nằm trong khoảng 45,0 - 65,0% (a/a). Theo một số phương án, EPA có mặt với lượng nằm trong khoảng 50,0 - 60,0% (a/a). Theo các phương án khác nhau, EPA có mặt với lượng nằm trong khoảng 52,0 - 58,0% (a/a). Theo một số phương án, EPA có mặt với lượng khoảng 55,0% (a/a).

Theo một số phương án, EPA có mặt với lượng nằm trong khoảng 55,0 - 58,4% (a/a). Theo các phương án khác nhau, EPA có mặt với lượng nằm trong khoảng 55,6 - 57,9% (a/a). Theo một số phương án, EPA có mặt với lượng khoảng 56,7% (a/a).

Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa EPA với lượng, được tính theo tỉ lệ phần trăm trọng lượng của tất cả các axit béo trong chế phẩm, nằm trong khoảng 50,0 - 60,0% (m/m). Theo một số phương án, EPA có mặt với lượng khoảng 55% (a/a).

Theo một số các phương án bổ sung, chế phẩm này chứa DHA với lượng, được tính theo tỉ lệ phần trăm diện tích trên sắc ký đồ GC của tất cả các axit béo trong chế phẩm, nằm trong khoảng 13,0 - 25,0% (a/a). Theo một số phương án, DHA có mặt với lượng nằm trong khoảng 15,0 - 23,0% (a/a). Theo các phương án khác nhau, DHA có mặt với lượng nằm trong khoảng 17,0 - 21,0% (a/a). Theo một số phương án, DHA có mặt với lượng nằm trong khoảng 19,0 - 20,0% (a/a).

Theo một số phương án, DHA có mặt với lượng nằm trong khoảng 17,7 - 22,2% (a/a). Theo các phương án khác nhau, DHA có mặt với lượng nằm trong khoảng 18,4 - 21,4% (a/a). Theo một số phương án, DHA có mặt với lượng khoảng 19,9% (a/a).

Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa DHA, được tính theo tỉ lệ phần trăm trọng lượng của tất cả các axit béo trong chế phẩm, với lượng nằm trong khoảng 15,0 - 25,0% (m/m). Theo một số phương án, DHA có mặt với lượng khoảng 20,0% (m/m).

Theo các phương án bổ sung khác nhau, chế phẩm này chứa EPA và DHA với tổng lượng, được tính theo tỉ lệ phần trăm diện tích trên sắc ký đồ GC của tất cả các axit béo trong chế phẩm, nằm trong khoảng 67,0 - 81,0% (a/a). Theo một số phương án, chế

phẩm này chứa tổng lượng EPA và DHA nằm trong khoảng 69,0 - 79,0% (a/a). Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa tổng lượng EPA cộng với DHA nằm trong khoảng 71,0 - 77,0% (a/a). Theo một số phương án, chế phẩm này chứa tổng lượng EPA+DHA nằm trong khoảng 74,0 - 75,0% (a/a).

Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa EPA+DHA với tổng lượng, được tính theo tỉ lệ phần trăm trọng lượng của tất cả các axit béo trong chế phẩm, nằm trong khoảng 70,0-80,0% (m/m). Theo một số phương án, chế phẩm này chứa khoảng 75,0% (m/m) EPA cộng với DHA.

Trong các phương án bổ sung mà chế phẩm còn chứa axit α -linolenic (C18:3 n-3), axit α -linolenic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,07 - 1,10% (a/a). Theo một số phương án, axit α -linolenic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,24 - 0,91% (a/a). Theo các phương án khác nhau, axit α -linolenic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,40 - 0,80% (a/a). Theo một số phương án, axit α -linolenic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,50 đến 0,600% (a/a).

Trong các phương án bổ sung mà chế phẩm còn chứa axit moroctic (C18:4 n-3), axit moroctic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,01 - 7,90% (a/a). Theo một số phương án, axit moroctic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,25 - 6,40% (a/a). Theo một số phương án, axit moroctic có mặt với lượng nằm trong khoảng 1,70% - 4,90% (a/a). Theo các phương án cụ thể, axit moroctic có mặt với lượng khoảng 3,25% (a/a).

Trong các phương án bổ sung mà chế phẩm còn chứa axit eicosatrienoic (C20:3 n-3), axit eicosatrienoic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,75 - 3,50% (a/a). Theo một số phương án, axit eicosatrienoic có mặt với lượng nằm trong khoảng 1,20 - 3,00% (a/a), theo các phương án khác nhau, axit eicosatrienoic có mặt với lượng nằm trong khoảng 1,60 - 2,60% (a/a). Theo một số phương án, axit eicosatrienoic có mặt với lượng khoảng 2,10% (a/a).

Trong các phương án bổ sung mà chế phẩm còn chứa axit eicosatetraenoic (C20:4 n-3), axit eicosatetraenoic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,01 - 0,40% (a/a). Theo một số phương án, axit eicosatetraenoic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,01 - 0,30% (a/a). Theo một số phương án, axit eicosatetraenoic có mặt với lượng nằm trong

khoảng 0,03 - 0,22% (a/a). Theo một số phương án, axit eicosatetraenoic có mặt với lượng khoảng 0,12% (a/a).

Trong các phương án bổ sung mà chế phẩm còn chứa axit heneicosapentaenoic (C21:5 n-3), axit heneicosapentaenoic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,01 - 4,10% (a/a). Theo một số phương án, axit heneicosapentaenoic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,01 - 3,20% (a/a). Theo các phương án cụ thể, axit heneicosapentaenoic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,60 - 2,35% (a/a). Theo các phương án khác nhau, axit heneicosapentaenoic có mặt với lượng khoảng 1,50% (a/a).

Theo các phương án bổ sung khác nhau, DPA có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,90 - 7,60% (a/a). Theo nhiều phương án khác, DPA có mặt với lượng nằm trong khoảng 2,00 - 6,50% (a/a). Theo một số phương án, DPA có mặt với lượng nằm trong khoảng 3,10 - 5,40% (a/a). Theo các phương án khác nhau, DPA có mặt với lượng khoảng 4,25% (a/a).

Theo các phương án bổ sung khác nhau, DPA có mặt với lượng nằm trong khoảng 2,13 - 8,48% (a/a). Theo một số phương án, DPA có mặt với lượng nằm trong khoảng 3,19 - 7,42% (a/a). Theo một số phương án, DPA có mặt với lượng nằm trong khoảng 4,25 - 6,37% (a/a). Theo các phương án khác nhau, DPA có mặt với lượng khoảng 5,31% (a/a).

Theo các phương án khác nhau, tổng các axit béo omega-3 chiếm khoảng từ 80,0 - 95% (m/m) của tất cả các axit béo trong được phẩm.

Trong các phương án bổ sung mà chế phẩm này chứa DGLA, DGLA có mặt với lượng, được tính theo tỉ lệ phần trăm diện tích trên sắc ký đồ GC của tất cả các axit béo trong chế phẩm, nằm trong khoảng 0,01 - 4,40% (a/a). Theo một số phương án, DGLA có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,01 - 3,30% (a/a). Theo một số phương án, DGLA có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,01 - 2,20% (a/a). Theo một số phương án, DGLA có mặt với lượng khoảng 1,10% (a/a).

Theo một số phương án, DGLA có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,28 - 0,61% (a/a). Theo một số phương án, DGLA có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,33 - 0,56% (a/a). Theo một số phương án, DGLA có mặt với lượng khoảng 0,44% (a/a).

Trong các phương án bổ sung mà chế phẩm này chứa AA, AA có mặt với lượng, được tính theo tỉ lệ phần trăm diện tích trên sắc ký đồ GC của tất cả các axit béo trong chế phẩm, nằm trong khoảng 0,01 - 6,90% (a/a). Theo các phương án khác nhau, AA có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,01 - 5,40% (a/a). Theo một số phương án, AA có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,70 - 3,80% (a/a). Theo một số phương án, AA có mặt với lượng khoảng 2,25% (a/a).

Theo các phương án khác nhau, AA có mặt với lượng nằm trong khoảng 1,41 - 4,87% (a/a). Theo một số phương án, AA có mặt với lượng nằm trong khoảng 1,99 - 4,30% (a/a). Theo một số phương án, AA có mặt với lượng nằm trong khoảng 2,57 - 3,72% (a/a).

Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa AA với lượng không quá 4,5% (a/a). Theo một số phương án, chế phẩm này chứa AA với lượng không quá 3,14% (a/a).

Trong các phương án bổ sung mà chế phẩm này còn chứa axit linoleic (C18:2 n-6), axit linoleic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,25% - 1,30% (a/a). Theo một số phương án, axit linoleic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,40% - 1,20% (a/a). Theo các phương án khác nhau, axit linoleic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,60% - 0,95% (a/a). Theo các phương án thực hiện cụ thể, axit linoleic có mặt với lượng khoảng 0,80% (a/a).

Trong các phương án bổ sung mà chế phẩm này còn chứa axit gamma-linolenic (C18:3 n-6), axit gamma-linolenic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,01 - 0,65% (a/a). Theo các phương án khác nhau, axit gamma-linolenic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,03 - 0,51% (a/a). Theo một số phương án, axit gamma-linolenic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,15 - 0,40% (a/a). Theo một số phương án, axit gamma-linolenic có mặt với lượng khoảng 0,27% (a/a).

Trong các phương án bổ sung mà chế phẩm này còn chứa axit eicosadienoic (C20:2 n-6), axit eicosadienoic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,01 - 0,30 (a/a). Theo các phương án khác nhau, axit eicosadienoic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,04 - 0,24% (a/a). Theo một số phương án, axit eicosadienoic có mặt với lượng nằm

trong khoảng 0,09 - 0,20% (a/a). Theo một số phương án, axit eicosadienoic có mặt với lượng khoảng 0,14% (a/a).

Trong các phương án bổ sung mà chế phẩm này còn chứa axit docosapentaenoic (C22:5 n-6), axit docosapentaenoic có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,01 - 0,95% (a/a). Theo các phương án khác nhau, axit docosapentaenoic (C22:5 n-6) có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,01 - 1,05% (a/a). Theo một số phương án, axit docosapentaenoic (C22:5 n-6) có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,05 - 0,71% (a/a). Theo một số phương án, axit docosapentaenoic (C22:5 n-6) có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,01 - 0,48% (a/a). Theo các phương án cụ thể, axit docosapentaenoic (C22:5 n-6) có mặt với lượng khoảng 0,24% (a/a).

Theo một số phương án, axit docosapentaenoic (C22:5 n-6) có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,01 - 1,19% (a/a). Theo một số phương án, axit docosapentaenoic (C22:5 n-6) có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,16 - 0,98% (a/a). Theo các phương án cụ thể, axit docosapentaenoic (C22:5 n-6) có mặt với lượng khoảng 0,57% (a/a).

Theo một số phương án, chế phẩm này chứa tổng các axit béo omega-6 với lượng không quá 10,0% (a/a) .

Theo các phương án điển hình trong số các phương án bổ sung này, chế phẩm này chứa axit béo bão hòa với lượng không quá 3,0% (a/a), axit béo đơn bất bão hòa với lượng không quá 5,0% (a/a), và etyl carbamat với lượng không quá 0,1 ppm. Theo một số phương án, chế phẩm này chứa không quá 0,1 ppm etyl carbamat. Theo các phương án khác nhau, chế phẩm này chứa ít hơn 0,1 ppm etyl carbamat.

Các dược phẩm dạng liều đơn vị

Theo một khía cạnh khác, dược phẩm hoặc dược phẩm dinh dưỡng giàu DPA chứa PUFA omega-3 ở dạng axit tự do được mô tả trong chế phẩm chứa omega-3 giàu DPA ở dạng axit tự do trên đây được bao gói hữu ích ở dạng liều đơn vị để dùng qua đường miệng.

Theo các phương án cụ thể, dạng liều này là viên nang. Theo một số phương án, dạng liều này là viên nang gelatin. Theo các phương án cụ thể, viên nang gelatin là nang gelatin cứng. Theo các phương án khác, dạng liều này là viên nang gelatin mềm.

Theo các phương án khác nhau, viên nang này chứa gelatin loại A. Theo một số phương án, viên nang này chứa cả gelatin loại A và loại B. Các nguồn collagen để sản xuất gelatin loại A hoặc loại B bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bò, lợn và cá.

Theo các phương án khác nhau, viên nang này là nang gelatin mềm chứa gelatin loại A của lợn đủ sao cho nang này tan rã trong một khoảng thời gian không quá 30 phút trong nước tinh khiết ở nhiệt độ 37°C sau khi bảo quản trong ít nhất 3 tháng ở nhiệt độ 40°C. Theo một số phương án, viên nang này là nang gelatin mềm chứa gelatin loại A của lợn đủ sao cho nang này tan rã trong một khoảng thời gian không quá 30 phút trong nước tinh khiết ở nhiệt độ 37°C sau khi bảo quản trong 6 tháng ở nhiệt độ 40°C. Theo một số phương án, viên nang này là nang gelatin mềm chứa gelatin loại A của lợn đủ sao cho nang này tan rã trong một khoảng thời gian không quá 30 phút trong nước tinh khiết ở nhiệt độ 37°C sau khi bảo quản trong 12 tháng ở nhiệt độ 40°C.

Theo các phương án khác nhau, viên nang này là nang gelatin mềm chứa gelatin loại A của lợn đủ sao cho nang này tan rã trong một khoảng thời gian không quá 30 phút trong nước tinh khiết ở nhiệt độ 37°C sau khi bảo quản trong ít nhất 3 tháng ở nhiệt độ 30°C. Theo một số phương án, viên nang này là nang gelatin mềm chứa gelatin loại A của lợn đủ sao cho nang này tan rã trong một khoảng thời gian không quá 30 phút trong nước tinh khiết ở nhiệt độ 37°C sau khi bảo quản trong 6 tháng ở nhiệt độ 30°C. Theo một số phương án, viên nang này là nang gelatin mềm chứa gelatin loại A của lợn đủ sao cho nang này tan rã trong một khoảng thời gian không quá 30 phút trong nước tinh khiết ở nhiệt độ 37°C sau khi bảo quản trong 12 tháng ở nhiệt độ 30°C.

Theo một số phương án, viên nang này là nang gelatin mềm chứa hỗn hợp gồm gelatin loại A và gelatin loại B của lợn. Theo các phương án khác nhau này, ít nhất 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% thậm chí ít nhất là 50% (kl/kl) của gelatin là gelatin loại A của lợn. Trong các phương án được chọn, ít nhất 55%, 60%, 65%, 70%, 75% (kl/kl) của gelatin là gelatin loại A của lợn. Theo các phương án cụ thể, ít nhất 80%, 85%, 90%, thậm chí 95% (kl/kl) của gelatin là gelatin loại A của lợn.

Theo các phương án khác nhau, viên nang này là nang gelatin mềm trong đó gelatin về cơ bản được cấu thành từ gelatin loại A của lợn.

Theo một số phương án, viên nang này là nang gelatin khử được liên kết ngang, như viên được mô tả trong patent Mỹ số 7,485,323, được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Theo một số phương án, viên nang này chứa gelatin được succinyl hóa.

Theo nhiều phương án khác, các nang này được làm từ các chất không phải là sản phẩm phụ của động vật, như thạch trắng, carrageenan, pectin, konjak, gồm guar, tinh bột thực phẩm, tinh bột ngô biến tính, tinh bột khoai tây, và bột sắn bột. Các nguồn không phải động vật của các nguyên liệu có thể được sử dụng để bào chế viên nang dùng trong dạng liều đơn vị dùng qua đường miệng được mô tả trong bản mô tả này được mô tả trong công bố patent Mỹ số 2011/0117180, được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Theo một số phương án, viên nang Vegicaps® (Catalent) được sử dụng.

Trong một số phương án về dạng liều đơn vị viên nang dùng qua đường miệng, viên nang này không được bao.

Trong các phương án khác về dạng liều đơn vị viên nang dùng qua đường miệng, viên nang này được bao.

Trong một số phương án về viên nang được bao, chế phẩm chứa axit béo được giải phóng theo cách phụ thuộc thời gian. Theo các phương án khác nhau, không có sự giải phóng đáng kể chế phẩm chứa PUFA trong ít nhất 30 phút sau khi dùng thuốc. Theo một số phương án, không có sự giải phóng đáng kể chế phẩm chứa PUFA trong ít nhất 30 phút khi việc giải phóng này được thử nghiệm in vitro. Theo một số phương án, không quá 20% chế phẩm chứa PUFA được giải phóng trong vòng 30 phút đầu khi được thử nghiệm in vitro. Trong các phương án được chọn, không quá 25%, 30%, thậm chí không quá 35% chế phẩm chứa PUFA được giải phóng trong vòng 30 phút đầu, khi được thử nghiệm in vitro. Theo các phương án cụ thể, đặc tính giải phóng in vitro được đánh giá theo quy trình được mô tả trong đơn sáng chế tạm thời số 61/749,124, được nộp ngày 4 tháng Giêng năm 2013, có tên "Method of release testing for omega-3 polyunsaturated

fatty acids," của Bharat Mehta, nội dung của nó được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Theo các phương án cụ thể, một lượng đáng kể chế phẩm chứa PUFA được giải phóng trong khoảng 60 phút sau khi dùng thuốc. Theo một số phương án, một lượng đáng kể chế phẩm chứa PUFA được giải phóng trong khoảng 60 phút khi được thử nghiệm in vitro. Trong các phương án được chọn, ít nhất 40% chế phẩm chứa PUFA được giải phóng trong khoảng 60 phút, khi được thử nghiệm in vitro. Theo các phương án khác nhau, ít nhất 45%, 50%, 55%, 60%, thậm chí ít nhất 65% chế phẩm chứa PUFA được giải phóng trong khoảng 60 phút, khi được thử nghiệm in vitro. Theo các phương án cụ thể, đặc tính giải phóng in vitro được đánh giá theo quy trình được mô tả trong đơn sáng chế tạm thời số 61/749,124, được nộp ngày 4 tháng Giêng năm 2013, có tên "Method of release testing for omega-3 polyunsaturated fatty acids," của Mehta, nội dung của nó được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Theo một số phương án, viên nang được bao như được mô tả trong patent Mỹ các số 5,792,795 và 5,948,818, nội dung của nó được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Trong các phương án về viên nang được bao khác nhau, lớp bao là copolyme poly(etylacrylat-metylacrylat). Theo một số phương án, lớp bao này là Eudragit NE 30-D (Evonik Industries AG), có trọng lượng phân tử trung bình khoảng 800.000.

Trong các phương án về viên nang được bao khác, viên nang này được bao bằng lớp bao tan trong ruột có tác dụng bảo vệ viên nang này khỏi bị hòa tan hoặc phân rã trong dạ dày nhưng bị hoà tan ở độ pH đạt được trong ruột non.

Theo các phương án khác nhau, dược phẩm dạng liều đơn vị dùng qua đường miệng chứa trong khoảng từ 100 mg đến 2000 mg chế phẩm chứa PUFA. Theo một số phương án, dạng liều dùng qua đường miệng này chứa khoảng 250 mg chế phẩm chứa PUFA. Theo một số phương án, dạng liều dùng qua đường miệng này chứa khoảng 500 mg chế phẩm chứa PUFA. Theo một số phương án, dạng liều dùng qua đường miệng này chứa khoảng 750 mg chế phẩm chứa PUFA. Theo một số phương án, dạng liều dùng qua đường miệng này chứa khoảng 1000 mg chế phẩm chứa PUFA. Theo các phương án khác, dạng liều dùng qua đường miệng này chứa khoảng 1500 mg chế phẩm chứa PUFA. Theo một số phương án, dược phẩm dạng liều đơn vị này chứa các lượng trọng

lượng không nguyên của chế phẩm chứa PUFA nằm trong khoảng từ 100 mg đến 2000 mg.

Kit liều

Theo một khía cạnh khác, nhiều dược phẩm dạng liều đơn vị như được mô tả trên đây có thể được bao gói cùng nhau trong một kit liều để làm tăng việc dễ dàng sử dụng và việc tuân thủ của bệnh nhân.

Theo một số phương án, kit liều này là lọ. Theo các phương án khác, nhiều dạng liều được bao gói trong vỉ, nhiều vỉ này có thể tùy ý được bao gói cùng nhau trong hộp hoặc vỏ khác. Thông thường, dù trong lọ hoặc một hoặc nhiều vỉ, nhiều dược phẩm dạng liều đơn vị là đủ dùng trong 30 ngày, 60 ngày, hoặc 90 ngày dùng liều. Do đó, trong các phương án được chọn, dược phẩm dạng liều đơn vị này là viên nang chứa khoảng một gam dược phẩm như được mô tả trên đây, và kit liều bao gồm 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 270, hoặc 300 viên nang này.

Theo các phương án khác nhau, nhiều dược phẩm dạng liều đơn vị được bao gói dưới khí trơ, như khí nitơ hoặc khí hiếm, hoặc được bao gói trong chân không.

Phương pháp điều trị

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả các phương pháp điều trị bệnh.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị chứng tăng triglyxerit huyết nặng (> 500 mg/dl)

Theo một loạt các phương án điều trị thứ nhất, phương pháp điều trị chứng tăng triglyxerit huyết nặng được mô tả.

Phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân có hàm lượng triglyxerit huyết thanh hoặc huyết tương trước khi điều trị ≥ 500 mg/dl dùng qua đường miệng dược phẩm được mô tả trong phần chế phẩm chứa omega-3 giàu DPA ở dạng axit tự do trên đây với lượng và trong thời gian đủ để làm giảm hàm lượng triglyxerit huyết thanh hoặc huyết tương xuống dưới mức trước khi điều trị. Theo các phương án điển hình, mỗi liều dược phẩm này được dùng dưới dạng một hoặc nhiều dạng liều đơn vị được mô tả trong phần dược phẩm dạng liều trên đây.

Theo các phương án khác nhau, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm giảm hàm lượng triglycerit huyết thanh hoặc huyết tương xuống ít nhất 5%, 6%, 7%, 8%, hoặc ít nhất 9% so với mức trước khi điều trị. Theo một số phương án, chế phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm giảm hàm lượng triglycerit huyết thanh hoặc huyết tương xuống ít nhất 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18% hoặc 19% so với mức trước khi điều trị. Theo các phương án cụ thể, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm giảm hàm lượng triglycerit huyết thanh hoặc huyết tương xuống ít nhất 20% so với mức trước khi điều trị. Theo các phương án khác nhau, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm giảm hàm lượng triglycerit huyết thanh hoặc huyết tương xuống ít nhất 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, thậm chí ít nhất 50% so với mức trước khi điều trị.

Theo một loạt các phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm giảm hàm lượng triglycerit huyết thanh hoặc huyết tương xuống ít nhất là 50 mg/dl, 60 mg/dl, 70 mg/dl, 80 mg/dl, 90 mg/dl, thậm chí ít nhất là 100 mg/dl. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm giảm hàm lượng triglycerit huyết thanh hoặc huyết tương xuống ít nhất là 110 mg/dl, 120 mg/dl, 130 mg/dl, 140 mg/dl, thậm chí ít nhất là 150 mg/dl. Theo các phương án cụ thể, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm giảm hàm lượng triglycerit huyết thanh hoặc huyết tương xuống ít nhất là 160 mg/dl, 170 mg/dl, 180 mg/dl, thậm chí ít nhất là 190 mg/dl hoặc 200 mg/dl.

Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm giảm hàm lượng non-HDL-c xuống ít nhất 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, thậm chí ít nhất 10% so với mức trước khi điều trị.

Theo các phương án khác nhau, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng HDL-c lên ít nhất 1% so với mức trước khi điều trị. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian đủ để làm tăng HDL-c lên ít nhất là 2%, 3%, 4%, thậm chí ít nhất là 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, hoặc 10% so với mức trước khi điều trị.

Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm giảm tỉ lệ cholesterol toàn phần:HDL-c ("TC/HDL") xuống ít nhất là 1% so với mức trước khi điều trị. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian đủ để làm giảm tỉ lệ TC/HDL xuống ít nhất là 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, thậm chí ít nhất là 9% hoặc ít nhất là 10% so với mức trước khi điều trị.

Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm giảm hàm lượng VLDL-c xuống ít nhất là 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, hoặc ít nhất là 10% so với mức trước khi điều trị. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian đủ để làm giảm hàm lượng VLDL-c xuống ít nhất là 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, thậm chí ít nhất là 18%, 19%, hoặc 20% so với mức trước khi điều trị. Theo các phương án cụ thể, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian đủ để làm giảm hàm lượng VLDL-c xuống ít nhất là 21%, 22%, 23%, 24%, thậm chí ít nhất là 25% so với mức trước khi điều trị.

Theo nhiều phương án khác, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm giảm hàm lượng ApoCIII. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian đủ để làm giảm hàm lượng ApoCIII xuống ít nhất là 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, thậm chí ít nhất là 8%, 9% hoặc 10% so với mức trước khi điều trị.

Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng EPA huyết tương lên ít nhất là 100% so với mức trước khi điều trị. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng EPA huyết tương lên ít nhất là 200%, 250%, 300%, thậm chí ít nhất là 350%, 400%, 450% hoặc ít nhất là 500% so với mức trước khi điều trị. Trong các phương án được chọn, dược phẩm này được dùng trong thời gian và với lượng hiệu quả để làm tăng hàm lượng EPA huyết tương lên ít nhất là 550%, 600%, 650%, thậm chí ít nhất là 700% so với mức trước khi điều trị.

Theo các phương án khác nhau, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng DHA huyết tương lên ít nhất là 50% so với mức trước khi điều trị. Theo các phương án cụ thể, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng DHA huyết tương lên ít nhất là 55%,

60%, 65%, 70%, thậm chí ít nhất là 75%, 80%, 85%, hoặc 90% so với mức trước khi điều trị.

Theo một loạt các phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng DPA huyết tương lên ít nhất là 50% so với mức trước khi điều trị. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng DPA huyết tương lên ít nhất là 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, thậm chí ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 100% so với mức trước khi điều trị. Trong các phương án được chọn, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng DPA huyết tương lên ít nhất là 110%, 120%, thậm chí ít nhất là 125% so với mức trước khi điều trị.

Theo một loạt các phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm giảm nồng độ axit arachidonic (AA) trong huyết tương xuống ít nhất là 5% so với mức trước khi điều trị. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm giảm nồng độ axit arachidonic (AA) trong huyết tương xuống ít nhất là 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, thậm chí ít nhất là 11%, 12%, 13%, 14%, thậm chí ít nhất là 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, hoặc 21%, 22%, 23%, 24% thậm chí ít nhất là 25% so với mức trước khi điều trị.

Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng, và trong thời gian hiệu quả để làm giảm nồng độ axit arachidonic huyết tương xuống ít nhất là 25 µg/ml. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian đủ để làm giảm hàm lượng AA huyết tương xuống ít nhất là 50 µg/ml, 55 µg/ml, 60 µg/ml, 65 µg/ml, thậm chí ít nhất là 70 µg/ml, 75 µg/ml, 80 µg/ml, 85 µg/ml, 90 µg/ml, thậm chí ít nhất là 95 µg/ml hoặc 100 µg/ml.

Theo một số phương án, lượng hữu hiệu này là ít nhất 2g mỗi ngày. Theo các phương án khác nhau, lượng hữu hiệu này là ít nhất 3g mỗi ngày. Theo các phương án cụ thể, lượng hữu hiệu này là ít nhất 4g mỗi ngày. Theo các phương án điển hình, lượng hữu hiệu này là khoảng 2g mỗi ngày. Theo một số phương án, lượng hữu hiệu này là khoảng 4g mỗi ngày.

Theo các phương án điển hình, được phẩm này được dùng trong ít nhất 30 ngày. Theo một số phương án, được phẩm này được dùng trong ít nhất 60 ngày. Theo các phương án cụ thể, được phẩm này được dùng trong ít nhất 90 ngày, 120 ngày, 180 ngày, 240 ngày, hoặc ít nhất 360 ngày. Theo một số phương án, được phẩm này được dùng vô hạn định.

Theo một số phương án, được phẩm này được dùng hằng ngày. Theo các phương án khác, được phẩm này được dùng cách ngày.

Theo các phương án cụ thể, liều dùng hằng ngày của được phẩm này được dùng theo liều hằng ngày đơn. Theo các phương án khác, được phẩm này được dùng theo các liều chia, với liều hằng ngày được chia thành hai lần dùng, ba lần dùng, hoặc thậm chí bốn lần dùng, trong suốt cả ngày.

Theo một số phương án, được phẩm này được dùng cùng với chế độ ăn. Theo một số phương án, được phẩm này được dùng với chế độ ăn ít chất béo. Theo các phương án khác, được phẩm này không được dùng cùng với chế độ ăn. Theo một số phương án, được phẩm này được dùng trong trạng thái đói.

Theo một số phương án, các phương pháp này còn bao gồm bước dùng statin. Theo các phương án cụ thể, statin được chọn từ nhóm bao gồm: pravastatin, lovastatin, simvastatin, atorvastatin, fluvastatin, rosuvastatin, tenivastatin, và pitavastatin.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị chứng tăng triglyxerit huyết (200 - 500 mg/dl)

Theo một loạt các phương án điều trị khác, phương pháp điều trị bệnh nhân có hàm lượng triglyxerit huyết thanh hoặc huyết tương trước khi điều trị nằm trong khoảng 200 mg/dl đến 500 mg/dl được mô tả. Theo một số phương án, các bệnh nhân này đã dùng phép trị liệu statin; ở các bệnh nhân này, hàm lượng triglyxerit huyết thanh hoặc huyết tương trước khi điều trị làm hàm lượng được đo trong khi điều trị bằng statin, trước khi dùng được phẩm được mô tả trong phần chế phẩm chứa omega-3 giàu DPA ở dạng axit tự do trên đây.

Phương pháp này bao gồm bước dùng qua đường miệng một lượng hữu hiệu statin, và dùng tiếp được phẩm được mô tả trong phần chế phẩm chứa omega-3 giàu

DPA ở dạng axit tự do trong bản mô tả này, qua đường miệng, với lượng và trong thời gian đủ để làm giảm hàm lượng triglycerit huyết thanh hoặc huyết tương xuống dưới mức được đo trước khi điều trị bằng được phẩm được mô tả trong bản mô tả này. Được phẩm được mô tả trong phần chế phẩm chứa omega-3 giàu DPA ở dạng axit tự do và statin cần không thiết phải dùng đồng thời, với cùng phác đồ liều, hoặc thậm chí vào cùng ngày. Hai thuốc này được dùng trong thời gian đủ gần sao cho bệnh nhân nhận được lợi ích trị liệu đồng thời từ cả hai thuốc là đủ.

Theo một số phương án, được phẩm được mô tả trong phần chế phẩm chứa omega-3 giàu DPA ở dạng axit tự do được dùng với lượng và trong thời gian đủ để làm giảm hàm lượng triglycerit huyết thanh hoặc huyết tương xuống ít nhất là 5% so với mức trước khi điều trị. Theo các phương án khác nhau, được phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian đủ để làm giảm hàm lượng triglycerit huyết thanh hoặc huyết tương xuống ít nhất là 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, thậm chí ít nhất là 16%, 17%, 18%, 19%, hoặc ít nhất là 20% so với mức trước khi điều trị.

Theo một số phương án, được phẩm được mô tả trong phần chế phẩm chứa omega-3 giàu DPA ở dạng axit tự do trong bản mô tả này được dùng với lượng và trong thời gian đủ để làm giảm non-HDL-cholesterol xuống ít nhất 1%, ít nhất 2%, ít nhất 3%, 4%, 5%, thậm chí ít nhất là 7%, 8%, 9%, hoặc ít nhất là 10% so với mức trước khi điều trị.

Theo một loạt các phương án, được phẩm được mô tả trong phần chế phẩm chứa omega-3 giàu DPA ở dạng axit tự do trong bản mô tả này được dùng với lượng và trong thời gian đủ để làm tăng hàm lượng HDL-c lên ít nhất là 1%, 2%, 3% hoặc nhiều hơn so với mức trước khi điều trị.

Theo một số phương án, được phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng EPA huyết tương lên ít nhất là 100% so với mức trước khi điều trị. Theo một số phương án, được phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng EPA huyết tương lên ít nhất là 200%, 250%, 300%, thậm chí ít nhất là 350%, 400%, 450% hoặc ít nhất là 500% so với mức trước khi điều trị. Trong các phương án được chọn, được phẩm này được dùng trong thời gian và

với lượng hiệu quả để làm tăng hàm lượng EPA huyết tương lên ít nhất là 550%, 600%, 650%, thậm chí ít nhất là 700% so với mức trước khi điều trị.

Theo các phương án khác nhau, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng DHA huyết tương lên ít nhất là 50% so với mức trước khi điều trị. Theo các phương án cụ thể, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng DHA huyết tương lên ít nhất là 55%, 60%, 65%, 70%, thậm chí ít nhất là 75%, 80%, 85%, hoặc 90% so với mức trước khi điều trị.

Theo một loạt các phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng DPA huyết tương lên ít nhất là 50% so với mức trước khi điều trị. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng DPA huyết tương lên ít nhất là 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, thậm chí ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 100% so với mức trước khi điều trị. Trong các phương án được chọn, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng DPA huyết tương lên ít nhất là 110%, 120%, thậm chí ít nhất là 125% so với mức trước khi điều trị.

Theo một loạt các phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm giảm nồng độ axit arachidonic (AA) trong huyết tương xuống ít nhất là 5% so với mức trước khi điều trị. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm giảm nồng độ axit arachidonic (AA) trong huyết tương xuống ít nhất là 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, thậm chí ít nhất là 11%, 12%, 13%, 14%, thậm chí ít nhất là 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, hoặc 21%, 22%, 23%, 24% thậm chí ít nhất là 25% so với mức trước khi điều trị.

Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng, và trong thời gian, hiệu quả để làm giảm nồng độ axit arachidonic huyết tương xuống ít nhất là 25 µg/ml. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian đủ để làm giảm hàm lượng AA huyết tương xuống ít nhất là 50 µg/ml, 55 µg/ml, 60 µg/ml, 65 µg/ml, thậm chí ít nhất là 70 µg/ml, 75 µg/ml, 80 µg/ml, 85 µg/ml, 90 µg/ml, thậm chí ít nhất là 95 µg/ml hoặc 100 µg/ml.

Theo các phương án khác nhau, dược phẩm được mô tả trong phần chế phẩm chứa omega-3 giàu DPA ở dạng axit tự do trong bản mô tả này được dùng ở dạng liều đơn vị như được mô tả trong phần dược phẩm dạng liều trên đây.

Theo các phương án khác nhau, dược phẩm này được dùng với lượng ít nhất là 1g mỗi ngày. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng ít nhất là 2g/ngày. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng ít nhất là 3g/ngày. Theo các phương án cụ thể, dược phẩm này được dùng với lượng ít nhất là 4g/ngày. Theo các phương án điển hình, dược phẩm này được dùng với lượng khoảng 2g/ngày. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng khoảng 3g/ngày hoặc khoảng 4g mỗi ngày.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị làm tăng tỉ lệ EPA:AA huyết tương

Sáng chế còn mô tả phương pháp làm tăng tỉ lệ EPA:AA, mà không quan tâm đến hàm lượng triglycerit huyết tương của bệnh nhân trước khi điều trị. Phương pháp này bao gồm cho bệnh nhân có tỉ lệ EPA:AA thấp hơn 0,25 dùng dược phẩm được mô tả trong phần chế phẩm chứa omega-3 giàu DPA ở dạng axit tự do trong bản mô tả này, với lượng và trong thời gian đủ để làm tăng tỉ lệ EPA:AA của bệnh nhân lên ít nhất là 0,25. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian đủ để làm tăng tỉ lệ EPA:AA của bệnh nhân lên ít nhất là 0,3, ít nhất là 0,35, ít nhất là 0,40, ít nhất là 0,45, ít nhất là 0,50, thậm chí đến mức ít nhất là 0,55, 0,60, 0,61, 0,62, 0,63, 0,64, hoặc 0,65.

Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước dùng dược phẩm với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng EPA huyết tương lên ít nhất là 100% so với mức trước khi điều trị. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng EPA huyết tương lên ít nhất là 200%, 250%, 300%, thậm chí ít nhất là 350%, 400%, 450% hoặc ít nhất là 500% so với mức trước khi điều trị. Trong các phương án được chọn, dược phẩm này được dùng trong thời gian và với lượng hiệu quả để làm tăng hàm lượng EPA huyết tương lên ít nhất là 550%, 600%, 650%, thậm chí ít nhất là 700% so với mức trước khi điều trị.

Theo các phương án khác nhau, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng DHA huyết tương lên ít nhất là 50% so với mức trước khi điều trị. Theo các phương án cụ thể, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng DHA huyết tương lên ít nhất là 55%, 60%, 65%, 70%, thậm chí ít nhất là 75%, 80%, 85%, hoặc 90% so với mức trước khi điều trị.

Theo một loạt các phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng DPA huyết tương lên ít nhất là 50% so với mức trước khi điều trị. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng DPA huyết tương lên ít nhất là 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, thậm chí ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 100% so với mức trước khi điều trị. Trong các phương án được chọn, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm tăng hàm lượng DPA huyết tương lên ít nhất là 110%, 120%, thậm chí ít nhất là 125% so với mức trước khi điều trị.

Theo một loạt các phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm giảm nồng độ axit arachidonic (AA) trong huyết tương xuống ít nhất là 5% so với mức trước khi điều trị. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian hiệu quả để làm giảm nồng độ axit arachidonic (AA) trong huyết tương xuống ít nhất là 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, thậm chí ít nhất là 11%, 12%, 13%, 14%, thậm chí ít nhất là 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, hoặc 21%, 22%, 23%, 24% thậm chí ít nhất là 25% so với mức trước khi điều trị.

Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng, và trong thời gian, hiệu quả để làm giảm nồng độ axit arachidonic huyết tương xuống ít nhất là 25 µg/ml. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian đủ để làm giảm hàm lượng AA huyết tương xuống ít nhất là 50 µg/ml, 55 µg/ml, 60 µg/ml, 65 µg/ml, thậm chí ít nhất là 70 µg/ml, 75 µg/ml, 80 µg/ml, 85 µg/ml, 90 µg/ml, thậm chí ít nhất là 95 µg/ml hoặc 100 µg/ml.

Theo các phương án khác nhau, dược phẩm được mô tả trong phần chế phẩm chứa omega-3 giàu DPA ở dạng axit tự do trong bản mô tả này được dùng ở dạng liều đơn vị như được mô tả trong phần dược phẩm dạng liều trên đây.

Theo các phương án khác nhau, dược phẩm này được dùng với lượng ít nhất là 1g mỗi ngày. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng ít nhất là 2g/ngày. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng ít nhất là 3g/ngày. Theo các phương án cụ thể, dược phẩm này được dùng với lượng ít nhất là 4g/ngày. Theo các phương án điển hình, dược phẩm này được dùng với lượng khoảng 2g/ngày. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng khoảng 3g/ngày hoặc khoảng 4g mỗi ngày.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị làm giảm hàm lượng ApoCIII huyết thanh hoặc huyết tương

Sáng chế còn mô tả phương pháp làm tăng hàm lượng ApoCIII huyết thanh hoặc huyết tương của bệnh nhân, mà không quan tâm đến hàm lượng triglycerit huyết tương của bệnh nhân trước khi điều trị. Phương pháp này bao gồm cho bệnh nhân cần làm giảm hàm lượng ApoCIII dùng dược phẩm được mô tả trong phần chế phẩm chứa omega-3 giàu DPA ở dạng axit tự do trong bản mô tả này, với lượng và trong thời gian đủ để làm giảm hàm lượng ApoCIII huyết thanh hoặc huyết tương của bệnh nhân. Theo các phương án điển hình, bệnh nhân này có nguy cơ bị bệnh tim mạch.

Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian đủ để làm giảm hàm lượng ApoCIII xuống ít nhất là 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, thậm chí ít nhất là 8%, 9% hoặc 10% so với mức trước khi điều trị.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị khác

Theo một khía cạnh khác, dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng để điều trị các rối loạn khác, bao gồm một hoặc nhiều trong số bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (nonalcoholic steatohepatitis - NASH), chứng tăng lipoprotein huyết, bao gồm chứng tăng lipoprotein huyết typ III, và hội chứng chuyển hóa.

Theo một số phương án, dược phẩm này được sử dụng để làm giảm tính kháng với các chất ức chế kết tụ tiểu cầu, như Plavix, bao gồm sử dụng trong các phương pháp được mô tả trong đơn sáng chế Mỹ số 13/620,312, nội dung của nó được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ.

5.6. Quy trình

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình cải thiện để tinh chế dầu cá thành được phẩm chứa các PUFA ở dạng axit tự do, và cụ thể là để tinh chế dầu cá thành được phẩm được mô tả trong phần chế phẩm chứa omega-3 giàu DPA ở dạng axit tự do trong bản mô tả này.

Điều chế nguyên liệu trung gian

Nguyên liệu trung gian được điều chế bằng cách chuyển hóa este của dầu thân cá thu được từ cá, ví dụ, cá từ các họ Engraulidae, Clupeidae và Scombridae, bằng các kỹ thuật chuẩn đã được biết rõ trong lĩnh vực, với các thông số quy trình được điều chỉnh sao cho đạt được chế phẩm nằm trong dung sai được mô tả trong phần chế phẩm nguyên liệu trung gian ngay dưới đây.

Các bước quy trình chuẩn phù hợp được mô tả trong, ví dụ, patent Mỹ các số 5,656,667; 5,719,302; 5,945,318; 6,204,401; 6,518,049; 6,528,669; 7,491,522; 7,550,613; 7,678,930; 7,718,698; 7,732,488 và trong patent Mỹ các số 5,472,705; 5,750,572; 5,776,978; 5,869,714; 7,541,480; 7,553,870; và 7,619,002, được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Trong quy trình được nêu làm ví dụ, dầu triglyxerit thô được chiết từ cá, như cá trống, cá mòi, cá thu và cá mòi dầu. Sau đó, dầu triglyxerit thô được tinh chế bằng kiềm, ví dụ, bằng cách sử dụng natri hydroxit, và được khử mùi, làm trong, và làm khô. Sau đó, các PUFA được chuyển hóa thành este, như este metyl hoặc este etyl, bằng cách chuyển hóa este. Sự chuyển hóa este có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách etanol phân với sự có mặt của etanol và natri etoxit để tạo ra este etyl. Tiếp theo quá trình chuyển hóa este là quá trình cất ít nhất là một chu kỳ, thường là nhiều chu kỳ.

Theo quy trình được nêu làm ví dụ khác, dầu triglyxerit được tinh chế bằng kiềm và khử mùi, chuyển hóa este với etanol, như bằng cách etanol phân với sự có mặt của etanol và natri etoxit, và sau đó đưa vào một hoặc nhiều chu kỳ cất phân đoạn.

Fig.2 là sơ đồ thể hiện quy trình được nêu làm ví dụ để sản xuất nguyên liệu trung gian. Trong quy trình này, cá được luộc trong nước và hỗn hợp lỏng và rắn thu được

được lọc và phần chất lỏng được ly tâm để loại pha nước. Phần dầu còn lại từ bước nêu trên được xử lý bằng kiềm để trung hòa axit béo tự do bất kì có mặt, tiếp theo rửa bằng nước. Sau đó, dầu cá đã được tinh chế bằng kiềm ở dạng triglyxerit được khử mùi và các chất ô nhiễm môi trường được khử, ví dụ, bằng cách cất. Dầu cá khô đã khử mùi được chuyển hóa thành dạng este etyl bằng cách phản ứng với etanol, được xúc tác bởi natri etoxit. Sau khi hoàn thành phản ứng, etanol dư được loại bỏ bằng cách cất và este etyl được rửa bằng dung dịch axit xitric và sau đó bằng nước. Trong quy trình được nêu làm ví dụ này, este etyl được cất để đạt được nồng độ este etyl EPA (EPA-EE) và este etyl DHA (DHA-EE) cần thiết để sử dụng làm nguyên liệu trung gian. Theo một số phương án, nhiều chu kỳ cất được thực hiện. Các điều kiện chính xác được sử dụng được điều chỉnh tùy thuộc vào thành phần của chế phẩm este etyl đầu vào để đạt được nồng độ EPA-EE và DHA-EE cần thiết để làm nguyên liệu trung gian, như được mô tả chi tiết trong phần chế phẩm nguyên liệu trung gian ngay dưới đây.

Các bước thay thế các bước quy trình này là đã biết, và có thể được sử dụng thích hợp miễn là chế phẩm nguyên liệu trung gian thu được nằm trong dung sai được xác định trong phần chế phẩm nguyên liệu trung gian ngay dưới đây.

Chế phẩm nguyên liệu trung gian

Các phương án điển hình

Chế phẩm nguyên liệu trung gian chứa nhiều loại PUFA omega-3, mỗi loại hầu hết ở dạng este etyl.

Chế phẩm nguyên liệu trung gian chứa EPA, DHA, và DPA, mỗi loại hầu hết ở dạng este etyl.

Theo các phương án khác nhau, chế phẩm nguyên liệu trung gian chứa este etyl EPA (EPA-EE), DHA-EE, và DPA-EE, với lượng, được tính theo tỉ lệ phần trăm diện tích trên sắc ký đồ GC của tất cả các este etyl của axit béo trong chế phẩm, nằm trong khoảng từ -3SD đến +3SD của các giá trị trung bình được nêu tương ứng trong Bảng 9. Theo một số phương án, mỗi trong số EPA-EE, DHA-EE, và DPA-EE nằm trong khoảng từ -2SD đến +2SD của giá trị trung bình được nêu tương ứng. Theo một số phương án, mỗi trong số EPA-EE, DHA-EE, và DPA-EE nằm trong khoảng từ -1SD đến +1SD của

giá trị trung bình được nêu tương ứng. Theo một số phương án, chế phẩm nguyên liệu trung gian chứa EPA-EE, DHA-EE, và DPA-EE nằm trong phạm vi được thiết đặt bởi tỉ lệ phần trăm giữa diện tích tối thiểu và tối đa tương ứng của chúng trong số các mẽ được mô tả trong Bảng 8.

Theo một số phương án, chế phẩm này còn chứa một hoặc nhiều axit béo đa bất bão hòa omega-3, mỗi loại hầu hết ở dạng este etyl, được chọn từ nhóm bao gồm: axit α -linolenic (C18:3 n-3), axit moroctic (C18:4 n-3), axit eicosatrienoic (C20:3 n-3), axit eicosatetraenoic (C20:4 n-3), và axit heneicosapentaenoic (C21:5 n-3). Theo các phương án khác nhau, một hoặc nhiều loại omega-3-EE khác, nếu có, có mặt với lượng, được tính theo tỉ lệ phần trăm diện tích trên sắc ký đồ GC của tất cả các este etyl của axit béo trong chế phẩm, nằm trong khoảng từ -3SD đến +3SD của các giá trị trung bình được nêu tương ứng trong Bảng 9. Theo một số phương án, mỗi loại này nằm trong khoảng từ -2SD đến +2SD của giá trị trung bình được nêu tương ứng. Theo một số phương án, mỗi loại này nằm trong khoảng từ -1SD đến +1SD của giá trị trung bình được nêu tương ứng. Theo một số phương án, một hoặc nhiều loại omega-3-EE khác, nếu có, có mặt với lượng, được tính theo tỉ lệ phần trăm diện tích trên sắc ký đồ GC của tất cả các este etyl của axit béo trong chế phẩm, nằm trong khoảng được thiết đặt bởi tỉ lệ phần trăm giữa diện tích tối thiểu và tối đa tương ứng của chúng trong số các mẽ được mô tả trong Bảng 8.

Theo một số phương án, chế phẩm nguyên liệu trung gian này còn chứa ít nhất một loại của PUFA omega-6. Theo các phương án khác nhau, chế phẩm chứa este etyl của một hoặc nhiều axit béo đa bất bão hòa omega-6 được chọn từ nhóm bao gồm: axit linoleic (C18:2 n-6), axit gamma-linolenic (C18:3 n-6), axit eicosadienoic (C20:3 n-6), axit dihomogamma-linolenic ("DGLA") (C20:3 n-6), axit arachidonic (C20:4 n-6) ("AA"), và axit docosapentaenoic (C22:5 n-6). Mỗi loại PUFA omega-6 hầu hết ở dạng este etyl.

Theo các phương án khác nhau, một hoặc nhiều loại omega-6-EE, nếu có, có mặt với lượng, tính được theo tỉ lệ phần trăm diện tích trên sắc ký đồ GC của tất cả các este etyl của axit béo trong chế phẩm, nằm trong khoảng từ -3SD đến +3SD của các giá trị trung bình được nêu tương ứng trong Bảng 9. Theo một số phương án, mỗi loại này nằm

trong khoảng từ -2SD đến +2SD của giá trị trung bình được nêu tương ứng. Theo một số phương án, mỗi loại này nằm trong khoảng từ -1SD đến +1SD của giá trị trung bình được nêu tương ứng. Theo một số phương án, một hoặc nhiều loại omega-3-EE khác, nếu có, có mặt với lượng, được tính theo tỉ lệ phần trăm diện tích trên sắc ký đồ GC của tất cả các este etyl của axit béo trong chế phẩm, nằm trong khoảng được thiết đặt bởi tỉ lệ phần trăm giữa diện tích tối thiểu và tối đa tương ứng của chúng trong số các mẽ được mô tả trong Bảng 8.

Các phương án bổ sung

Theo các phương án bổ sung khác nhau, chế phẩm nguyên liệu trung gian chứa este etyl EPA (EPA-EE) với lượng, được tính theo tỉ lệ phần trăm diện tích trên sắc ký đồ GC của tất cả các este etyl của axit béo trong chế phẩm, nằm trong khoảng từ 45,0 - 53,0% (a/a). Theo một số phương án, EPA-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 48,40 - 50,04% (a/a). Theo các phương án khác nhau, EPA-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 48,67 - 49,77% (a/a). Theo một số phương án, chế phẩm nguyên liệu trung gian chứa EPA-EE với lượng nằm trong khoảng từ 48,95 - 49,49% (a/a). Theo một số phương án, chế phẩm nguyên liệu trung gian chứa EPA-EE với lượng khoảng 49,22% (a/a).

Theo các phương án khác nhau, EPA-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 44,20% (a/a) - 46,92% (a/a). Theo một số phương án, EPA-EE có mặt với lượng khoảng 45,56% (a/a).

Theo các phương án khác nhau, EPA-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng 425 - 460 mg/g.

Theo các phương án bổ sung khác nhau, chế phẩm nguyên liệu trung gian chứa este etyl DHA (DHA-EE) với lượng, được tính theo tỉ lệ phần trăm diện tích trên sắc ký đồ GC của tất cả các este etyl của axit béo trong chế phẩm, nằm trong khoảng 13,0 - 20,0% (a/a). Theo các phương án khác nhau, DHA-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng 16,43 - 18,28% (a/a). Theo các phương án khác nhau, nguyên liệu này chứa DHA-EE với lượng nằm trong khoảng 16,74 - 17,98% (a/a). Theo một số phương án, chế phẩm nguyên liệu trung gian này chứa DHA-EE với lượng nằm trong khoảng

17,05% - 17,67% (a/a). Theo một số phương án, nguyên liệu trung gian này chứa DHA-EE với lượng khoảng 17,4% (a/a).

Theo một số phương án, nguyên liệu trung gian này chứa DHA với lượng nằm trong khoảng 14,77% (a/a) - 17,87% (a/a). Theo một số phương án, nguyên liệu trung gian này chứa DHA với lượng khoảng 16,32% (a/a).

Theo một số phương án, nguyên liệu trung gian này chứa DHA với lượng nằm trong khoảng 150 - 170 mg/g.

Theo các phương án bổ sung khác nhau, DPA-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng 4,10 đến 6,74% (a/a). Theo một số phương án, DPA-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng 4,54 đến 6,30% (a/a). Theo các phương án khác nhau, DPA-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng 4,98 đến 5,86% (a/a). Theo một số phương án, DPA-EE có mặt với lượng khoảng 5,42% (a/a).

Theo các phương án khác nhau, DPA-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,41 đến 0,70% (a/a). Theo một số phương án, DPA-EE có mặt với lượng khoảng 0,56% (a/a).

Theo các phương án khác nhau, chế phẩm nguyên liệu trung gian này còn chứa este etyl của axit arachidonic ($C_{20:4}$ n-6). Theo các phương án khác nhau, AA-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng 1,72 đến 2,81% (a/a). Theo một số phương án, axit arachidonic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng 1,9 đến 2,63% (a/a). Theo các phương án khác nhau, axit arachidonic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng 2,09 đến 2,45% (a/a). Theo một số phương án, axit arachidonic-EE có mặt với lượng khoảng 2,27% (a/a).

Theo một số phương án, axit arachidonic-EE có mặt với lượng không quá 3,0% (a/a). Theo một số phương án, axit arachidonic-EE có mặt với lượng không quá 4,0% (a/a).

Trong các phương án mà nguyên liệu trung gian còn chứa este etyl của axit α -linolenic, theo một số phương án, axit α -linolenic-EE, có mặt với lượng nằm trong

khoảng 0,3 - 0,45% (a/a). Theo một số phương án, axit α -linolenic-EE có mặt với lượng khoảng 0,4% (a/a).

Theo một số phương án, axit α -linolenic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,24% (a/a) - 0,62% (a/a).

Theo một số phương án, axit α -linolenic-EE có mặt với lượng khoảng 0,43% (a/a).

Trong một số phương án mà nguyên liệu trung gian còn chứa este etyl của axit moroctic (C18:4 n-3), axit moroctic-EE có mặt với lượng, được tính theo tỉ lệ phần trăm diện tích trên sắc ký đồ GC của tất cả các este etyl của axit béo trong chế phẩm, nằm trong khoảng 0,60 - 2,03% (a/a). Theo một số phương án, axit moroctic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,84 đến 1,80% (a/a). Theo các phương án khác nhau, axit moroctic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng 1,10 đến 1,60% (a/a). Theo các phương án cụ thể, axit moroctic-EE có mặt với lượng khoảng 1,32% (a/a).

Theo các phương án khác nhau, axit moroctic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng 0,64% đến 1,93% (a/a). Theo các phương án cụ thể, axit moroctic-EE có mặt với lượng khoảng 1,28% (a/a).

Trong nhiều phương án mà nguyên liệu trung gian còn chứa este etyl của axit eicosatrienoic (C20:3 n-3), axit eicosatrienoic-EE có mặt với lượng nhỏ hơn 0,1% (a/a). Theo một số phương án, axit eicosatrienoic-EE có mặt với lượng nhỏ hơn 0,4% (a/a).

Trong các phương án mà nguyên liệu trung gian còn chứa este etyl của axit eicosatetraenoic (C20:4 n-3), theo một số phương án, axit eicosatetraenoic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 1,57 đến 2,10% (a/a). Theo một số phương án, axit eicosatetraenoic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 1,66 đến 2,02% (a/a). Theo một số phương án, axit eicosatetraenoic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 1,75 đến 1,93% (a/a). Theo các phương án cụ thể, axit eicosatetraenoic-EE có mặt với lượng khoảng 1,84% (a/a).

Theo một số phương án, axit eicosatetraenoic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 1,42 đến 2,49% (a/a). Theo một số phương án, axit eicosatetraenoic-EE có mặt với lượng khoảng 1,95% (a/a).

Trong nhiều phương án khác mà nguyên liệu trung gian còn chứa este etyl của axit heneicosapentaenoic (C21:5 n-3), axit heneicosapentaenoic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 2,25 đến 2,36% (a/a). Theo các phương án khác nhau, axit heneicosapentaenoic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng 2,27 - 2,34% (a/a). Theo một số phương án, axit heneicosapentaenoic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 2,29 đến 2,32% (a/a). Theo các phương án cụ thể, axit heneicosapentaenoic-EE có mặt với lượng khoảng 2,31% (a/a).

Theo một số phương án, axit heneicosapentaenoic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 1,42 đến 2,76% (a/a). Theo các phương án cụ thể, axit heneicosapentaenoic-EE có mặt với lượng khoảng 2,09% (a/a).

Trong một loạt các phương án mà nguyên liệu trung gian còn chứa este etyl của PUFA omega-6, axit linoleic (C18:2 n-6), axit linoleic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,53 đến 0,56% (a/a). Theo một số phương án, axit linoleic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,53 đến 0,55% (a/a). Theo một số phương án, axit linoleic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,54 đến 0,55% (a/a). Theo một số phương án, axit linoleic-EE có mặt với lượng khoảng 0,54% (a/a).

Theo một số phương án, axit linoleic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,38 đến 0,83% (a/a). Theo một số phương án, axit linoleic-EE có mặt với lượng khoảng 0,60% (a/a).

Trong các phương án mà nguyên liệu trung gian còn chứa este etyl của axit gamma-linolenic (C18:3 n-6), theo các phương án ví dụ, axit gamma-linolenic-EE có mặt với lượng nhỏ hơn 0,1% (a/a). Trong các phương án mà nguyên liệu trung gian còn chứa este etyl của axit gamma-linolenic (C18:3 n-6), axit gamma-linolenic-EE có mặt với lượng nhỏ hơn 0,4% (a/a).

Trong các phương án mà nguyên liệu trung gian còn chứa este etyl của axit eicosadienoic (C20:2 n-6), theo các phương án ví dụ khác nhau, axit eicosadienoic-EE có

mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,00 đến 0,63% (a/a). Theo một số phương án, axit eicosadienoic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,00 đến 0,45% (a/a). Theo một số phương án, axit eicosadienoic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,00 đến 0,27% (a/a). Theo các phương án cụ thể, axit eicosadienoic-EE có mặt với lượng khoảng 0,09% (a/a).

Theo một số phương án, axit eicosadienoic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,00 đến 0,54% (a/a). Theo các phương án cụ thể, axit eicosadienoic-EE có mặt với lượng khoảng 0,25% (a/a).

Trong nhiều phương án mà nguyên liệu trung gian còn chứa este etyl của axit dihomogamma-linolenic (C20:3 n-6), DGLA-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,35 đến 0,68% (a/a). Theo một số phương án, axit dihomogamma-linolenic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,41 đến 0,63% (a/a). Theo một số phương án, axit dihomogamma-linolenic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,46 đến 0,57% (a/a).

Theo một số phương án, axit dihomogamma-linolenic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,26 đến 0,55% (a/a). Theo một số phương án, axit dihomogamma-linolenic-EE có mặt với lượng khoảng 0,40% (a/a).

Theo một số phương án bổ sung, nguyên liệu trung gian còn chứa axit docosapentaenoic (C22:5 n-6), dưới dạng este etyl. Theo nhiều phương án khác nhau, axit docosapentaenoic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,54 đến 0,80% (a/a). Theo một số phương án, axit docosapentaenoic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,59% đến 0,76% (a/a). Theo các phương án khác nhau, axit docosapentaenoic-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,63% đến 0,72% (a/a). Theo các phương án cụ thể, axit docosapentaenoic-EE có mặt với lượng khoảng 0,67% (a/a).

Theo một số phương án, axit docosapentaenoic (C22:5 n-6)-EE có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 1,45% đến 7,21% (a/a). Theo một số phương án, axit docosapentaenoic (C22:5 n-6)-EE có mặt với lượng khoảng 4,33% (a/a).

5.6.3. Tạo phức ure

Nguyên liệu trung gian đã chuyển hóa este có thành phần như được xác định trên đây được đem tạo phức thể bao ure. Theo các phương án điển hình, một lượng ure được sử dụng để tạo phức nằm trong khoảng được xác định theo công thức.

Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình cải thiện để tinh chế dầu cá thành được phẩm chứa các PUFA ở dạng axit tự do, cụ thể là để tinh chế dầu cá thành được phẩm được mô tả trong bản mô tả này. Sự cải thiện bao gồm đưa nguyên liệu trung gian là dầu cá đã chuyển hóa este chứa các este etyl của các loại PUFA omega-3 và omega-6 khác nhau ở khoảng tỉ lệ phần trăm đã định vào bước tạo phức thể bao ure, trong đó một lượng ure được sử dụng để tạo phức là nằm trong khoảng được tính theo (i) công thức I(a), hoặc (ii) theo công thức I(b), hoặc (iii) theo cả hai công thức I(a) và công thức I(b) với lượng ure được thiết đặt ở giá trị nằm trong phạm vi được thiết đặt bởi, và bao gồm, các kết quả của công thức I(a) và I(b), như giá trị trung bình của chúng, trong đó các công thức này là như sau:

$$[\text{Ure}] = F_{\text{giàu DHA}} * ((\text{DHA}_{\text{đích}} - \text{DHA-EE}_{\text{đầu vào}}) / \text{DHA-EE}_{\text{đầu vào}})) \text{ (Ia)}$$

$$[\text{Ure}] = F_{\text{giàu EPA}} * ((\text{EPA}_{\text{đích}} - \text{EPA-EE}_{\text{đầu vào}}) / \text{EPA-EE}_{\text{đầu vào}})) \text{ (Ib)}.$$

Các giá trị đích DHA và EPA được chọn dựa trên chế phẩm cuối mong muốn. Các yếu tố làm giàu, $F_{\text{giàu DHA}}$ và $F_{\text{giàu EPA}}$, có thể giống hoặc khác nhau. Theo phương án điển hình, $F_{\text{giàu DHA}}$ và $F_{\text{giàu EPA}}$ là giống nhau, với giá trị khoảng 100/0,34, hoặc khoảng 300.

Bằng cách sử dụng một lượng ure được xác định theo công thức, việc tạo phức được thực hiện theo các kỹ thuật chuẩn. Xem, ví dụ, patent Mỹ các số 4,377,526; 5,106,542; 5,243,046; 5,679,809; 5,945,318; 6,528,669; 6,664,405; 7,541,480; 7,709,668; và 8,003,813, nội dung của chúng được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Theo các phương án ví dụ, nguyên liệu trung gian này được trộn với dung dịch chứa ure trong etanol. Việc tạo phức được thực hiện ở nhiệt độ 60°C - 80°C, sau đó, hỗn hợp này được để nguội, rồi lọc hoặc ly tâm để loại bỏ các phức ure. Etanol được loại bỏ bằng cách cất và dầu được rửa vài lần bằng nước.

Hoàn thành sau tạo phức

Sau khi loại bỏ các phức ure, các este PUFA không được tạo phức được thủy phân thành các axit béo tự do bằng các kỹ thuật chuẩn. Chế phẩm này còn được tinh chế bằng cách cất, trước hoặc sau khi thủy phân, và hoàn thành tiếp bằng cách sử dụng một hoặc nhiều các kỹ thuật chuẩn sau đây: xử lý bằng than hoạt tính, tinh chế bằng sắc ký, loại bỏ dung môi, làm mất màu, ví dụ, bằng đất tẩy màu, và chiết tách siêu tới hạn. Các chất chống oxy hóa, như BHA hoặc α -tocopherol, được bổ sung.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Việc tạo phức ure là cần thiết cho việc sản xuất đảm bảo chế phẩm chứa PUFA omega-3 ở dạng axit tự do đáp ứng các yêu cầu đặc điểm kỹ thuật

Việc tạo phức thể bao ure (tạo hợp chất thể bao) là bước chuẩn thường được sử dụng trong việc tinh chế dầu cá để loại bỏ các axit béo mạch dài bão hòa và đơn bất bão hòa, do đó, làm giàu các axit béo đa bất bão hòa omega-3 mạch dài mong muốn trong chế phẩm thu được. Tuy nhiên, dù sử dụng trong thời gian dài (xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,377,526), và các nghiên cứu được thiết kế để mô tả ảnh hưởng của các thông số sinh hóa khác nhau lên quy trình (xem, ví dụ, Hayes et al., “Triangular Phase Diagrams To Predict The Fractionation Of Free Fatty Acid Mixtures Via Urea Complex Formation,” Separation Sci. Technol. 36(1):45–58 (2001) và Hayes, “Purification of Free Fatty Acids via Urea Inclusion Compounds,” in Handbook of Functional Lipids (Taylor & Francis Group) (2005)), độ giàu mà việc tạo phức ure tạo ra đối với từng loại axit béo đa bất bão hòa mạch dài, bao gồm cả hai loại PUFA omega-3, và PUFA omega-6, vẫn không thể dự đoán được. Phần dư không dự đoán được trong quá trình tạo phức ure này, và tiềm năng tạo phức ure để tạo ra etyl carbamat ở mức cao không cho phép, điều này bắt buộc phải xử lý thêm, ban đầu cản trở đối với việc loại bỏ tạo phức ure từ quy trình tinh chế ở quy mô thương mại được sử dụng để tạo ra được phẩm chứa PUFA omega-3 ở dạng axit tự do đáp ứng các đặc tính nêu trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1 Đặc tính đích ban đầu	
Thông số (tất cả các loại có mặt ở dạng axit tự do)	Giới hạn đặc tính
EPA	50,0-60,0% (m/m)

Bảng 1 Đặc tính đích ban đầu	
Thông số (tất cả các loại có mặt ở dạng axit tự do)	Giới hạn đặc tính
DHA	15,0-25,0% (m/m)
EPA + DHA	70,0-80,0% (m/m)
Tổng số các axit béo omega-3	80,0-90,0% (m/m)
Axit arachidonic	nmmt 4,5% (a/a)
Các axit béo bão hòa	nmmt 3,0% (a/a)
Các axit béo đơn bất bão hòa	nmmt 5,0% (a/a)
Các axit béo omega-6	nmmt 10,0% (a/a)
Các axit béo bất bão hòa khác	nmmt 5,0% (a/a)
Tổng số các chất chưa xác định được trên 0,1%	nmmt 2,0% (a/a)

"(m/m)" -- tỉ lệ phần trăm tính theo trọng lượng của tất cả các axit béo trong chế phẩm

"(a/a)" -- tỉ lệ phần trăm tính theo diện tích trên sắc ký đồ khí của tất cả các axit béo trong chế phẩm

"nmmt" -- "no more than" ("không quá").

Tuy nhiên, các nỗ lực trước đây để phát triển quy trình không dùng ure đã thể hiện rằng các quy trình này không thể sản xuất một cách tin cậy được phẩm trên quy mô thương mại đáp ứng các đặc tính chế phẩm đích cần thiết. Bảng 2 dưới đây thể hiện dữ liệu trên hai lô như vậy. Các giá trị nằm ngoài khoảng đặc tính mong muốn được gạch dưới.

Bảng 2					
		Mê 1 (không được đồng hóa)		Mê 2 (được đồng hóa)	
Thông số (tất cả các loại có mặt ở dạng axit tự do)	Giới hạn đặc tính	(m/m)	(a/a)	(m/m)	(a/a)
EPA	50,0-60,0% (m/m)	<u>49,0</u>	51,5	<u>49,8</u>	53,0
DHA	15,0-25,0% (m/m)	19,6	20,3	19,6	20,9
EPA + DHA	70,0-80,0% (m/m)	<u>68,3</u>	71,8	<u>69,4</u>	73,9
Tổng số các axit béo omega-3	80,0-90,0% (m/m)	<u>78,0</u>	81,2	<u>79,3</u>	83,7
Axit arachidonic	nmmt 4,5% (a/a)	2,8	2,8	2,9	2,8
Các axit béo bão hòa	nmmt 3,0% (a/a)	1,9	2,6	0,6	0,5
Các axit béo đơn bất bão hòa	nmmt 5,0% (a/a)	<u>6,6</u>	5,1	<u>6,7</u>	5,1
Các axit béo omega-6	nmmt 10,0% (a/a)	4,2	5,3	4,3	5,2
Các axit béo bất bão hòa khác	nmmt 5,0% (a/a)	2,7	0,3	2,1	0,4
Tổng số các chất chưa xác định	nmmt 2,0% (a/a)	<u>5,4</u>	<u>5,5</u>	<u>6,3</u>	<u>5,4</u>

Bảng 2					
		Mê 1 (không được đông hóa)		Mê 2 (được đông hóa)	
Thông số (tất cả các loại có mặt ở dạng axit tự do)	Giới hạn đặc tính	(m/m)	(a/a)	(m/m)	(a/a)
được trên 0,1%					

Do đó, quy trình sử dụng việc tạo phức ure được tìm ra, và quy trình này phát hiện ra rằng việc kiểm soát chế phẩm nghiêm ngặt đối với các loại PUFA có mặt trong nguyên liệu trung gian este etyl, được kết hợp với việc sử dụng một lượng ure nằm trong khoảng được thiết lập bằng công thức, có thể chắc chắn thu được được phẩm đáp ứng các đặc tính được nêu trong bảng 1 mà không vượt quá các giới hạn etyl carbamat chấp nhận được.

Các yêu cầu chế phẩm đối với nguyên liệu trung gian este etyl được thể hiện trong phần chế phẩm nguyên liệu trung gian và các ví dụ 2 và 4. Xem các bảng 3 - 6, 8 - 9.

Một lượng ure tối ưu cần thiết để sử dụng được tìm thấy là xác định được bằng (i) công thức I(a), hoặc (ii) theo công thức I(b), hoặc (iii) theo cả hai công thức I(a) và công thức I(b), với lượng ure được thiết đặt ở giá trị nằm trong khoảng được thiết đặt bởi, và gồm cả, các kết quả của công thức I(a) và I(b), như giá trị trung bình của hai kết quả, trong đó các công thức là như sau:

$$[\text{Ure}] = F_{\text{giàu DHA}} * ((\text{DHA}_{\text{đích}} - \text{DHA-EE}_{\text{đầu vào}}) / \text{DHA-EE}_{\text{đầu vào}}) \quad (\text{Ia})$$

$$[\text{Ure}] = F_{\text{giàu EPA}} * ((\text{EPA}_{\text{đích}} - \text{EPA-EE}_{\text{đầu vào}}) / \text{EPA-EE}_{\text{đầu vào}}) \quad (\text{Ib}).$$

Các yếu tố làm giàu, $F_{\text{giàu DHA}}$ và $F_{\text{giàu EPA}}$, có thể giống hoặc khác nhau. Giá trị điển hình, bằng cách sử dụng mỡ nguyên liệu trung gian được mô tả trong các ví dụ 2 và 4, đã được tìm thấy là khoảng 100/0,34 (tức là, khoảng 300) cho cả hai.

Ví dụ 2: Phân tích chế phẩm của bốn mẻ sản xuất được nêu làm ví dụ được tạo ra bằng cách sử dụng việc tạo phức ure được kiểm soát xác nhận rằng các yêu cầu đặc tính được đáp ứng

Bốn mẻ sản xuất được nêu làm ví dụ của axit béo đa bất bão hòa ở dạng axit tự do được chuẩn bị. Việc kiểm soát chế phẩm nghiêm ngặt được áp dụng cho nguyên liệu trung gian este etyl, chỉ sử dụng mỡ sản phẩm trong đó loại axit béo đa bất bão hòa xác

định nằm trong khoảng giới hạn đã định. Các lượng ure được sử dụng để tạo phức ở quy mô sản xuất đầu tiên được xác định thực tế ở quy mô phòng thí nghiệm, sử dụng các mẻ nguyên liệu trung gian este etyl thử nghiệm nhỏ và thay đổi nồng độ ure, từ đó thay đổi tỉ lệ dầu:ure:etanol. Nồng độ tối ưu được gợi ý bởi việc xác định ở quy mô thử nghiệm được xác nhận là nằm trong khoảng yêu cầu bởi công thức được mô tả trong ví dụ 1, và được sử dụng để sản xuất ở quy mô sản xuất.

Chế phẩm nguyên liệu trung gian đã chuyển hóa este và được phẩm cuối ("được chất", hoặc "API" (active pharmaceutical ingredient)), được xác định bằng sắc ký khí. Các kết quả được tập hợp trong các bảng 3 - 6 dưới đây.

Bảng 3				
Loại PUFA		Nguyên liệu trung gian	API	
(tên thông thường)	(đặc điểm nhận dạng)	(este etyl đã chuyển hóa (% a/a))	(chế phẩm chứa axit béo tự do cuối) (% a/a)	
axit linoleic	18:2 n-6	0,54	0,55	
axit gama-linolenic	18:3 n-6	0,00	0,15	
axit α -linolenic	18:3 n-3	0,45	0,39	
axit moroctic	18:4 n-3	1,52	1,70	
axit eicosadienoic	20:2 n-6	0,00	0,10	
axit dihomogama-linolenic	20:3 n-6	0,47	0,35	
axit arachidonic (AA)	20:4 n-6	2,11	2,43	
axit eicosatrienoic	20:3 n-3	0,00	0,15	
axit eicosatetraenoic	20:4 n-3	1,78	2,18	
axit eicosapentaenoic (EPA)	20:5 n-3	49,42	57,25	
axit heneicosapentaenoic	21:5 n-3	2,32	2,79	
axit docosapentaenoic	22:5 n-6	0,71	0,83	
axit docosapentaenoic (DPA)	22:5 n-3	5,80	6,23	
axit docosahexaenoic (DHA)	22:6 n-3	17,09	19,58	
Tập hợp số đo				
	Tổng số %	99,41	98,43	
	PUFA %	82,77	96,30	
	Tổng số omega 3	78,37	90,26	

Bảng 3				
Loại PUFA		Nguyên liệu trung gian		API
(tên thông thường)	(đặc điểm nhận dạng)	(este etyl đã chuyển hóa (% a/a))	(chế phẩm chứa axit béo tự do cuối) (% a/a)	
	Tổng số omega 6	3,83	4,41	
	Các PUFA còn lại	0,57	1,63	
	Các chất bão hòa %	4,34	0,35	
	Các chất đơn bất bão hòa %	12,30	1,34	
	Các chất chưa biết %	0,60	0,42	

Bảng 4				
Loại PUFA		Nguyên liệu trung gian	API	(chế phẩm chứa axit béo tự do cuối) (% a/a)
(tên thông thường)	(đặc điểm nhận diện)			
axit linoleic	18:2 n-6	0,54	0,49	
axit gama-linolenic	18:3 n-6	0,00	0,14	
axit α -linolenic	18:3 n-3	0,45	0,34	
axit moroctic	18:4 n-3	1,52	1,67	
axit eicosadienoic	20:2 n-6	0,00	0,13	
axit dihomogama-linolenic	20:3 n-6	0,47	0,39	
axit arachidonic (AA)	20:4 n-6	2,11	2,45	
axit eicosatrienoic	20:3 n-3	0,00	0,25	
axit eicosatetraenoic	20:4 n-3	1,78	2,02	
axit eicosapentaenoic (EPA)	20:5 n-3	49,42	57,64	
axit heneicosapentaenoic	21:5 n-3	2,32	2,75	
axit docosapentaenoic	22:5 n-6	0,71	0,79	
axit docosapentaenoic (DPA)	22:5 n-3	5,80	6,22	
axit docosahexaenoic (DHA)	22:6 n-3	17,09	19,65	
Tập hợp số đo				
	Tổng số %	99,41	98,60	

Bảng 4			
Loại PUFA		Nguyên liệu trung gian	API
(tên thông thường)	(đặc điểm nhận diện)	(este etyl đã chuyển hóa) (% a/a)	(ché phẩm chứa axit béo tự do cuối) (% a/a)
	PUFA %	82,77	96,35
	Tổng số omega 3	78,37	90,54
	Tổng số omega 6	3,83	4,38
	Các PUFA còn lại	0,57	1,43
	Các chất bão hòa %	4,34	0,31
	Các chất đơn bất bão hòa %	12,30	1,25
	Các chất chưa biết %	0,60	0,69

Bảng 5				
Loại PUFA		Nguyên liệu trung gian		API
(tên thông thường)	(đặc điểm nhận diện)	(este etyl đã chuyển hóa (% a/a))	(chế phẩm chứa axit béo tự do cuối)	(% a/a)
axit linoleic	18:2 n-6	0,54	0,59	
axit gama-linolenic	18:3 n-6	0,00	0,12	
axit α -linolenic	18:3 n-3	0,38	0,38	
axit morotic	18:4 n-3	1,09	1,16	
axit eicosadienoic	20:2 n-6	0,00	0,12	
axit dihomogama-linolenic	20:3 n-6	0,57	0,45	
axit arachidonic	20:4 n-6	2,42	2,84	
axit eicosatrienoic	20:3 n-3	0,00	0,22	
axit eicosatetraenoic	20:4 n-3	1,97	2,11	
axit eicosapentaenoic (EPA)	20:5 n-3	49,20	55,81	
axit heneicosapentaenoic	21:5 n-3	2,30	2,72	
axit docosapentaenoic	22:5 n-6	0,64	0,13	
axit docosapentaenoic (DPA)	22:5 n-3	5,06	5,46	
axit docosahexaenoic (DHA)	22:6 n-3	17,64	19,45	
Tập hợp số đo				
	Tổng số %	99,60	98,76	

Bảng 5				
Loại PUFA		Nguyên liệu trung gian	API	
(tên thông thường)	(đặc điểm nhận diện)	(este etyl đã chuyển hóa este) (% a/a)	(chế phẩm chứa axit béo tự do cuối) (% a/a)	
	PUFA %	82,48	93,77	
	Tổng số omega 3	77,64	87,31	
	Tổng số omega 6	4,36	4,24	
	Các PUFA còn lại	0,48	2,22	
	Các chất bão hòa %	5,15	0,24	
	Các chất đơn bất bão hòa %	11,98	2,97	
	Các chất chưa biết %	0,40	1,79	

Bảng 6				
Loại PUFA		Nguyên liệu trung gian		API
(tên thông thường)	(đặc điểm nhận diện)	(este etyl đã chuyển hóa este) (% a/a)	(chế phẩm chứa axit béo tự do cuối) (% a/a)	
axit linoleic	18:2 n-6	0,55	0,55	
axit gama-linolenic	18:3 n-6	0,00	0,12	
axit α -linolenic	18:3 n-3	0,38	0,37	
axit morotic	18:4 n-3	1,13	1,26	
axit eicosadienoic	20:2 n-6	0,36	0,00	
axit dihomogama-linolenic	20:3 n-6	0,56	0,42	
axit arachidonic (AA)	20:4 n-6	2,43	2,86	
axit eicosatrienoic	20:3 n-3	0,00	0,16	
axit eicosatetraenoic	20:4 n-3	1,82	2,09	
axit eicosapentaenoic (EPA)	20:5 n-3	48,84	57,08	
axit heneicosapentaenoic	21:5 n-3	2,28	2,78	
axit docosapentaenoic	22:5 n-6	0,63	0,10	
axit docosapentaenoic (DPA)	22:5 n-3	5,02	5,49	
axit docosahexaenoic (DHA)	22:6 n-3	17,61	20,00	
Tập hợp số đo				
	Tổng số %	99,49	98,74	

Bảng 6			
Loại PUFA		Nguyên liệu trung gian	API
(tên thông thường)	(đặc điểm nhận diện)	(este etyl đã chuyển hóa este) (% a/a)	(chế phẩm chứa axit béo tự do cuối) (% a/a)
	PUFA %	82,11	94,94
	Tổng số omega 3	77,09	89,22
	Tổng số omega 6	4,53	4,05
	Các PUFA còn lại	0,49	1,67
	Các chất bão hòa %	5,42	0,40
	Các chất đơn bất bão hòa %	11,96	1,57
	Các chất chưa biết %	0,51	1,84

Tất cả bốn mẻ sản xuất của API đáp ứng các đặc tính chế phẩm được nêu trong Bảng 1, trên đây.

Ví dụ 3: Việc tạo phức ure có kiểm soát làm giàu một cách khác biệt các loại omega-3 và omega-6 được chọn

Như mong đợi, bước tạo phức ure làm giảm hầu hết tỉ lệ phần trăm của các axit béo bão hòa và các axit béo đơn bất bão hòa trong chế phẩm thu được, từ đó làm giàu đáng kể các axit béo đa bất bão hòa. Xem các bảng 3 - 6, và Fig.3A. Tuy nhiên, bất ngờ là việc tiến hành tạo phức ure bằng cách sử dụng các lượng ure nằm trong khoảng được xác định theo công thức có tác dụng khác biệt lên việc làm giàu của các loại axit béo đa bất bão hòa omega-3 và axit béo đa bất bão hòa omega-6 cụ thể.

Bảng 7 đưa ra đánh giá định tính độ giàu của các loại axit béo đa bất bão hòa khác nhau, so sánh mức độ trong nguyên liệu trung gian este etyl với mức độ trong API chứa axit tự do, được tính trung bình qua bốn mẻ sản xuất được mô tả trong các bảng 3 - 6. Cũng xem Fig.3B.

Bảng 7	
Loại axit béo đa bất bão hòa	Tác dụng định tính của việc tạo phức ure có kiểm soát
axit linoleic (C18:2 n-6)	không rõ rệt
axit gamma-linolenic (C18:3 n-6)	được làm giàu
axit α -linolenic (C18:3 n-3)	bị giảm
axit moroctic (C18:4 n-3)	được làm giàu
axit eicosadienoic (C20:2 n-6)	không rõ rệt
axit dihomogamma-linolenic (C20:3 n-6)	bị giảm
axit arachidonic (C20:4 n-6) (AA)	được làm giàu
axit eicosatrienoic (C20:3 n-3)	được làm giàu
axit eicosatetraenoic (C20:4 n-3)	được làm giàu
axit eicosapentaenoic (C20:5 n-3) (EPA)	được làm giàu
axit heneicosapentaenoic (C21:5 n-3)	được làm giàu
axit docosapentaenoic (C22:5 n-6)	bị giảm
axit docosapentaenoic (C22:5 n-3) (DPA)	được làm giàu

Bảng 7	
Loại axit béo đa bất bão hòa	Tác dụng định tính của việc tạo phức ure có kiểm soát
axit docosahexaenoic (C22:6 n-3) (DHA)	được làm giàu

Mặc dù các axit béo đa bất bão hòa omega-3, như là một nhóm, hầu hết được làm giàu, tác dụng của việc tạo phức ure lên các PUFA omega-6, như là một nhóm, là không như dự đoán. Trung bình, loại omega-6 DGLA và axit docosapentaenoic bị giảm về mức độ; axit gamma-linolenic và axit arachidonic được tăng lên; và có ít hoặc không có tác dụng lên axit linolenic và axit eicosadienoic.

Đặc biệt, lưu ý rằng loại axit docosapentaenoic omega-3, DPA (C22:5 n-3), được làm giàu, còn loại omega-6 tương ứng, có chiều dài mạch và độ bất bão hòa tương tự, axit docosapentaenoic (C22:5 n-6), bị giảm về mức độ. Tác dụng khác nhau của việc tạo phức ure lên việc làm giàu hai chất đồng phân này - cùng với sự khác biệt về nồng độ tương đối của chúng trong nguyên liệu trung gian este etyl - dẫn đến khác biệt bậc logarit của nồng độ của chúng trong API chứa axit tự do cuối. Lấy trung bình của bốn mẻ API được thể hiện trong các bảng 3 - 6, loại axit docosapentaenoic omega-3, DPA, có mặt trong API cuối ở nồng độ 5,85% (a/a), còn loại axit docosapentaenoic omega-6 có mặt ở nồng độ trung bình bằng 0,46% (a/a).

Ở nồng độ trung bình bằng 5,85% (a/a), DPA là loại axit béo đa bất bão hòa có lượng lớn thứ ba trong API, chỉ ít hơn EPA và DHA. Ở mức này, nồng độ DPA cũng gấp 10 lần so với nồng độ được báo cáo đối với dược phẩm chứa các axit béo đa bất bão hòa omega-3 ở dạng axit tự do trước đó, được gọi bằng thuật ngữ Purepa, trong đó DPA được báo cáo là có mặt ở hàm lượng bằng 0,5%. Xem Belluzzi et al., Dig. Dis. Sci. 39(12): 2589-2594 (1994).

Ví dụ 4: Phân tích thành phần của mười (10) mẻ sản xuất được nêu làm ví dụ của API thể hiện mức tăng DPA lặp lại

Các mẻ sản xuất khác được điều chế theo các phương pháp được mô tả trong ví dụ 2.

Dữ liệu từ mười (10) mẻ API, gồm cả bốn mẻ được mô tả trong các bảng 3-6 trong ví dụ 2, được sản xuất từ tám (8) mẻ nguyên liệu trung gian (este etyl) đã chuyển hóa este khác nhau, được thể hiện trong các bảng dưới đây. Chế phẩm từ mỗi mẻ nguyên liệu trung gian được thể hiện trong Bảng 8. Bảng 9 thể hiện giá trị trung bình ("AVG"), độ lệch chuẩn ("STDEV", "SD"), và delta (" Δ ", chênh lệch tuyệt đối giữa +1 SD và -1 SD, +2 SD và -2 SD, v.v.) qua 8 mẻ nguyên liệu trung gian của mỗi loại (este etyl) được nêu. Chế phẩm từ mỗi trong số mười mẻ API cuối được thể hiện trong Bảng 10 dưới đây; Bảng 11 thể hiện giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, và các giá trị delta của mỗi loại (axit tự do) được nêu qua 10 mẻ API.

Bảng 8 Mé nguyên liệu trung gian (este etyl)									
		Mé 1	Mé 2	Mé 3	Mé 4	Mé 5	Mé 6	Mé 7	Mé 8
	BV số	319021	319553	319554	320613	320766	320941	320824	320862
	ONC số	22581	24876	24906	27008	27824	27824	28069	28139
Đặc điểm nhận diện	Tên thông thường	diện tích %	diện tích %	diện tích %	diện tích %	diện tích %	diện tích %	diện tích %	diện tích %
C18:2(n-6)	Axit linoleic	0,552	0,516	0,522	0,571	0,689	0,712	0,657	0,611
C18:3(n-6)	Axit gama-linolenic	0,166	0,146	0,141	0,157	0,253	0,218	0,283	0,159
C18:3(n-3)	Axit α -linolenic	0,379	0,368	0,351	0,422	0,516	0,498	0,419	0,491
C18:4(n-3)	Axit moroctic	1,403	0,991	1,008	1,100	1,432	1,462	1,372	1,505
C20:2(n-6)	Axit eicosadienoic	0,156	0,181	0,194	0,167	0,423	0,366	0,274	0,212
C20:3(n-6)	Axit dihomogama-linolenic	0,314	0,384	0,421	0,376	0,415	0,473	0,446	0,398
C20:4(n-6)	Axit arachidonic	1,977	2,362	2,316	2,805	2,867	2,884	3,306	2,152
C20:3(n-3)	Axit eicosatrienoic	0,171	0,200	0,216	0,181	0,270	0,223	0,220	0,245
C20:4(n-3)	Axit eicosatetraenoic	1,855	1,908	1,870	1,653	2,159	2,142	1,896	2,132
C20:5(n-3)	EPA	46,131	45,698	44,908	45,317	45,131	45,675	45,416	46,185
C21:5(n-3)	Axit heneicosapentaenoic	2,239	2,105	2,156	2,165	1,763	1,761	2,140	2,407
C22:5(n-6)	Axit docosapentaenoic	0,658	0,575	0,556	0,508	0,535	0,524	0,509	0,572
C22:5(n-3)	DPA	5,341	4,634	4,598	5,178	2,858	2,874	4,324	4,834
C22:6(n-3)	DHA	15,875	16,102	15,997	15,700	16,861	17,046	16,128	16,852

Bảng 9 Nguyên liệu trung gian (este etyl) thống kê 8 mẻ													
Đặc điểm nhận diện	Tên thông thường	AVG	SD	-3SD	-2SD	-1SD	+1SD	+2SD	+3SD	1SD	2SD	3SD	Δ
C18:2(n-6)	Axit linoleic	0,60	0,08	0,38	0,45	0,53	0,68	0,76	0,83	0,15	0,30	0,45	
C18:3(n-6)	Axit gamma-linolenic	0,19	0,05	0,03	0,08	0,14	0,24	0,30	0,35	0,11	0,22	0,32	
C18:3(n-3)	Axit α-linolenic	0,43	0,06	0,24	0,30	0,37	0,49	0,56	0,62	0,13	0,26	0,38	
C18:4(n-3)	Axit moroctic	1,28	0,21	0,64	0,86	1,07	1,50	1,71	1,93	0,43	0,86	1,28	
C20:2(n-6)	Axit eicosadienoic	0,25	0,10	-0,05	0,05	0,15	0,35	0,45	0,54	0,20	0,40	0,60	
C20:3(n-6)	Axit di homo-gamma-linolenic	0,40	0,05	0,26	0,31	0,36	0,45	0,50	0,55	0,10	0,19	0,29	
C20:4(n-6)	Axit arachidonic	2,58	0,45	1,23	1,68	2,13	3,03	3,48	3,93	0,90	1,80	2,70	
C20:3(n-3)	Axit eicosatrienoic	0,22	0,03	0,12	0,15	0,18	0,25	0,28	0,31	0,07	0,13	0,19	
C20:4(n-3)	Axit eicosatetraenoic	1,95	0,18	1,42	1,60	1,77	2,13	2,31	2,49	0,36	0,71	1,07	
C20:5(n-3)	EPA	45,56	0,45	44,20	44,65	45,10	46,01	46,46	46,92	0,91	1,81	2,72	
C21:5(n-3)	Axit heneicosapentaenoic	2,09	0,22	1,42	1,64	1,87	2,32	2,54	2,76	0,45	0,90	1,34	
C22:5(n-6)	Axit docosapentaenoic	0,56	0,05	0,41	0,46	0,51	0,60	0,65	0,70	0,10	0,20	0,30	
C22:5(n-3)	DPA	4,33	0,96	1,45	2,41	3,37	5,29	6,25	7,21	1,92	3,84	5,76	
C22:6(n-3)	DHA	16,32	0,52	14,77	15,29	15,80	16,84	17,36	17,87	1,04	2,07	3,10	

Bảng 10													
Mê API (axit tự do) cuối													
	Mê API #	Mê 1	Mê 2	Mê 3	Mê 4	Mê 5	Mê 6	Mê 7	Mê 8	Mê 9	Mê 10		
	Mê sản phẩm trung gian #	1	1	2	3	4	4	5	7	8	6		
Đặc điểm nhận diện	Tên thông thường	diện tích %	diện tích %	diện tích %	diện tích %	diện tích %	diện tích %	diện tích %	diện tích %	diện tích %	diện tích %		
C18:2(n-6)	Axit linoleic	0,55	0,49	0,59	0,55	0,60	0,61	0,78	0,62	0,53	0,72		
C18:3(n-6)	Axit gama-linolenic	0,15	0,14	0,12	0,12	0,17	0,16	0,16	0,22	0,15	0,15		
C18:3(n-3)	Axit α -linolenic	0,39	0,34	0,38	0,37	0,45	0,45	0,55	0,41	0,44	0,50		
C18:4(n-3)	Axit morotic	1,70	1,67	1,16	1,26	1,37	1,37	1,87	1,65	1,77	1,81		
C20:2(n-6)	Axit eicosadienoic	0,10	0,13	0,12	0,09	0,10	0,10	0,27	0,12	0,11	0,12		
C20:3(n-6)	Axit dihomogama-linolenic	0,35	0,39	0,45	0,42	0,42	0,45	0,52	0,51	0,42	0,51		
C20:4(n-6)	Axit arachidonic	2,43	2,45	2,84	2,86	3,50	3,50	3,64	4,02	2,57	3,60		
C20:3(n-3)	Axit eicosatrienoic	0,15	0,25	0,22	0,16	0,20	0,17	0,25	0,18	0,17	0,23		
C20:4(n-3)	Axit eicosatetraenoic	2,18	2,02	2,11	2,09	1,96	1,90	2,64	2,13	2,34	2,54		
C20:5(n-3)	EPA	57,25	57,64	55,81	57,08	56,25	56,38	56,88	56,30	56,72	57,15		
C21:5(n-3)	Axit heneicosapentaenoic	2,79	2,75	2,72	2,78	2,68	2,60	2,15	2,57	2,88	2,18		
C22:5(n-6)	Axit docosapentaenoic	0,20	0,17	0,72	0,71	0,61	0,62	0,66	0,63	0,71	0,66		
C22:5(n-3)	DPA	6,23	6,22	5,46	5,49	6,12	5,97	3,41	5,15	5,59	3,43		
C22:6(n-3)	DHA	19,58	19,65	19,45	20,00	19,16	18,79	20,60	20,10	20,97	21,01		

Bảng 11 API (axit tự do) cuối Thống kê 10 mẻ													
Đặc điểm nhận diện	Tên thông thường	AVG	SD	-3 SD	-2 SD	-1 SD	+1 SD	+2 SD	+3 SD	1SD Δ	2SD Δ	3SD Δ	
C18:2(n-6)	Axit linoleic	0,61	0,09	0,34	0,43	0,52	0,69	0,78	0,87	0,18	0,35	0,53	
C18:3(n-6)	Axit gama-linolenic	0,15	0,03	0,07	0,10	0,13	0,18	0,21	0,24	0,06	0,11	0,17	
C18:3(n-3)	Axit α-linolenic	0,43	0,06	0,23	0,30	0,36	0,49	0,56	0,62	0,13	0,26	0,39	
C18:4(n-3)	Axit moroctic	1,56	0,25	0,81	1,06	1,31	1,81	2,06	2,31	0,50	1,00	1,50	
C20:2(n-6)	Axit eicosadienoic	0,13	0,05	-0,03	0,02	0,07	0,18	0,23	0,29	0,11	0,21	0,32	
C20:3(n-6)	Axit dihomogama-linolenic	0,44	0,06	0,28	0,33	0,39	0,50	0,56	0,61	0,11	0,22	0,33	
C20:4(n-6)	Axit arachidonic	3,14	0,58	1,41	1,99	2,57	3,72	4,29	4,87	1,15	2,30	3,46	
C20:3(n-3)	Axit eicosatrienoic	0,20	0,04	0,08	0,12	0,16	0,24	0,28	0,32	0,08	0,16	0,24	
C20:4(n-3)	Axit eicosatetraenoic	2,19	0,24	1,46	1,71	1,95	2,43	2,68	2,92	0,49	0,97	1,46	
C20:5(n-3)	Axit eicosapentaenoic (HPA)	56,74	0,56	55,07	55,63	56,19	57,30	57,86	58,42	1,12	2,23	3,34	
C21:5(n-3)	Axit heneicosapentaenoic	2,61	0,25	1,85	2,11	2,36	2,86	3,12	3,37	0,51	1,01	1,52	
C22:5(n-6)	Axit docosapentaenoic	0,57	0,21	-0,05	0,16	0,36	0,78	0,98	1,19	0,41	0,83	1,24	

Bảng 11 API (axit tự do) cuối Thống kê 10 mẻ												
Đặc nhận diện	Tên thông thường	AVG	SD	-3 SD	-2 SD	-1 SD	+1 SD	+2 SD	+3 SD	1SD Δ	2SD Δ	3SD Δ
C22:5(n-3)	Axit docosapentaenoic (DPA)	5,31	1,06	2,13	3,19	4,25	6,37	7,42	8,48	2,12	4,23	6,35
C22:6(n-3)	Axit docosahexaenoic (DHA)	19,93	0,75	17,68	18,43	19,18	20,68	21,43	22,18	1,50	2,99	4,49

Như được thấy rõ từ Bảng 11, sự khác biệt bậc logarit của nồng độ tương đối của API chứa loại axit docosapentaenoic omega-3, DPA (C22:5 n-3), và chất đồng phân axit docosapentaenoic omega-6 (C22:5 n-6), được duy trì - ở 5,31% (a/a) đối với DPA (C22:5 n-3) so với 0,57% (a/a) đối với axit docosapentaenoic (C22:5 n-6) - cũng như mức tăng nồng độ DPA gấp 10 lần so với chế phẩm Purepa chứa axit tự do omega-3 trước đó được báo cáo trong Belluzzi et al. (5,31 vs. 0,5%).

Ví dụ 5: Phân tích thành phần của 21 mẻ sản xuất được nêu làm ví dụ thể hiện mức tăng DPA lặp lại

Nồng độ loại axit docosapentaenoic omega-3 tương đối và tuyệt đối cao, DPA, đã được quan sát thấy qua 21 mẻ API được sản xuất bằng cách tạo phức ure, như được tóm tắt trong các bảng 12 và 13 dưới đây.

Bảng 12 API (axit tự do) cuối Thông kê 21 mẻ					
Đặc điểm nhận diện	Tên thông thường	Nhỏ nhất % (a/a)	Lớn nhất % (a/a)	AVG % (a/a)	
C18:2(n-6)	Axit linoleic	0,49	1,00	0,74	
C18:3(n-6)	Axit gama-linolenic	0,12	0,52	0,24	
C18:3(n-3)	Axit α -linolenic	0,34	0,83	0,54	
C18:4(n-3)	Axit stearidonic (morotict)	1,16	5,83	2,83	
C20:2(n-6)	Axit eicosadienoic	0,10	0,27	0,15	
C20:3(n-6)	Axit dihomogama-linolenic	0,24	0,52	0,40	
C20:4(n-6)	Axit arachidonic (AA)	2,32	4,02	3,17	
C20:3(n-3)	Axit eicosatrienoic	0,10	0,25	0,16	
C20:4(n-3)	Axit eicosatetraenoic	1,40	2,82	2,13	
C20:5(n-3)	Axit eicosapentaenoic (timnodonic) (EPA)	48,61	57,64	55,40	
C21:5(n-3)	Axit heneicosapentaenoic	1,81	2,88	2,33	
C22:5(n-6)	Axit docosapentaenoic	0,17	0,73	0,58	
C22:5(n-3)	Axit docosapentaenoic (DPA)	2,77	6,23	4,44	
C22:6(n-3)	Axit cervonic (DHA)	15,99	21,78	19,35	

Bảng 13 API (axit tự do) cuối Thống kê 21 mẻ													
Đặc điểm nhận diện	Tên thông thường	AVG % (a/a)	SD	-3SD	-2SD	-1SD	+1SD	+2SD	+3SD	1SD Δ	2SD Δ	3SD Δ	
C18:2(n-6)	Axit linoleic	0,74	0,16	0,26	0,42	0,58	0,90	1,07	1,23	0,32	0,65	0,97	
C18:3(n-6)	Axit gamma-linolenic	0,24	0,11	-0,09	0,02	0,13	0,35	0,46	0,58	0,22	0,44	0,66	
C18:3(n-3)	Axit α -linolenic	0,54	0,15	0,09	0,24	0,39	0,69	0,84	0,99	0,30	0,60	0,90	
C18:4(n-3)	Axit stearidonic (morotic)	2,83	1,49	-1,63	-0,15	1,34	4,31	5,80	7,28	2,97	5,94	8,92	
C20:2(n-6)	Axit eicosadienoic	0,15	0,04	0,02	0,07	0,11	0,20	0,24	0,28	0,09	0,17	0,26	
C20:3(n-6)	Axit dihomogamma-linolenic	0,40	0,07	0,18	0,25	0,32	0,47	0,55	0,62	0,15	0,30	0,45	
C20:4(n-6)	Axit arachidonic	3,17	0,51	1,65	2,16	2,67	3,68	4,19	4,70	1,01	2,03	3,04	
C20:3(n-3)	Axit eicosatrienoic	0,16	0,05	0,01	0,06	0,11	0,21	0,26	0,31	0,10	0,20	0,31	
C20:4(n-3)	Axit eicosatetraenoic	2,13	0,41	0,92	1,32	1,73	2,54	2,94	3,35	0,81	1,62	2,43	
C20:5(n-3)	Axit timnodonic (EPA)	55,40	2,13	49,00	51,13	53,27	57,53	59,66	61,80	4,26	8,53	12,79	
C21:5(n-3)	Axit heneicosapentaenoic	2,33	0,34	1,29	1,64	1,98	2,67	3,02	3,36	0,69	1,38	2,07	
C22:5(n-6)	Axit docosapentaenoic	0,58	0,16	0,11	0,27	0,43	0,74	0,90	1,06	0,31	0,63	0,94	
C22:5(n-3)	Axit docosapentaenoic (DPA)	4,44	1,16	0,98	2,13	3,29	5,60	6,75	7,91	2,31	4,62	6,93	
C22:6(n-3)	Axit cervonic (DHA)	19,35	1,69	14,28	15,97	17,66	21,04	22,73	24,42	3,38	6,76	10,14	

Ví dụ 6: Tác dụng của DPA lên sự biểu hiện gen của tế bào gan dự đoán hiệu lực lâm sàng lớn hơn của chế phẩm giàu DPA.

DPA là loại axit béo đa bất bão hòa có lượng lớn thứ ba trong được phẩm được phân tích trong các ví dụ trên, và có mặt ở nồng độ gấp 10 lần so với trong Purepa, một được phẩm chứa axit béo đa bất bão hòa omega-3 ở dạng axit tự do trước đó. Mặc dù DPA là chất trung gian trong quá trình sinh tổng hợp từ EPA thành DHA (xem Fig.), nhưng lại ít biết về các tác dụng sinh học cụ thể của DPA. Xem Kaur et al., "Docosapentaenoic acid (22:5n-3): a review of its biological effects," Prog. Lipid Res. 50:28-34 (2011). Để làm rõ sự đóng góp tiềm năng của DPA vào hiệu lực lâm sàng của được phẩm, các thử nghiệm mô tả sự biểu hiện gen được tiến hành.

. Phương pháp

Nuôi cấy và xử lý tế bào - Các tế bào caxinom gan Hep G2 được nuôi cấy trong môi trường Eagle cải biến của Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM) không chứa huyết thanh (Sigma-Aldrich) với 4,5 g/l glucoza, L-glutamin, NaHCO_3 và pyridoxin HCl được bổ sung 1% (thể tích/thể tích) axit amin không thiết yếu, 1% Na-pyruvat, 1% penixilin/streptomycin, và 10% (thể tích/thể tích) albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin - BSA) không chứa axit béo, tất cả được mua từ Gibco BRL.

Môi trường nuôi cấy tế bào được chuyển hằng tuần bằng cách phân cắt bằng trypsin và ủ ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ ẩm chứa 5% CO_2 . Sau 5 tuần nuôi cấy tế bào, EPA (axit eicosapentaenoic, lô #0439708-2, Cayman Chemicals), DPA (axit docosapentaenoic, lô 163481-26, Cayman Chemicals), và DHA (axit docosahexaenoic, lô 0437083-5, Cayman Chemicals), được pha loãng ngay trước khi sử dụng trong DMEM không chứa huyết thanh, được bổ sung vào ba lỗ bản sao (250.000 tế bào/lỗ) ở nồng độ hiệu quả cuối được nêu trong Bảng 14 dưới đây.

Các tỉ lệ giữa EPA (ở 100 μM), DHA (ở 40 μM), và DPA (ở 11 μM) được chọn sao cho gần các tỉ lệ giữa EPA, DHA, và DPA trong được phẩm (API) được mô tả trong phần chế phẩm chứa omega-3 giàu DPA ở dạng axit tự do và ví dụ 5 (xem các bảng 12 và 13). Nồng độ tuyệt đối được chọn sao cho gần nhất - nằm trong giới hạn ràng buộc bởi tỉ lệ thành phần mong muốn và giới hạn ràng buộc bởi các điều kiện nuôi cấy -

khoảng thu được trong huyết tương trong các nhánh điều trị bằng liều 2g và 4g của thử nghiệm EVOLVE (xem ví dụ 10). Nồng độ DPA thấp hơn (1 μM) được chọn sao cho gần với việc tiếp xúc toàn thân được mong đợi từ việc sử dụng được phẩm chứa axit béo đa bất bão hòa omega-3 ở dạng axit tự do trước đó, được gọi bằng thuật ngữ Purepa, trong đó DPA được báo cáo là có mặt ở mức 1/10 được thấy trong được phẩm này.

Các tế bào HepG2 được ủ bằng axit béo xác định (EPA, DHA, DPA, hoặc hỗn hợp đã định) trong tổng số 48 giờ trước khi thu hoạch tế bào và chiết ARN.

Bảng 14				
Mẫu #	Loại PUFA	Nồng độ cuối mỗi lọ	Lọ	Chất lượng ARN (260/280)
GL 01	EPA	30 μM	a	2,0
GL 02	EPA	30 μM	b	2,1
GL 03	EPA	30 μM	c	2,0
GL 04	EPA	100 μM	a	1,98
GL 05	EPA	100 μM	b	2,05
GL 06	EPA	100 μM	c	2,0
GL 07	DHA	12 μM	a	2,0
GL 08	DHA	12 μM	b	2,04
GL 09	DHA	12 μM	c	2,0
GL 10	DHA	40 μM	a	2,0
GL 11	DHA	40 μM	b	2,0
GL 12	DHA	40 μM	c	2,11
GL 13	DPA	0,3 μM	a	2,07
GL 14	DPA	0,3 μM	b	2,0
GL 15	DPA	0,3 μM	c	2,0
GL 16	DPA	3,0 μM	a	2,09
GL 17	DPA	3,0 μM	b	2,0
GL 18	DPA	3,0 μM	c	1,99
GL 19	DPA	1 μM	a	2,2
GL 20	DPA	1 μM	b	2,03
GL 21	DPA	1 μM	c	2,03
GL 22	DPA	11 μM	a	2,0
GL 23	DPA	11 μM	b	2,08
GL 24	DPA	11 μM	c	2,06
GL 25	EPA:DHA:DPA	tổng số 200 μM	a	2,05

Bảng 14				
Mẫu #	Loại PUFA	Nồng độ cuối mỗi lỗ	Lỗ	Chất lượng ARN (260/280)
	100:40:1(50:20:0,5)			
GL 26	EPA:DHA:DPA 100:40:1(50:20:0,5)	tổng số 200 μ M	b	2,0
GL 27	EPA:DHA:DPA 100:40:1(50:20:0,5)	tổng số 200 μ M	c	2,0
GL 28	EPA:DHA:DPA 100:40:11 (50:20:5,5)	tổng số 200 μ M	a	2,0
GL 29	EPA:DHA:DPA 100:40:11 (50:20:5,5)	tổng số 200 μ M	b	2,06
GL 30	EPA:DHA:DPA 100:40:11 (50:20:5,5)	tổng số 200 μ M	c	2,07
GL 31	EPA:DHA:DPA 30:12:0,3 (50:20:0,5)	tổng số 60 μ M	a	2,07
GL 32	EPA:DHA:DPA 30:12:0,3 (50:20:0,5)	tổng số 60 μ M	b	2,13
GL 33	EPA:DHA:DPA 30:12:0,3 (50:20:0,5)	tổng số 60 μ M	c	2,05
GL 34	EPA:DHA:DPA 30:12:3 (50:20:5,5)	tổng số 60 μ M	a	2,0
GL 35	EPA:DHA:DPA 30:12:3 (50:20:5,5)	tổng số 60 μ M	b	2,12
GL 36	EPA:DHA:DPA 30:12:3 (50:20:5,5)	tổng số 60 μ M	c	2,01
GL 37	BSA (không chứa axit béo)		a	2,03
GL 38	BSA (không chứa axit béo)		b	2,00
GL 39	BSA (không chứa axit béo)		c	2,00

Thu hoạch tế bào và tách ARN - Toàn bộ ARN được tách bằng cách sử dụng TRIzol, theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Invitrogen). Chất lượng ARN được đánh giá bằng máy đo ảnh phổ Nanodrop 8000 (Thermo Scientific). Như được nêu trong Bảng 14 trên đây, mỗi dịch chiết ARN của mỗi lần xử lý có tỉ lệ 260/280 nằm trong khoảng từ 2,0 đến 2,2. Sau đó, ARN được tinh chế tiếp bằng cột Qiagen RNeasy. Từ 300 ng tổng số ARN trên mỗi chế phẩm, kit Illumina TotalPrep RNA Amplification (Ambion) được sử dụng để tạo ra ARN bổ sung (complementary RNA) biotin hóa được khuếch đại sau khi

phiên mã ngược bằng quy trình Eberwine. Các phần mẫu của các mẫu ARN đã xử lý và đối chứng được gửi đến phòng thí nghiệm trung tâm về biểu hiện gen để phân tích. Phần còn lại của tổng số mẫu ARN được bảo quản ở nhiệt độ -70°C .

Thử nghiệm biểu hiện và phân tích dữ liệu - Các sản phẩm phiên mã đặc hiệu trong ARN bổ sung được biotin hóa được đo bằng cách tạo ảnh huỳnh quang sau khi tạo thể lai trực tiếp với các mảng hạt Illumina HT-12, v.4.0. Dữ liệu biểu hiện gen được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Ingenuity® iReport™ (Ingenuity Systems, Redwood City, CA).

Kết quả

Mô tả sự biểu hiện thể hiện rằng DPA có tác dụng sinh học khác với EPA và DHA

Mặc dù DPA là sản phẩm trung gian trong quá trình sinh tổng hợp từ EPA thành DHA, và mặc dù DPA đã biết là chuyển hóa ngược lại thành EPA in vivo, Kaur et al., Prog. Lipid Res. 50:28-34 (2011), các tác giả sáng chế đã quan sát thấy tác dụng khác biệt rõ rệt lên sự biểu hiện gen của tế bào gan sau khi ủ với DPA, so với các tác dụng thấy được đối với EPA và với DHA.

Để đánh giá tính tương đồng và khác biệt về tác dụng lên sự biểu hiện gen ở mức cao, các tác giả sáng chế đã sử dụng phần mềm Ingenuity® iReport™ để truy vấn dữ liệu biểu hiện gen đối với 5 đáp ứng đứng đầu, được xếp hạng bằng thuật toán Ingenuity® iReport™, được tìm ra sau khi tiếp xúc với mỗi chất trong số EPA (100 μM), DHA (40 μM), và DPA (11 μM), trong các loại gen được xử lý khác nhau. Các kết quả được tập hợp trong Bảng 15 dưới đây. Một đánh giá tương tự, bằng cách sử dụng phân loại khác, được thể hiện trong bảng 16 sau đây. Các kí hiệu được sử dụng là: "|" – thuộc tính là duy nhất đối với loại axit béo đã định; "¶" – thuộc tính chung với một loại axit béo khác; và "◆" – thuộc tính thu được chung đối với tất cả 3 loại axit béo.

Bảng 15			
	EPA	DHA	DPA
Bệnh và rối loạn			
Bệnh ung thư	◆	◆	◆
Rối loạn mô liên kết			
Bệnh và tình trạng bệnh về da		¶	¶

Bảng 15			
	EPA	DHA	DPA
Rối loạn tiến triển			
Bệnh huyết học			
Bệnh miễn dịch			
Bệnh nhiễm trùng	◆	◆	◆
Bệnh viêm			
Bệnh thận và tiết niệu			
Bệnh hệ sinh sản			
Các chức năng phân tử và tế bào			
Làm tổn thương tế bào			
Sự chết và sống sót của tế bào	¶	¶	
Sự phát triển của tế bào	◆	◆	◆
Chức năng và nuôi dưỡng tế bào			
Sự sinh trưởng và tăng sinh tế bào	◆	◆	◆
Sự di chuyển của tế bào			
Tạo tín hiệu và tương tác tế bào - tế bào		¶	¶
Sự biểu hiện gen			
Sự cải biến ARN sau phiên mã			
Sự phát triển và chức năng hệ thống sinh lý			
Sự phát triển và chức năng mô liên kết			
Sự phát triển và chức năng hệ huyết học	¶		¶
Sự tạo máu			
Việc vận chuyển tế bào miễn dịch			
Cấu trúc và sự phát triển mô bạch huyết			
Sự phát triển và chức năng hệ sinh sản	¶	¶	
Sự phát triển và chức năng hệ cơ và xương			
Sự phát triển mô		¶	¶
Hình thái học mô			
Hình thái học khối u	◆	◆	◆
Các con đường kiểu mẫu đứng đầu			
Tạo tín hiệu CD27 trong tế bào limphô			
Tạo tín hiệu IL-17A trong các tế bào của đường dẫn khí		¶	¶
Tạo tín hiệu IL-17A trong các tế bào dạ dày		¶	¶
Tạo tín hiệu IL-8			
Tạo tín hiệu IMLP của bạch cầu trung tính			
Vai trò của IL-17F trong các bệnh viêm dị ứng của đường dẫn khí			

Bảng 15			
	EPA	DHA	DPA
Vai trò của IL-17A trong bệnh viêm khớp	◆	◆	◆
Vai trò của IL-17A trong bệnh vẩy nến		¶	¶
Vai trò của đại thực bào, nguyên bào sợi và tế bào nội mô trong bệnh viêm khớp dạng thấp			
Tạo tín hiệu TREM1			

Bảng 16			
	EPA	DHA	DPA
Danh sách Tox			
Tim to			
ứ mật gan	◆	◆	◆
Sự hoạt hóa tế bào hình sao của gan			
Sự tăng tiềm năng xuyên màng của ti thể và màng ty thể			
Hoại tử/chết tế bào gan			
Sự tăng sinh gan	¶	¶	
Cơ chế điều hòa gen bởi các chất tăng sinh thể peroxi thông qua PPAR α			
Sự hoạt hóa PPAR α /RXR α		¶	¶
Bảng các chỉ dấu sinh học của bệnh viêm thận tiểu cầu nguyên phát (người)			
Hoại tử/chết tế bào thận	¶		¶
Hóa học và huyết học lâm sàng			
Tăng hàm lượng albumin			
Tăng hàm lượng creatinin	◆	◆	◆
Tăng hàm lượng hematocrit			
Tăng hàm lượng tế bào hồng cầu	¶	¶	
Độc tính với tim			
Chứng loạn nhịp tim			
Tổn thương tim			
Loạn chức năng tim			
Chứng xơ hóa tim	¶	¶	
Tim to	◆	◆	◆
Chứng viêm tim	◆	◆	◆
Hoại tử/chết tế bào tim	¶		¶
Sự tăng sinh tim			
Dị tật tim bẩm sinh			
Độc tính với gan			

Bảng 16			
	EPA	DHA	DPA
Sự tăng sản mật			
Ứ mật gan	◆	◆	◆
Tổn thương gan			
Phi đại gan		¶	¶
Bệnh viêm gan		¶	¶
Chứng viêm ở gan	◆	◆	◆
Hoại tử/chết tế bào gan			
Sự tăng sinh gan	¶	¶	
Độc tính với thận			
Tổn thương thận	¶	¶	
Chứng thủy thũng thận			
Chứng viêm thận	◆	◆	◆
Hoại tử/chết tế bào thận	◆	◆	◆
Bệnh viêm thận	◆	◆	◆
Sự tăng sinh thận	◆	◆	◆

Dữ liệu tô sáng đánh dấu sự khác biệt về tác dụng của DPA, EPA, và DHA, qua nhiều mục.

Sự khác biệt về tác dụng lên biểu hiện gen cũng được quan sát bằng cách sử dụng phân tích khác, trong đó các gen cụ thể hầu hết được điều chỉnh lên và được điều chỉnh xuống một cách đáng kể bằng mỗi trong số EPA (100 μ M), DHA (40 μ M) và DPA (11 μ M) được nhận diện. Dữ liệu được tập hợp lần lượt trong các bảng 17 (các gen được điều chỉnh lên) và 18 (các gen được điều chỉnh xuống) dưới đây. Các kí hiệu được sử dụng là: "→" –sự biểu hiện bị ảnh hưởng ở cả hai nồng độ DPA; "¶" sự biểu hiện được điều chỉnh chung với một loại axit béo khác, được nhận diện trong ngoặc; "◆" gen được điều chỉnh bởi tất cả ba loại axit béo.

Bảng 17 các gen đứng đầu được điều chỉnh lên		
loại axit béo	Nồng độ μ M	các gen
DPA	11	↑ MST1 (bao gồm EG:15235) →¶(DHA)
		↑ MGC16121 →
		↑ AMT →

Bảng 17 các gen đứng đầu được điều chỉnh lên		
loại axit béo	Nồng độ μM	các gen
		↑ AHSA2 →◆ ↑ SRSF1 →¶(EPA) ↑ HNRNPA2B1 ↑ ALDOC ↑ TOP3B ↑ STK36 ↑ SRSF5
DHA	40	↑ HIST2H2AA3/HIST2H2AA4 ¶(EPA) ↑ AHSA2 ◆ ↑ MT1X ↑ SNORA62 ↑ HIST1H3A (bao gồm các gen khác) ↑ MST1 (bao gồm EG:15235) ¶(DPA) ↑ HIST2H2AC ↑ LOX ¶(EPA) ↑ LSMD1 ↑ MRPS34
EPA	100	↑ HIST2H2BE (bao gồm các gen khác) ↑ AHSA2◆ ↑ SRSF1 ¶(DPA) ↑ RGS2 (bao gồm EG:19735) ↑ HIST2H2AA3/HIST2H2AA4 ¶(DHA) ↑ MAT2A ↑ ZNF91 ↑ HIST1H3A (bao gồm các gen khác) ¶(DHA) ↑ LOX ¶(DHA) ↑ GNAI3

Bảng 18 các gen đứng đầu được điều chỉnh xuống		
loại axit béo	Nồng độ μM	Các gen
DPA	11	↓ IL8 ◆ ↓ CDKN2AIPNL ◆ ↓ CATSPER2 →◆ ↓ CCBE1 ¶(DHA) ↓ ALPP ¶(DHA) ↓ CCL20 ◆ ↓ DDX51 ¶(DHA) ↓ QRFPR

Bảng 18 các gen đứng đầu được điều chỉnh xuống		
loại axit béo	Nồng độ μM	Các gen
		↓ ZNF14 ↓ RELB ¶(EPA)
DHA	40	↓ CATSPER2 ↓ IL8 ↓ CCL20 ↓ CDKN2AIPNL ↓ MAP2K2 ↓ DDX51 ↓ CCBE1 ↓ JOSD1 ↓ ALPP ↓ ZNF652 ¶(DPA) ¶(DPA) ¶(DPA)
EPA	100	↓ IL8 ↓ CCL20 ↓ NFKBIA ↓ IER3 ↓ RELB ↓ CATSPER2 ↓ CDKN2AIPNL ↓ G0S2 ↓ ZFP38 ↓ HERDSPUD1 ¶(DPA)

Sự khác biệt về tác dụng của DPA, EPA, và DHA còn dễ dàng thấy được bằng cách so sánh các gen mà sự biểu hiện của nó chỉ bị ảnh hưởng bởi một trong số các loại PUFA omega-3.

Bảng 19 Các gen đứng đầu chỉ được điều chỉnh bởi DPA (11 μM)			
Các gen	EPA	DHA	DPA
1. ALDOC			↑
2. AMT			↑
3. HNRNPA2B1			↑
4. MGC16121			↑
5. PRKCD			←

Bảng 19 Các gen đứng đầu chỉ được điều chỉnh bởi DPA (11 μ M)			
Các gen	EPA	DHA	DPA
6. RELA (bị ức chế)			←
7. SRSF5			↑
8. STK36			↑
9. TLR7 (bị ức chế)			←
10. TOP3B			↑
11. QRFPR			↓
12. ZNF14			↑

Bảng 20 Các gen đứng đầu chỉ được điều chỉnh bởi DHA (40 μ M)			
Các gen	EPA	DHA	DPA
1. FOXO3		←	
2. LSMD1		↑	
3. MAP2K2		↓	
4. MRPS34		↑	
5. MT1X		↑	
6. NFKB1		←	
7. SNORA62		↑	
8. TNFSF11		←	
9. ZNF652		↓	

Bảng 21 Các gen đứng đầu chỉ được điều chỉnh bởi EPA (100 μ M)			
Các gen	EPA	DHA	DPA
1. Beta-estradiol (bị ức chế)	←		
2. GNAI3	↑		

Bảng 21 Các gen đứng đầu chỉ được điều chỉnh bởi EPA (100 μ M)			
Các gen	EPA	DHA	DPA
3. G0S2	↓		
4. HERPUD1	↓		
5. HIST2H2BE (bao gồm các gen khác)	↑		
6. IL2 (bị ức chế)	←		
7. IER3	↓		
8. Lipopolysaccharit (bị ức chế)	←		
9. MAT2A	↑		
10. NFkB (phức hợp) (bị ức chế)	←		
11. NFKBIA	↓		
12. RGS2 (bao gồm EG:19735)	↑		

Sự khác biệt về tác dụng của DPA, EPA, và DHA lên sự biểu hiện gen cũng có thể thấy được bằng cách so sánh các gen mà sự biểu hiện của nó chủ yếu bị ảnh hưởng đáng kể bởi ít nhất hai trong số các loại axit béo đa bất bão hòa.

Bảng 22 Các gen đứng đầu được điều chỉnh chung bởi DHA và DPA			
Các gen	EPA	DHA	DPA
1. AHS2	↑	↑	↑
2. ALPP		↓	↓
3. CATSPER2	↓	↓	↓
4. CCL20	↓	↓	↓
5. CDKN2AIPNL	↓	↓	↓
6. CCBE		↓	↓
7. DDX51		↓	↓
8. IL8	↓	↓	↓

Bảng 22 Các gen đứng đầu được điều chỉnh chung bởi DHA và DPA			
Các gen	EPA	DHA	DPA
9. MST1 (bao gồm EG:15235)		↑	↑

Bảng 23 Các gen đứng đầu được điều chỉnh chung bởi EPA và DPA			
Các gen	EPA	DHA	DPA
1. AHS2	↑	↑	↑
2. CATSPER2	↓	↓	↓
3. CCL20	↓	↓	↓
4. CDKN2AIPNL	↓	↓	↓
5. IL8	↓	↓	↓
6. RELB	↓		↓
7. SRSF1	↑		↑

Các phân tích này thể hiện chung rằng có sự khác biệt rõ rệt về tác dụng của EPA, DHA, và DPA qua nhiều quá trình sinh lý, được lý, và sinh hóa. EPA, DHA, và DPA có tác dụng không giống nhau; loại cụ thể có mặt trong chế phẩm chứa PUFA omega-3 rõ ràng có ý nghĩa với tác dụng sinh lý mà chế phẩm sẽ có khi dùng.

6.6.2.2. DPA có hoạt tính đáng kể ở nồng độ cao hơn nhưng không có hoạt tính ở nồng độ thấp hơn

Hai nồng độ DPA được đánh giá. Như lưu ý trên đây, nồng độ DPA cao hơn (ở 11 μM), được chọn sao cho tỉ lệ giữa EPA (ở 100 μM), DHA (ở 40 μM), và DPA (ở 11 μM) xấp xỉ tỉ lệ giữa EPA, DHA, và DPA trong được phẩm (API) được mô tả trong phần chế phẩm chứa omega-3 giàu DPA ở dạng axit tự do và ví dụ 5, với nồng độ tuyệt đối được chọn để gần nhất – nằm trong giới hạn ràng buộc bởi tỉ lệ thành phần mong muốn và giới hạn ràng buộc bởi các điều kiện nuôi cấy – khoảng thu được trong huyết tương trong các nhánh điều trị của thử nghiệm EVOLVE (xem ví dụ 10). Nồng độ DPA thấp hơn (1 μM) được chọn sao cho gần với việc tiếp xúc toàn thân được mong đợi từ việc sử dụng được

phẩm chứa axit béo đa bất bão hòa omega-3 ở dạng axit tự do trước đó, được gọi bằng thuật ngữ Purepa, trong đó DPA được báo cáo là có mặt ở mức 1/10 được thấy trong được phẩm này.

Toàn bộ 310 gen chỉ đáp ứng với hàm lượng DPA cao hơn, nhưng không đáp ứng với hàm lượng DPA thấp hơn. Một số lượng lớn các gen thể hiện các thay đổi có ý nghĩa thống kê trong sự biểu hiện gen dự đoán rằng DPA sẽ có tác dụng sinh học ý nghĩa khi đạt được nồng độ in vivo cao hơn. Ngược lại, nồng độ DPA thấp hơn rõ ràng là liều thấp hơn liều ngưỡng, ít nhất liên quan đến việc điều chỉnh của 310 gen này, và đáp ứng ít hơn được mong đợi ở nồng độ trong huyết tương in vivo thấp hơn này.

Khi các tác dụng được đánh giá trên các gen được phân loại rộng bằng phần mềm iReport™ dưới dạng ảnh hưởng đến chức năng phân tử và tế bào, hai loại nhỏ chỉ xuất hiện trong danh sách 5 gen đứng đầu, được xếp hạng bởi thuật toán Ingenuity® iReport™, ở nồng độ DPA cao hơn, nhưng không ở nồng độ DPA thấp hơn, – các tác dụng này liên quan đến sự biểu hiện gen, và ảnh hưởng đến cải biến ARN sau phiên mã. Cho rằng tiềm năng đối với các tác dụng thứ cấp đa tác động gây ra bởi các thay đổi trong sự biểu hiện gen mã hoá các protein mà chính các protein này lại ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen, và trong các gen mã hoá các protein ảnh hưởng đến sự cải biến sau phiên mã, các kết quả này gợi ý rằng DPA có khả năng điều biến một số lượng lớn con đường chuyển hóa ở nồng độ cao hơn mà không tác dụng ở nồng độ thấp hơn.

Tác dụng ở liều ngưỡng cũng có thể thấy được bằng cách tập trung vào ba loại gen đã biết là liên quan đến các tác dụng lâm sàng của các axit béo đa bất bão hòa omega-3: các gen liên quan đến chuyển hóa lipid, các gen liên quan đến sinh lý học tim mạch, và các gen liên quan đến chứng viêm (việc đánh giá các gen ở loại xác định được thực hiện tự động bằng phần mềm iReport™. Các kết quả được thống kê trong Bảng 24 dưới đây.

Bảng 24			
	Tổng các đáp ứng gen	Tổng các đáp ứng gen	Các đáp ứng gen nói chung
	[DPA] thấp	[DPA] cao	
Chuyển hóa lipid	2	22	0
Tim mạch	10	51	6

Viêm	18	22	4
------	----	----	---

Như được thể hiện trong bảng 24, chỉ 2 gen có liên quan trong chuyển hóa lipid đáp ứng với nồng độ DPA 1 μ M, trong khi 22 gen chuyển hóa lipid chỉ đáp ứng với các thay đổi có ý nghĩa thống kê trong sự biểu hiện khi ủ với sự có mặt của DPA 11 μ M. Việc tập trung vào chuyển hóa lipid, DPA 1 μ M rõ ràng là liều dưới liều ngưỡng, còn 11 μ M có tác dụng đáng kể.

Một số lượng lớn hơn các gen chứng tỏ đáp ứng với liều DPA 1 μ M trong mục sinh lý học tim mạch, và các tác giả sáng chế đã quan sát thấy mức tăng gấp năm lần (chứ không phải 10 lần) số lượng gen bị ảnh hưởng ở nồng độ DPA 11 μ M. Số gen lớn hơn nữa liên quan đến các quá trình viêm đáp ứng với DPA 1 μ M, với mức tăng ít về số lượng gen quan sát được ở nồng độ 11 μ M.

Nồng độ in vitro 11 μ M là thấp hơn nồng độ trong huyết tương $\sim$ 90 μ M quan sát thấy ở các bệnh nhân trong nghiên cứu EVOLVE liều 4g/ngày. Xem ví dụ 10. Do đó, các kết quả này dự đoán rằng liều liên quan lâm sàng của chế phẩm giàu DPA được mô tả trong phân chế phẩm chứa omega-3 giàu DPA ở dạng axit tự do và ví dụ 5 (xem Bảng 12 và 13) sẽ có tác dụng chuyển hóa đáng kể, bao gồm tác dụng lên chuyển hóa lipid, sinh lý học tim mạch, và chứng viêm. Tác dụng đặc hiệu DPA này được mong đợi ít, nếu có, ở hàm lượng DPA thấp hơn 10 lần được thấy trong chế phẩm Purepa trước đó.

DPA, ở nồng độ cao hơn, ảnh hưởng đến sự biểu hiện của nhiều gen chuyển hóa lipid

22 gen chuyển hóa lipid thể hiện các thay đổi có ý nghĩa thống kê trong biểu hiện ở nồng độ DPA 11 μ M, nhưng không thể hiện sự thay đổi biểu hiện ở nồng độ 1 μ M, được nhận diện trong Bảng 25 dưới đây.

Bảng 25 Các gen chuyển hóa lipid đáp ứng với DPA 11 μM				
Kí hiệu	Tên gen trong Entrez	ID gen của người trong Entrez	Mức độ thay đổi	(Các) thuốc đã biết ảnh hưởng đến sự biểu hiện
APOA2	apolipoprotein A-II	336	-1,229	
CD83	phân tử CD83	9308	-1,629	
DGAT1	diacylglycerol O-acyltransferase 1	8694	1,602	omacor
DNAJB1	Chất tương tự DnaJ (Hsp40), phân họ B, phần 1	3337	-1,489	
FGFR3	thụ thể yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 3	2261	1,336	pazopanib
GNAI3	protein gắn kết nucleotit guanin (protein G), hoạt tính ức chế alpha polypeptit 3	2773	1,455	
IL8	interleukin 8	3576	-2,535	
IL32	interleukin 32	9235	-1,629	
IL18 (bao gồm EG:16173)	interleukin 18 (yếu tố cảm ứng bởi interferon-gamma)	3606	-1,347	
IP6K1	inositol hexakisphosphat kinaza 1	9807	-1,242	
IP6K2	inositol hexakisphosphat kinaza 2	51447	1,319	
KIT	Chất tương tự gen sinh ung thư virus sacom của mèo v-kit Hardy-Zuckerman 4	3815	1,239	dasatinib, sunitinib, pazopanib, tivozanib, OSI-930, telatinib, tandutinib, imatinib, sorafenib
NFKB1	yếu tố nhân của gen tăng cường polypeptit chuỗi nhẹ kappa trong tế bào B 1	4790	-1,386	
PDPN (bao	podoplanin	10630	-1,307	

Bảng 25 Các gen chuyển hóa lipid đáp ứng với DPA 11 μ M				
Kí hiệu	Tên gen trong Entrez	ID gen của người trong Entrez	Mức độ thay đổi	(Các) thuốc đã biết ảnh hưởng đến sự biểu hiện
gồm EG:10630)				
PGF	yếu tố tăng trưởng nhau thai	5228	-1,284	aflibercept
PIP4K2B	phosphatidylinositol-5-phosphat kinaza, typ II, beta	8396	-1,578	
PLA2G16	phospholipaza A2, nhóm XVI	11145	-1,337	
PLIN5	perilipin 5	440503	-1,371	
PTGR2	prostaglandin reductaza 2	145482	-1,416	
PTX3	pentraxin 3, dài	5806	-1,536	
RGS2 (bao gồm EG:19735)	chất điều hòa tín hiệu protein G 2, 24kDa	5997	1,289	
STIP1	phosphoprotein 1 gây ra do căng thẳng	10963	-1,469	

Các tác dụng của DPA lên sự biểu hiện của một số gen này gợi ý rằng DPA, ở nồng độ in vivo tương tự, sẽ dẫn đến cải thiện nhiều thông số lipid liên quan lâm sàng khác nhau.

Ví dụ, DPA ở 11 μM điều chỉnh tăng ACADSB, axyl-CoA dehydrogenaza mạch ngắn/phân nhánh. Sản phẩm gen ACADSB có liên quan trong việc phá vỡ triglycerit; việc điều chỉnh tăng được mong đợi để tạo ra hàm lượng triglycerit huyết thanh thấp hơn. HMGCR, được điều chỉnh giảm, mã hoá HMG-CoA reductaza, enzym hạn chế tốc độ trong việc tổng hợp cholesterol và đích của việc ức chế bằng statin. Do đó, tương tự như hoạt tính của statin, việc điều chỉnh giảm sự biểu hiện của gen HMGCR bởi DPA sẽ dẫn đến làm giảm có lợi tỉ lệ cholesterol toàn phần:HDL. SQLE, cũng được điều chỉnh giảm, mã hoá squalen epoxidaza, xúc tác bước oxy hóa thứ nhất trong quá trình sinh tổng hợp sterol và được cho là một trong các enzym hạn chế tốc độ trong quá trình này. Việc điều chỉnh giảm SQLE cũng sẽ dẫn đến làm giảm hàm lượng cholesterol toàn phần.

Tóm tắt các kết quả mô tả sự biểu hiện

Thử nghiệm mô tả biểu hiện bằng cách sử dụng dòng tế bào gan chứng tỏ rằng DPA có hoạt tính sinh học đáng kể ở nồng độ xấp xỉ mức huyết tương quan sát thấy ở người bệnh được cho dùng liều hằng ngày 4g của mẻ được phẩm giàu DPA được nêu làm ví dụ.

Ở nồng độ này, DPA ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen trong nhiều con đường chuyển hóa, bao gồm các gen thuộc nhóm đã biết là liên quan đến các tác dụng lâm sàng của các axit béo đa bất bão hòa omega-3: các gen liên quan đến chuyển hóa lipid, các gen liên quan đến sinh lý học tim mạch, và các gen liên quan đến chứng viêm. Các tác dụng thứ cấp đáng kể được mong đợi, với các thay đổi quan sát được trong sự biểu hiện gen mã hoá các protein mà chính các protein này lại ảnh hưởng đến sự biểu

hiện gen, và trong các gen mã hoá các protein ảnh hưởng đến sự cải biến sau phiên mã.

Các tác dụng cụ thể lên sự biểu hiện của một số gen liên quan đến chuyển hóa lipid gợi ý rằng DPA, ở nồng độ in vivo tương tự, sẽ dẫn đến cải thiện các thông số lipid liên quan đến lâm sàng khác nhau. Cụ thể là, các tác giả sáng chế đã quan sát thấy việc điều chỉnh tăng ACADSB được điều khiển bởi DPA, axyl-CoA dehydrogenaza mạch ngắn/phân nhánh, được mong đợi để thu được hàm lượng triglycerit huyết thanh thấp hơn; việc điều chỉnh giảm HMGCR, giống như điều trị bằng các statin, sẽ dẫn đến làm giảm có lợi tỉ lệ cholesterol toàn phần:HDL; và việc điều chỉnh giảm SQLE, tương tự sẽ dẫn đến làm giảm hàm lượng cholesterol toàn phần.

Các tác dụng này có thể phân biệt được với các tác dụng thấy được đối với EPA và DHA.

Thử nghiệm này thể hiện tác dụng phụ thuộc liều có ý nghĩa thống kê của DPA, với nồng độ thấp hơn, được chọn để bắt chước nồng độ DPA thấp hơn 10 lần trong chế phẩm chứa axit tự do omega-3 trước đó, ảnh hưởng đến các gen ít hơn 10 lần so với nồng độ DPA cao hơn, được chọn để bắt chước việc tiếp xúc trong huyết tương quan sát được trong thử nghiệm lâm sàng của dược phẩm giàu DPA được mô tả trong bản mô tả này. Ít nhất liên quan đến 300 gen chỉ được điều chỉnh bởi nồng độ DPA cao hơn – đặc biệt bao gồm các gen ảnh hưởng có lợi đến chuyển hóa lipid – nồng độ DPA thấp hơn tạo ra tác dụng dưới ngưỡng, và được mong đợi để tạo ra liều in vivo thấp hơn liều điều trị.

Ví dụ 7: Thử nghiệm lâm sàng ECLIPSE

Các thuốc

Lovaza[®] – Việc kê đơn viên nang Lovaza[®] được thu thập qua các nguồn thương mại Mỹ. Theo nhãn sản phẩm được FDA phê chuẩn, mỗi viên nang Lovaza[®]

1 gam chứa ít nhất 900 mg este etyl của axit béo omega-3 có nguồn gốc từ dầu cá, chủ yếu là hỗn hợp este etyl của axit eicosapentaenoic (EPA - xấp xỉ 465 mg) và axit docosahexaenoic (DHA - xấp xỉ 375 mg). Việc phân tích thành phần độc lập không được thực hiện.

Thuốc nghiên cứu (Epanova[®]) – viên nang geletin mềm loại A của lợn được bao bằng Eudragit NE 30-D (Evonik Industries AG) được chuẩn bị, mỗi viên chứa một gam chế phẩm chứa PUFA trong đó axit béo đa bất bão hòa có mặt ở dạng axit béo tự do (“API”). API được tạo nang có thành phần được nêu trong Bảng 26.

Bảng 26		
Loại PUFA		API
(tên thông thường)	(chiều dài mạch cacbon: số liên kết đôi, loại omega)	(chế phẩm chứa axit béo tự do cuối) (% a/a)
axit linoleic	18:2 n-6	0,55
axit gama-linolenic	18:3 n-6	0,15
axit α -linolenic	18:3 n-3	0,39
axit moroctic	18:4 n-3	1,70
axit eicosadienoic	20:2 n-6	0,10
axit dihomogama-linolenic (DGLA)	20:3 n-6	0,35
axit arachidonic (AA)	20:4 n-6	2,43
axit eicosatrienoic	20:3 n-3	0,15
axit eicosatetraenoic	20:4 n-3	2,18
axit eicosapentaenoic (EPA)	20:5 n-3	57,25
axit heneicosapentaenoic	21:5 n-3	2,79
axit docosapentaenoic	22:5 n-6	0,83
axit docosapentaenoic (DPA)	22:5 n-3	6,23
axit docosahexaenoic (DHA)	22:6 n-3	19,58
	Tổng số %	98,43
	PUFA %	96,30

Bảng 26		
Loại PUFA		API
(tên thông thường)	(chiều dài mạch cacbon: số liên kết đôi, loại omega)	(chế phẩm chứa axit béo tự do cuối) (% a/a)
	Tổng số omega 3	90,26
	Tổng số omega 6	4,41
	Các PUFA còn lại	1,63
	Các chất bão hòa %	0,35
	Các chất đơn bất bão hòa %	1,35
	Các chất chưa biết %	0,42

6.7.2. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu chéo 4 chiều, nhãn mở, liều đơn, được ngẫu nhiên hóa về sinh khả dụng được tiến hành với hai nhóm điều trị khác nhau: 4 gam Epanova[®] hoặc 4 g Lovaza[®], mỗi thuốc được dùng cùng với chế độ ăn ít chất béo và nhiều chất béo cho 54 người trưởng thành khỏe mạnh. Fig.4 thể hiện phác đồ điều trị minh họa thiết kế nghiên cứu: nói ngắn gọn, sau giai đoạn rửa thuốc, các đối tượng được ngẫu nhiên hóa vào một trong hai trình tự điều trị:

- (i) Epanova[®] (ít chất béo) → Lovaza[®] (ít chất béo) → Epanova[®] (nhiều chất béo) → Lovaza[®] (nhiều chất béo), hoặc
- (ii) Lovaza[®] (ít chất béo) → Epanova[®] (ít chất béo) → Lovaza[®] (nhiều chất béo) → Epanova[®] (nhiều chất béo).

Chế độ ăn trong giai đoạn ít chất béo (giai đoạn 1 và 2): không ăn bữa sáng (bị đói); bữa trưa không chất béo (0 g chất béo; 600 kcal) sau khi lấy máu 4 giờ; bữa tối ít chất béo (9 g chất béo; 900 kcal) sau khi lấy máu 12 giờ. Các món ăn ít chất béo là: sữa chua không chứa chất béo, cốc hoa quả, Fig Newtons không chứa chất béo, suất

ăn Lean Cuisine. Chế độ ăn trong giai đoạn nhiều chất béo (giai đoạn 3 và 4): bữa sáng nhiều chất béo (20 g chất béo; 600 kcal) ngay sau khi lấy máu 0,5 giờ; bữa trưa nhiều chất béo (30 g chất béo; 900 kcal) sau khi lấy máu 4 giờ; và bữa tối nhiều chất béo (30 g chất béo; 900 kcal) sau khi lấy máu 12 giờ. Các món ăn nhiều chất béo là: bánh kẹp ăn sáng & bánh rán nhỏ phủ bột; bánh pítta phomat; lát khoai tây rán; và bánh kẹp Ý phomat và giăm bông.

Các yêu cầu về rửa thuốc sàng lọc tiền thử nghiệm là: 60 ngày dùng sản phẩm bổ sung dầu cá, EPA hoặc DHA hoặc thức ăn được làm giàu; 7 ngày dùng cá, hạt lanh, hạt tía tô, cây gai dầu, tảo xoắn, hoặc dầu quả phúc bồn đen, các statin, chất gắn kết axit mật, chất ức chế hấp thu cholesterol hoặc các fibrat. Giai đoạn rửa thuốc chéo là ít nhất 7 ngày.

Buổi tối trước khi khám tại bệnh viện, các đối tượng được ăn bữa tối ít chất béo 12 giờ trước thời điểm 0 của mỗi giai đoạn điều trị (9 g chất béo; 900 kcal). Sản phẩm nghiên cứu (Epanova[®] hoặc LOVAZA[®]) được dùng vào buổi sáng sau khi lấy máu trước dùng thuốc (thời điểm 0). Lấy mẫu máu nghiên cứu được động học trong mỗi giai đoạn điều trị 2 ngày ở -1,0, -0,5 và 0 giờ (trước dùng liều) và sau dùng liều ở 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 và 12 giờ (+/- 5 phút) đối với ngày thứ 1 và ở 24 giờ (+/- 15 phút) đối với ngày thứ 2.

Phân tích dược động học và thống kê

Các thông số dược động học sau của nồng độ EPA và DHA huyết tương được tính mức độ thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu trong tổng số và mỗi nồng độ EPA và DHA riêng rẽ bằng phương pháp không chia ngăn chuẩn: AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, C_{max} , và T_{max} .

Yếu tố quyết định chủ yếu của sinh khả dụng: diện tích dưới đường cong nồng độ trong huyết tương so với thời gian (AUC_t) được chuyển dạng ln và nồng độ trong

huyết tương lớn nhất đo được ($C_{\max}$) trong khoảng 24 giờ đối với thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu trong tổng số và mỗi nồng độ EPA và DHA riêng rẽ.

Các nồng độ trong huyết tương được hiệu chỉnh so với mức ban đầu trước khi tính các thông số dược động học. Các hình vẽ được vẽ đồ thị đối với các thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu về số trung bình nhân (được chuyển dạng ln).

Phân tích phương sai (ANOVA) được sử dụng để đánh giá các thông số dược động học được chuyển dạng ln về sự khác biệt do điều trị, giai đoạn, trình tự dùng liều và các đối tượng trong trình tự.

Tỉ lệ giữa các giá trị trung bình được tính bằng cách sử dụng trung bình bình phương tối thiểu đối với AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ cục, và $C_{\max}$ được chuyển dạng ln.

Các tỉ lệ giữa các giá trị trung bình và khoảng tin cậy 90% của chúng là nằm trên giới hạn trên 125,00% đối với AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ cục và $C_{\max}$ để thể hiện Epanova® có sinh khả dụng tương đối nổi trội so với Lovaza® về chế độ ăn.

Kết quả

Quần thể nghiên cứu - Nghiên cứu này tuyển chọn 54 người trưởng thành khỏe mạnh, 41 nam (75,9%) và 13 nữ (24,1%), ở độ tuổi từ 21 đến 77. Tất cả các giai đoạn điều trị được hoàn thành bởi 51 đối tượng (94,4%), với 53 đối tượng (98,1%) hoàn thành phần ít chất béo của nghiên cứu. Quần thể này chủ yếu là người da đen hoặc người Mỹ gốc Phi (66,7%) với 31,5% là người da trắng và 1,8% là người châu Á.

Sinh khả dụng - Fig.5 so sánh sinh khả dụng của tổng EPA+DHA (thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu) sau liều đơn (4g) của Lovaza® trong các giai đoạn ăn nhiều chất béo và ít chất béo (dùng thuốc trong tình trạng bị đói), xác nhận rằng sinh khả dụng của Lovaza® bị giảm đáng kể với chế độ ăn ít chất béo. Thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu về tổng hàm lượng EPA+DHA huyết tương thể hiện rằng AUC_t đối với Lovaza® trong giai đoạn ăn chế độ ăn ít chất béo được giảm xuống 83,3% so với Lovaza® trong giai đoạn ăn chế độ ăn nhiều chất béo: 661,6 so

với 3959,5 nmol-giờ/ml, tương ứng ($p < 0,0001$) (dữ liệu trung bình LS trong Bảng 27 dưới đây). C_{MAX} của Lovaza[®] trong giai đoạn ăn ít chất béo được giảm xuống 80,6% so với giai đoạn ăn nhiều chất béo ($p < 0,0001$) và T_{MAX} được tăng lên 62% trong giai đoạn ăn ít chất béo so với giai đoạn ăn nhiều chất béo (10,2 so với 6,3 giờ, tương ứng; $p = 0,0001$).

Bảng 27							
	Trung bình bình phương tối thiểu					Giới hạn khoảng tin cậy 90% (%)	
Thông số sinh khả dụng	Ít chất béo	Nhiều chất béo	Tỉ lệ giữa các giá trị trung bình (%)	Giá trị P ^a	C.V. trong đối tượng % ^b	Dưới	Trên
Thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu							
AUC_t (nmol•giờ/ml)	661,63	3959,52	16,7	<0,0001	69,1	3,47	29,95
C_{max} (nmol/ml)	86,89	448,63	19,4	<0,0001	70,7	5,50	33,23
T_{max} (giờ)	10,19	6,28	162,3	0,0001	54,5	138,32	186,24
Dữ liệu thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu (được chuyển dạng Ln) (số trung bình nhân)							
$\ln AUC_t$ (nmol•giờ/ml)	652,06	3468,17	18,8	<0,0001	55,3	15,72	22,49
$\ln C_{max}$ (nmol/ml)	60,61	398,07	15,2	<0,0001	69,2	12,35	18,78

N = 53

^a giá trị p là đối với sự khác biệt trung bình bình phương tối thiểu (LS) giữa Epanova[®] và Lovaza[®] từ mô hình ANOVA

^b hiệp phương sai %

Fig.6 so sánh sinh khả dụng của tổng EPA+DHA (thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu) trong giai đoạn ăn nhiều chất béo sau liều đơn (4g) của Lovaza[®] so

với liều đơn (4g) của Epanova[®], thể hiện rằng giai đoạn ăn chế độ ăn nhiều chất béo, trong đó sinh khả dụng của Lovaza[®] được xác nhận là lớn nhất, thì sinh khả dụng của EPA + DHA khi được dùng ở dạng axit béo tự do (Epanova[®]) lớn hơn đáng kể so với chế phẩm chứa omega-3 dạng este etyl tương ứng (Lovaza[®]) ($p < 0,0007$).

Fig.7 so sánh sinh khả dụng của tổng EPA+DHA (thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu) sau liều đơn của Epanova[®] so với Lovaza[®] trong giai đoạn ăn chế độ ăn ít chất béo, thể hiện rằng thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu trong tổng hàm lượng EPA+DHA huyết tương có AUC_t của Epanova[®] lớn hơn 4,6 lần so với Lovaza[®] trong giai đoạn ăn chế độ ăn ít chất béo: 3077,8 so với 668,9 nmol-giờ/ml, tương ứng ($p < 0,0001$) (dữ liệu trung bình LS trong Bảng 28 dưới đây). C_{max} của Epanova[®] lớn hơn 3,2 lần so với Lovaza[®] ($p < 0,0001$) và T_{max} ngắn hơn 20% so với LOVAZA[®] (lần lượt 8 so với 10 giờ; $p = 0,0138$).

Bảng 28

Bảng 28								
Thông số sinh khả dụng	Trung bình bình phương tối thiểu		Tỉ lệ giữa các giá trị trung bình (%)	Giá trị P ^a	C.V. trong đối tượng % ^b	C.V. giữa các đối tượng % ^b	Giới hạn khoảng tin cậy 90% (%)	
	Epanova [®]	Lovaza [®]					Dưới	Trên
Thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu								
AUC _t (nmol•giờ/ml)	3077,83	668,95	460,10	<0,0001	62,9	253	402,77	517,42
C _{max} (nmol/ml)	277,58	86,35	321,46	<0,0001	71,6	48,9	27236	370,56
T _{max} (giờ)	8,08	10,21	79,23	0,0138	45,8	24,6	65,60	92,86
Dữ liệu thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu (được chuyển dạng Ln) (số trung bình nhân)								
Ln AUC _t (nmol•giờ/ml)	2651,41	658,09	402,90	<0,0001	63,9	243	329,71	492,33
Ln C _{max} (nmol/ml)	225,79	60,70	371,95	<0,0001	66,3	42,7	304,37	454,53

N = 53

^a giá trị p là đối với sự khác biệt trung bình bình phương tối thiểu (LS) giữa Epanova[®] và Lovaza[®] từ mô hình ANOVA^b hiệp phương sai %

Fig.8 so sánh sinh khả dụng của EPA (thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu) sau liều đơn của Epanova[®] so với Lovaza[®] trong giai đoạn ăn chế độ ăn ít chất béo, thể hiện AUC_t của Epanova[®] lớn hơn 13,5 lần so với Lovaza[®] trong giai đoạn ăn chế độ ăn ít chất béo: lần lượt 578,2 so với 42,7 µg·giờ/ml, ($p<0,0001$) (dữ liệu trung bình LS được biểu thị trong Bảng 29 dưới đây). C_{MAX} của Epanova[®] lớn hơn 5,6 lần so với Lovaza[®] ($p<0,0001$) và T_{MAX} ngắn hơn 12% so với Lovaza[®] (lần lượt 8 so với 9 giờ; $p=0,2605$).

Bảng 29

Bảng 29								
Thông số sinh khả dụng	Trung bình bình phương tối thiểu		Tỉ lệ giữa các giá trị trung bình (%)	Giá trị p ^a	C.V. trong đối tượng % ^b	C.V. giữa các đối tượng % ^b	Giới hạn khoảng tin cậy 90% (%)	
	Epanova®	Lovaza®					Dưới	Trên
Thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu								
AUC _t (µg•giờ/ml)	578,22	42,67	1355,1	<0,0001	80,8	18,2	1163,8	1546,4
C _{max} (µg/ml)	52,64	9,45	557,0	<0,0001	83,9	49,8	467,32	646,68
T _{max} (giờ)	8,06	9,13	88,28	02605	54,7	25,8	71,02	105,54
Dữ liệu thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu (được chuyển dạng Ln) (số trung bình nhân)								
Ln AUC _t (µg •giờ/ml)	495,66	48,65	457,09	<0,0001	93,0	23,5	713,46	1283,9
Ln C _{max} (µg/ml)	39,02	4,66	837,53	<0,0001	102,1	52,3	630,85	1111,9
N = 53								
^a giá trị p là đối với sự khác biệt trung bình bình phương tối thiểu (LS) giữa Epanova® và Lovaza® từ mô hình ANOVA								
^b Hiệp phương sai %								

Fig.9 so sánh sinh khả dụng của DHA (thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu) sau liều đơn của Epanova[®] so với Lovaza[®] trong giai đoạn ăn chế độ ăn ít chất béo, thể hiện AUC_t của Epanova[®] lớn hơn 2,2 lần so với Lovaza[®] trong giai đoạn ăn chế độ ăn ít chất béo: lần lượt 383,1 so với 173,4 $\mu\text{g}\cdot\text{giờ}/\text{ml}$, ($p<0,0001$) (dữ liệu trung bình LS được biểu thị trong Bảng 30 dưới đây). C_{max} của Epanova[®] lớn hơn 1,9 lần so với Lovaza[®] ($p<0,0001$) và T_{MAX} ngắn hơn 21% so với Lovaza[®] (lần lượt 8 so với 11 giờ; $p=0,0148$). Sinh khả dụng của DHA trong Epanova[®] lớn hơn 2,2 lần so với Lovaza[®] xảy ra mặc dù có ít hơn 42% DHA trong chế phẩm Epanova[®].

Bảng 30

Bảng 30								
Thông số sinh khả dụng	Trung bình bình phương tối thiểu		Tỉ lệ giữa các giá trị trung bình (%)	Giá trị p ^a	C.V. trong đối tượng % ^b	C.V. giữa các đối tượng % ^b	Giới hạn khoảng tin cậy 90% (%)	
	Epanova®	Lovaza®					Dưới	Trên
Thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu								
AUC _t (µg•giờ/ml)	383,06	173,40	220,91	<0,0001	55,2	32,1	192,10	249,72
C _{max} (µg/ml)	35,50	19,19	185,02	<0,0001	66,0	48,3	154,43	215,61
T _{max} (giờ)	8,45	10,72	78,84	0,0148	47,3	24,0	64,82	92,87
Dữ liệu thay đổi được hiệu chỉnh so với mức ban đầu (được chuyển dạng Ln) (số trung bình nhân)								
Ln AUC _t (µg •giờ/ml)	337,09	162,19	207,84	<0,0001	61,3	21,4	171,98	251,17
Ln C _{max} (µg/ml)	30,17	15,00	201,14	<0,0001	52,5	42,2	170,73	236,96

N = 53

^a giá trị p là đối với sự khác biệt trung bình bình phương tối thiểu (LS) giữa Epanova[®] và Lovaza[®] từ mô hình ANOVA^b hiệp phương sai %

Các Fig.10A và 10B thể hiện các đáp ứng AUC_{0-t} của từng đối tượng trong giai đoạn ăn ít chất béo và nhiều chất béo được tính dưới dạng tỉ lệ (%) của AUC_{0-t} ít chất béo so với AUC_{0-t} nhiều chất béo. Các tỉ lệ âm không được vẽ đồ thị. Dữ liệu này thể hiện rằng trong giai đoạn ăn chế độ ăn ít chất béo, 30 trong 54 (56%) đối tượng dùng Epanova® (axit béo tự do) so với 3 trong 52 (6%) đối tượng dùng Lovaza® (este etyl) duy trì được $AUC_t \geq 50\%$ của AUC_t trong giai đoạn ăn chế độ ăn nhiều chất béo tương ứng.

Tổng số 51 biến cố bất lợi được báo cáo bởi 29 đối tượng. Các biến cố bất lợi phổ biến nhất là đau đầu (10 đối tượng) và phân lỏng hoặc tiêu chảy (9 đối tượng). Tất cả các biến cố bất lợi có mức độ nhẹ, và không trầm trọng. Không có sự thay đổi có ý nghĩa lâm sàng trong các đánh giá xét nghiệm, dấu hiệu sinh tồn hoặc thể chất.

Kết luận

Thay đổi được điều chỉnh theo thời điểm ban đầu về kiểu hấp thu của tổng EPA+DHA và EPA và DHA riêng rẽ (AUC) với Epanova® (PUFA omega-3 ở dạng axit tự do) lớn hơn đáng kể so với Lovaza® (este etyl PUFA omega-3) trong giai đoạn ăn nhiều chất béo và đột ngột tốt hơn trong giai đoạn ăn ít chất béo. Ngoài ra, có ảnh hưởng rất sâu sắc của hàm lượng chất béo của chế độ ăn lên sinh khả dụng của Lovaza®, còn sinh khả dụng của Epanova® có thể dễ dự đoán hơn do chỉ ảnh hưởng vừa phải bởi chế độ ăn. Sinh khả dụng độc lập với chất béo nổi trội của Epanova® so với Lovaza® là quan trọng về mặt lâm sàng do các đối tượng bị chứng tăng triglycerit nặng cần chế độ ăn rất ít chất béo. Các kết quả này chứng minh ưu điểm trị liệu đáng kể của chế phẩm chứa Omega-3 dạng axit béo tự do để điều trị chứng tăng triglycerit huyết nặng khi xem xét khuyến cáo của NCEP ATP III để dùng cho các đối tượng cần tuân thủ chế độ ăn ít chất béo trong khi trị liệu hỗ trợ.

Ví dụ 8: Thử nghiệm sinh khả dụng tương đối 14 ngày

Để xác định xem các tác dụng có quan sát được sau khi dùng duy trì liều đơn sau khi dùng liều lặp lại hay không, nghiên cứu trong thời gian dài hơn được thực hiện. Fig.11 là phác đồ điều trị minh họa thiết kế thử nghiệm sinh khả dụng tương đối 14 ngày, trong đó thuốc nghiên cứu (Lovaza® hoặc Epanova®) được dùng cùng với bữa sáng ít chất béo. Ngược lại, các liều được dùng khi đói trong nhánh ăn ít chất béo của thử nghiệm ECLIPSE ban đầu được mô tả trong ví dụ 7.

Các thay đổi từ thời điểm ban đầu đến trạng thái ổn định về hàm lượng EPA và DHA trong nhánh Lovaza® có sinh khả dụng tương đối 14 ngày là phù hợp với các nghiên cứu trước đó, như được thể hiện trong bảng 31, các nghiên cứu này thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi trung bình của EPA và DHA trong các nghiên cứu trước đó được nêu.

Bảng 31 Các nghiên cứu bên thứ ba trước đó					
Thuốc	Nghiên cứu	Số đối tượng	Số tuần	Δ EPA (%)	Δ DHA (%)
omega-3 ethyl este	CK85-013	17	8	276	34
	CK85-014	54	12	300	50
	CK85-017	29	12	300	50
	CK85-019	26	12	200	29
	CK85-022	30	12	233	23
	CK85-023	28	12	139	11
	CK85-95014	30	24	260	54
	CK85-95009	22	16	173	-10*
	CK85-94010	20	6	202	77**
	CK85-95011	49	12	361**	59
	CK85-95012	6	6	156*	40

Khoảng EPA (% Δ): (156*----209----361**)

Khoảng DHA (% Δ): (-10*-----34-----77**)

Fig.12A là đồ thị thể hiện tổng nồng độ EPA+DHA không được hiệu chỉnh trung bình so với thời gian (thang tuyến tính), đối với cả hai việc điều trị bằng Lovaza® và điều trị bằng Epanova®. Fig.12B là biểu đồ thể hiện sự chênh lệch của EPA+DHA không được hiệu chỉnh (nmol/ml) đối với các thời điểm được nhóm trên Fig.12A. Các Fig.12A và 12B chứng tỏ rằng sau 14 ngày dùng liều, sự tích lũy của EPA+DHA từ Epanova® cao hơn 2,6 lần so với Lovaza® ở các đối tượng được duy trì chế độ ăn ít chất béo.

Fig.13 là đồ thị thể hiện tổng nồng độ EPA+DHA trung bình trong huyết tương được hiệu chỉnh so với mức ban đầu so với thời gian (thang tuyến tính) đối với việc điều trị bằng Lovaza® so với việc điều trị bằng Epanova® trong nghiên cứu sinh khả dụng tương đối 14 ngày, thể hiện rằng sau 14 ngày dùng liều với chế độ ăn ít chất béo, hàm lượng EPA+DHA (AUC_{0-24}) từ Epanova® cao hơn gấp 5,8 lần so với Lovaza® ở các đối tượng được duy trì chế độ ăn ít chất béo.

Fig.14A là biểu đồ thể hiện mức tăng từ thời điểm ban đầu đến trạng thái ổn định về hàm lượng trong máu không được hiệu chỉnh đối với EPA+DHA trong các nhánh dùng Lovaza® và Epanova® trong nghiên cứu sinh khả dụng tương đối 14 ngày, thể hiện rằng hàm lượng trong máu của EPA+DHA tăng lên 316% từ thời điểm ban đầu đến trạng thái ổn định trong nhóm dùng Epanova® so với 66% trong nhóm dùng Lovaza®. Fig.14B là biểu đồ thể hiện mức tăng từ thời điểm ban đầu đến trạng thái ổn định về C_{avg} không được hiệu chỉnh đối với EPA+DHA trong nhánh Lovaza® và Epanova® của nghiên cứu sinh khả dụng tương đối 14 ngày, thể hiện rằng mức nồng độ trung bình (C_{avg}) của EPA+DHA được tăng lên 448% so với thời điểm ban đầu trong nhóm dùng Epanova® so với 90% trong nhóm dùng Lovaza®.

Fig.15A là biểu đồ thể hiện mức tăng từ thời điểm ban đầu đến trạng thái ổn định về tổng hàm lượng trong máu của DHA trong các nhánh dùng Lovaza® và Epanova® trong nghiên cứu sinh khả dụng tương đối 14 ngày, thể hiện rằng hàm

lượng của DHA tăng lên 109% từ thời điểm ban đầu đến trạng thái ổn định trong nhóm dùng Epanova® so với 34% trong nhóm dùng Lovaza®. Fig.15B là biểu đồ thể hiện mức tăng từ thời điểm ban đầu đến trạng thái ổn định của mức C_{avg} DHA trong nhóm dùng Epanova® so với nhóm dùng Lovaza® trong nghiên cứu sinh khả dụng tương đối 14 ngày, thể hiện rằng mức nồng độ trung bình (C_{avg}) của DHA được tăng lên 157% so với thời điểm ban đầu trong nhóm dùng Epanova® so với 47% trong nhóm dùng Lovaza®.

Fig.16A là biểu đồ thể hiện mức tăng từ thời điểm ban đầu đến trạng thái ổn định về tổng hàm lượng EPA trong máu trong các nhánh dùng Lovaza® và Epanova® trong nghiên cứu sinh khả dụng tương đối 14 ngày, thể hiện rằng hàm lượng EPA tăng lên 1021% từ thời điểm ban đầu đến trạng thái ổn định trong nhóm dùng Epanova® so với 210% trong nhóm dùng Lovaza®. Fig.16B là biểu đồ thể hiện mức tăng nồng độ trung bình từ thời điểm ban đầu đến trạng thái ổn định, và thể hiện rằng mức C_{avg} của EPA được tăng lên 1.465% so với thời điểm ban đầu trong nhóm dùng Epanova® so với 297% trong nhóm dùng Lovaza®.

Dữ liệu này thể hiện rằng việc tăng sinh khả dụng quan sát được sau khi dùng liều đơn trong thử nghiệm ECLIPSE được duy trì, thậm chí tăng, trong thời gian lâu hơn (2 tuần). Ngoài ra, các dữ liệu cụ thể theo đối tượng riêng lẻ (không được chỉ ra) minh họa rằng đối tượng có đáp ứng ít nhất với Epanova® vẫn có C_{max} EPA+DHA ngày 14 lớn hơn so với đối tượng có đáp ứng tốt nhất với Lovaza®.

C_{avg} và tổng hàm lượng trong máu của loại PUFA omega-3 liên quan về mặt lâm sàng tăng đạt được với Epanova® so với Lovaza® dự đoán hiệu lực được cải thiện một cách đáng kể trong việc làm giảm hàm lượng triglycerit huyết thanh và trong việc làm giảm nguy cơ mắc bệnh tim mạch.

Ví dụ 9: Nghiên cứu 13 tuần trên chuột

Nghiên cứu này so sánh việc tiếp xúc với omega-3 và tác dụng của nó lên hàm lượng lipid huyết thanh ở chuột được điều trị bằng các liều tương đương của Epanova® hoặc LOVAZA® trong 13 tuần.

Chuột Sprague Dawley được chọn cho nghiên cứu này do nó là chủng chuột được sử dụng trong chương trình nghiên cứu độc chất được tiến hành với Lovaza®, và do đó, cho phép so sánh trực tiếp dữ liệu từ nghiên cứu này được thực hiện với Epanova® với dữ liệu độc chất trên chuột công bố công khai trong Lovaza® Summary Basis of Approval. Thiết kế nghiên cứu này đưa ra đánh giá độc chất thiết thực của Epanova® với việc chọn lọc liều dựa trên dữ liệu độc chất trên chuột công bố công khai đối với Lovaza® (liều lớn nhất dung nạp được = 2000 mg/kg). Chuột Sprague Dawley tạo ra mô hình được công nhận để dự đoán tác dụng của các PUFA omega-3 lên các thay đổi lipid đối với triglycerit và cholesterol toàn phần ở đối tượng là người. Các kết quả ở 13 tuần được thể hiện trong Bảng 32 dưới đây.

Bảng 32						
Điều trị	Giới tính	Tiếp xúc DHA ^a		Tiếp xúc EPA ^a		TG (% khác biệt so với đối chứng)
		AUC ₍₀₋₄₎ (µg·giờ/ml)	C _{max} (µg/ml)	AUC ₍₀₋₄₎ (µg·giờ/ml)	C _{max} (µg/ml)	
Epanova [®]	Đực	15,56	1,82	14,02	2,15	-32
	Cái	13,00	2,05	9,50	1,38	-53
	Cả hai	14,28	1,94	11,76	1,77	-43
Lovaza [®]	Đực	6,55	0,47	7,57	0,73	-14
	Cái	4,97	0,40	6,04	0,55	-38
	Cả hai	5,76	0,43	6,81	0,64	-26

AUC₍₀₋₄₎ diện tích dưới đường cong nồng độ trong huyết tương-thời gian đến thời điểm lấy mẫu cuối. Do việc tiếp xúc toàn thân

C_{max} Nồng độ lớn nhất trong huyết tương

^a Liều được chuẩn hoá giá trị dựa trên liều ước tính của DHA và EPA

Như được thể hiện trong bảng 32, Epanova® không chỉ tạo ra nồng độ tối đa trong huyết tương (C_{max}) của DHA và EPA cao hơn rõ rệt so với Lovaza®, mà còn tạo ra $AUC_{(0-t)}$ cao hơn rõ rệt đối với hai loại omega-3; $AUC_{(0-t)}$ là thước đo mức độ tiếp xúc toàn thân. Sinh khả dụng lớn hơn và mức độ tiếp xúc toàn thân trong thời gian dài của hai loại PUFA omega-3 này với việc trị liệu bằng Epanova® dẫn đến khác biệt trong thời gian dài về hiệu lực làm giảm lipid, với Epanova® có tác dụng làm giảm triglycerit huyết tương và cholesterol toàn phần lớn hơn đáng kể so với tác dụng thấy được với LOVAZA®. Do đó, các chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này tạo ra hiệu lực lớn hơn về hai thông số tim mạch quan trọng về mặt lâm sàng.

Ví dụ 10: Thử nghiệm EVOLVE

Các thuốc

Thuốc nghiên cứu (Epanova®) – viên nang gelatin mềm loại A của lợn được chuẩn bị, mỗi viên chứa một gam (1g) chế phẩm chứa PUFA bao gồm các PUFA omega-3 ở dạng axit tự do ("API"). Viên nang này được bao bằng Eudragit NE 30-D (Evonik Industries AG). API có thành phần được nêu trong mê 2 của Bảng 10 (xem ví dụ 4, trên đây).

Giả dược – Viên nang được điều chế chứa dầu oliu để sử dụng làm đối chứng.

Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu 12 tuần, mù đôi, được đối chứng bằng dầu oliu được thực hiện ở Mỹ, Đan Mạch, Hungary, Ấn Độ, Hà Lan, Nga, và Ukraina. Các đối tượng được chọn dựa trên hàm lượng triglycerit cao, nằm trong khoảng 500–2.000 mg/dl. Các đối tượng được chọn ngẫu nhiên để nhận 2, 3, hoặc 4 gam Epanova®, hoặc 4 gam dầu oliu dưới dạng giả dược. Thiết kế thử nghiệm chung được minh họa trên Fig.17, với Fig.18 đưa ra phác đồ điều trị chi tiết hơn xác định thời điểm của các lần khám trong nghiên cứu. Chỉ tiêu lâm sàng chính của nghiên cứu là tỉ lệ phần trăm thay đổi về hàm lượng triglycerit huyết tương từ thời điểm ban đầu đến kết thúc điều trị ("EOT"). Chỉ

tiêu lâm sàng phụ là tỉ lệ phần trăm thay đổi về cholesterol không có lipoprotein tỷ trọng cao ("non-HDL-C") trong huyết tương từ thời điểm ban đầu đến EOT.

Kết quả

Fig.19 thể hiện sự bố trí tất cả các đối tượng, với "AE" là từ viết tắt của "adverse event" ("biến cố bất lợi") và "SAE" là từ viết tắt của "serious adverse event" ("biến cố bất lợi nghiêm trọng").

Tổng số 1.356 đối tượng được sàng lọc ban đầu, và trong số đó, 399 đối tượng được chọn để tham gia vào nghiên cứu này. Trong số 399 đối tượng, 99 đối tượng nhận giả được dầu oliu, 100 đối tượng nhận Epanova® 2 g/ngày; 101 đối tượng nhận Epanova® 3 g/ngày; và 99 đối tượng nhận Epanova® 4 g/ngày. Bảng 33 thể hiện phép đo triglycerit (TG) và cholesterol trung bình đối với các đối tượng được ngẫu nhiên hóa (trước khi điều trị), so sánh với hàm lượng mong muốn như được mô tả bởi Third Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), do National Heart Lung and Blood Institute đưa ra.

Bảng 33					
Thông số	Mong muốn (mg/dl) ¹	Các bệnh nhân được ngẫu nhiên hóa trong thử nghiệm			
		4 g/ngày	3 g/ngày	2 g/ngày	Dầu oliu
TG	<150	655	715	717	686
HDL-C	>40	29	28	27	29
LDL-C	<100	90	81	77	78
Non-HDL-C	<130	225	215	205	215
VLDL-C	<30	126	124	123	125

¹ NCEP ATP III, tháng chín năm 2002

Trong số các bệnh nhân nhận dầu oliu, tổng số năm bệnh nhân rút khỏi nghiên cứu vì các lí do sau: hủy bỏ thỏa thuận (1), không tiếp tục (1), và các nguyên nhân khác (3). Trong số các bệnh nhân nhận Epanova® 2 g/ngày, tổng số bảy bệnh nhân rút lui vì các lí do sau: tác dụng bất lợi (5), hủy bỏ thỏa thuận (1), và các nguyên nhân khác (1). Trong số các bệnh nhân nhận Epanova® 3 g/ngày, tổng số 14 bệnh nhân rút lui do: tác dụng bất lợi (7), không tuân thủ (2), hủy bỏ thỏa thuận (1), không tiếp tục (3), và các nguyên nhân khác (1). Trong số các bệnh nhân nhận Epanova® 4 g/ngày, tổng số 9 bệnh nhân rút lui do: tác dụng bất lợi (5), không tuân thủ (1), hủy bỏ thỏa thuận (2), và các nguyên nhân khác (1).

Epanova® đạt được chỉ tiêu lâm sàng chính là làm giảm triglyxerit và chỉ tiêu lâm sàng phụ là làm giảm non-HDL cholesterol (mức cholesterol toàn phần trừ đi mức HDL-cholesterol) ("non-HDL-C") ở tất cả các liều, và tạo ra mức giảm có ý nghĩa thống kê trong nhiều chỉ dấu được thiết lập của quá trình tạo chứng vữa động mạch: Apo B, Apo CIII, RLP, và LpPLA2. Ở các bệnh nhân dùng phép trị liệu statin đồng thời, Epanova® tạo ra hiệu lực bổ sung trên các thông số lipid then chốt: TG; non-HDL-C; HDL-c; cholesterol toàn phần (TC); và TC/HDL-C.

Hàm lượng EPA, DHA, và DPA huyết tương – ba loại PUFA mạch dài (long chain-PUFA - lc-PUFA) omega-3 có lượng lớn nhất trong Epanova® – được đo ở thời điểm ban đầu và ở kết thúc điều trị (EOT), cũng như hàm lượng huyết tương của lc-PUFA omega-6, axit arachidonic (AA). Bảng 34 dưới đây thống kê một cách riêng rẽ huyết tương hàm lượng trung bình ở thời điểm ban đầu, trung vị ở thời điểm ban đầu, trung bình ở kết thúc điều trị (EOT), và trung vị ở EOT của EPA, DHA, DPA, và AA, cũng như TG, NHDL-C, HDL-C, VLDL-C, và LDL-C.

Hàm lượng huyết tương ở thời điểm ban đầu của EPA, DHA, DPA, và AA biểu thị sự ngẫu nhiên hóa hiệu quả của các đối tượng giữa các nhánh điều trị. Tỷ lệ EPA:AA ở thời điểm ban đầu là khoảng 0,10 (xem Bảng 37 dưới đây).

Các Fig.20A - 20E thể hiện các hàm lượng trung bình trong huyết tương ở thời điểm ban đầu và kết thúc điều trị ("EOT" - end-of-treatment) (tính theo $\mu\text{g/ml}$) của EPA (Fig.20A), DHA (Fig.20B), DPA (Fig.20C) và AA (Fig.20D), đối với mỗi nhánh điều trị trong thử nghiệm EVOLVE. Fig.20E so sánh hàm lượng EPA trung bình ở thời điểm ban đầu và EOT đối với mỗi nhánh điều trị và nhánh đối chứng (dầu oliu) với các giá trị được báo cáo trước đó của ECLIPSE (xem ví dụ 7), nghiên cứu sinh khả dụng 14 ngày (xem ví dụ 8), nghiên cứu tương tác thuốc-thuốc statin (Statin DDI), và thử nghiệm JELIS không liên quan được tiến hành bởi nhóm nghiên cứu khác với chế phẩm chứa PUFA omega-3 khác ("JELIS"). Lưu ý rằng các đối tượng người Nhật Bản trong thử nghiệm JELIS có hàm lượng EPA ở thời điểm ban đầu cao hơn. Các Fig.21A - 21D là biểu đồ thể hiện các hàm lượng trung vị trong huyết tương ở thời điểm ban đầu và kết thúc điều trị ("EOT") (tính theo $\mu\text{g/ml}$) của EPA (Fig.21A), DHA (Fig.21B), DPA (Fig.21C), và AA (Fig.21D).

Bảng 34 (Hàm lượng tuyệt đối trong huyết tương ở thời điểm ban đầu và EOT)					
		Thời điểm ban đầu (Trung bình)	EOT (Trung bình)	Thời điểm ban đầu (Trung vị)	EOT (Trung vị)
EPA (µg/ml)	2g	36,6	126,8	26,7	104
	3g	41,4	174,7	30,7	141,9
	4g	38,9	199,7	25,7	170
DHA (µg/ml)	2g	106,6	159,9	93,5	148,3
	3g	113,7	183,6	97,4	156,9
	4g	104,8	188,8	91,8	169,1
DPA (µg/ml)	2g	37,6	61,77	35,23	54,59
	3g	38,71	69,36	34,71	58,56
	4g	36,84	69,73	32,53	66,03
AA (µg/ml)	2g	377,9	327,4	358,4	279,2
	3g	394,9	344	368,8	313,8
	4g	393,9	298,1	363,4	274,2
TG (mg/dl)	2g	760,1	608,7	669	554
	3g	766,9	754,5	612	560,8
	4g	730,5	557,2	631	511
Non-HDL-C (mg/dl)	2g	219,6	208,2	205,3	209,3
	3g	223,4	221,5	215,3	197
	4g	230,7	214,1	225	211
HDL-C (mg/dl)	2g	28	30,7	27,3	29
	3g	29,1	30,4	28	28
	4g	29,9	32,2	28,7	29
V-LDL-C (mg/dl)	2g	138,1	106,9	123,3	98
	3g	143	121,5	124	93,8
	4g	143,9	100,7	126	87
LDL-C (mg/dl)	2g	83,1	101,3	77,3	93,3
	3g	84,9	99,7	81	95
	4g	90,4	113,4	90,3	109,5
ApoB (mg/dl)	2g	115,6	121,1	114	120
	3g	114,5	116	112	115

Bảng 34					
(Hàm lượng tuyệt đối trong huyết tương ở thời điểm ban đầu và EOT)					
		Thời điểm ban đầu (Trung bình)	EOT (Trung bình)	Thời điểm ban đầu (Trung vị)	EOT (Trung vị)
	4g	119,3	126,6	118	121,5
ApoCIII (mg/dl)	2g	26,5	24,3	22	21
	3g	27,8	25	27	21
	4g	27,5	22,7	27	21
RLP (mg/dl)	2g	55,5	49,7	49,7	37
	3g	62,7	54,4	54,4	34,5
	4g	58,1	43,4	43,4	33
LpPLA2 (ng/ml)	2g	270,6	236,7	266	225
	3g	271,2	241,4	244,5	223,5
	4g	266,9	223,2	249	208

Bảng 35 dưới đây thống kê mức thay đổi trung bình và mức thay đổi trung vị về hàm lượng tuyệt đối trong huyết tương từ thời điểm ban đầu đến EOT của EPA, DHA, DPA, và AA, cũng như TG, NHDL-C, HDL-C, VLDL-C, và LDL-C.

Bảng 35									
	AA (µg/ml)	EPA (µg/ml)	DPA (µg/ml)	DHA (µg/ml)	TG (mg/dl)	non-HDL-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)
Mức thay đổi trung bình từ thời điểm ban đầu đến EOT									
2g	-50,5	90,2	24,17	53,3	-183,6	-13,3	2,6	-31,2	18
3g	-50,9	133,3	30,65	69,9	-69	-6,1	1,7	-21,9	15,5
4g	-95,8	160,8	32,89	84	-220,2	-21,9	2,1	-42,5	21,7
Mức thay đổi trung vị từ thời điểm ban đầu đến EOT									
2g	-79,2	77,3	19,36	54,8	-172,2	-16	1,7	-31,5	14,8
3g	-55	111,2	23,85	59,5	-150,1	-6,7	1,8	-25,3	11,9
4g	-89,2	144,3	33,5	77,3	-178	-17	1,7	-37,7	22,3

Các Fig.22A, 22B, 26A, và 26B là biểu đồ thể hiện dữ liệu trong Bảng nêu trên, thể hiện mức thay đổi từ thời điểm ban đầu đến EOT về hàm lượng tuyệt đối trong huyết tương (tính theo $\mu\text{g/ml}$) của AA, DHA, EPA, và DPA trong mỗi nhánh điều trị của thử nghiệm EVOLVE, với Fig.22A là biểu đồ thể hiện mức thay đổi trung bình và Fig.22B thể hiện mức thay đổi trung vị so với thời điểm ban đầu.

Bảng 36A dưới đây thống kê một cách riêng rẽ tỉ lệ phần trăm thay đổi trung bình, trung vị, và trung bình bình phương tối thiểu từ thời điểm ban đầu đến EOT về hàm lượng trong huyết tương của EPA, DHA, DPA, và AA, cũng như TG, NHDL-C, HDL-C, VLDL-C, và LDL-C, trong mỗi nhánh điều trị của thử nghiệm EVOLVE.

Bảng 36B dưới đây thống kê một cách riêng rẽ tỉ lệ phần trăm thay đổi từ thời điểm ban đầu đến EOT và mức thay đổi trung bình LS của hàm lượng trung bình và trung vị trong huyết tương của ApoB, ApoCIII, LpPLA2, và RLP, trong mỗi nhánh điều trị của thử nghiệm EVOLVE.

Bảng 36A									
	AA (µg/ml)	EPA (µg/ml)	DPA (µg/ml)	DHA (µg/ml)	TG (mg/dl)	n-HDL-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)
Tỉ lệ phần trăm thay đổi trung bình từ thời điểm ban đầu đến EOT									
2g	-10,5	410,8	86,08	69	-21,2	-5,4	10	-21,2	25,6
3g	-11,2	538,1	96,59	88,4	-14,1	-3,4	5,6	-18,6	20
4g	-18	778,3	131,66	106	-25,2	-8	7,2	-27,5	26,2
Tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị từ thời điểm ban đầu đến EOT									
2g	-15,6	253,9	75,3	61,2	-25,8	-7,7	7	-24,7	21,4
3g	-17,9	317	68,6	61,9	-21,7	-3,2	6,2	-21,5	15,5
4g	-25,9	404,8	74,87	65,5	-30,7	-7,7	5	-34,7	26,2
Tỉ lệ phần trăm thay đổi trung bình LS									
2g	-15,14	267,04	--	56,72	-26,47	-7,77	7,46	-27,05	19,35
3g	-15,98	331,86	--	64,07	-24,38	-6,49	3,33	-25,62	13,94
4g	-23,2	406,32	--	71,77	-31,1	-9,76	5,71	-33,23	19,36

Bảng 36B				
	ApoB	ApoCIII	LpPLA2	RLP
Tỉ lệ phần trăm thay đổi trung bình từ thời điểm ban đầu đến EOT				
2g	5,9	-8,3	-11,3	-0,9
3g	4,6	-8,5	-8,8	-6,9
4g	5,7	-9,8	-14,1	-10,3
Tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị từ thời điểm ban đầu đến EOT				
2g	6,3	-8,7	-11,3	-20,2
3g	5,6	-12,8	-9,5	-16,2
4g	5,7	-15	-14,6	-28,2
Mức thay đổi trung bình LS (%)				
2g	3,84	-10,87	-14,93	-20,67
3g	2,28	-12,16	-11,06	-22,63
4g	3,78	-14,39	-17,17	-27,52

Fig.23A là biểu đồ thể hiện mức thay đổi trung bình từ thời điểm ban đầu đến EOT, tính theo tỉ lệ phần trăm của giá trị ban đầu, của AA, DHA, EPA, và DPA trong mỗi nhánh điều trị của thử nghiệm EVOLVE, và Fig.23B là biểu đồ thể hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị từ thời điểm ban đầu đến EOT.

Bảng 37 dưới đây thể hiện các tỉ lệ EPA/AA ở thời điểm bắt đầu và kết thúc điều trị trong mỗi nhánh điều trị của thử nghiệm EVOLVE.

Bảng 37		
Tỉ lệ EPA/AA		
	Thời điểm ban đầu	EOT
trung bình		
2g	0,096851	0,387294
3g	0,104837	0,507849
4g	0,098756	0,669909

Bảng 37 Tỉ lệ EPA/AA		
	Thời điểm ban đầu	EOT
trung vị		
2g	0,074498	0,372493
3g	0,083243	0,452199
4g	0,070721	0,619985

Như có thể thấy từ các bảng 35 và 36A và các Fig.20-23, quá trình điều trị 12 tuần bằng Epanova[®] gây tăng mạnh hàm lượng của EPA, DHA, và DPA huyết tương. Ví dụ, ở liều 2g, tỉ lệ phần trăm thay đổi trung bình từ thời điểm ban đầu đến EOT của hàm lượng EPA huyết tương là 411%; ở liều 4g là 778%. Tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị của hàm lượng EPA huyết tương lần lượt là 254% và 405%. Ở liều 2g, tỉ lệ phần trăm thay đổi trung bình từ thời điểm ban đầu đến EOT của hàm lượng DHA huyết tương là 69%; ở liều 4g, tỉ lệ phần trăm thay đổi trung bình này là 106%. Tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị của hàm lượng DHA huyết tương có vẻ ít đột ngột hơn, với mức thay đổi 61,2% ở liều 2g Epanova[®], và mức thay đổi 65,5% ở liều 4g.

Việc tăng hàm lượng huyết tương của EPA, DHA, và DPA được đi kèm với việc giảm đáng kể hàm lượng AA huyết tương, với chế độ liều 4g gây ra mức giảm trung bình là 95,8 µg/ml và mức giảm trung vị là 89,2 µg/ml, tương ứng với tỉ lệ phần trăm giảm trung bình là 18%, tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị là 25,9%, và mức thay đổi trung bình LS là 23,2%. Cần lưu ý rằng việc giảm hàm lượng axit arachidonic huyết tương này được quan sát thấy mặc dù dùng axit arachidonic ngoại sinh, có mặt ở mức 2,446% (a/a) trong mỡ Epanova[®] được sử dụng trong thử nghiệm này.

Việc tăng hàm lượng EPA huyết tương và đồng thời giảm hàm lượng AA huyết tương gây ra sự cải thiện đáng kể về tỉ lệ EPA/AA, như được thể hiện trong bảng 37, từ khoảng 0,10 ở thời điểm ban đầu đến khoảng 0,67 (trung bình) và 0,62 (trung vị) ở kết thúc điều trị ("EOT") với liều 4g.

Ngoài ra, việc điều trị bằng Epanova[®] dẫn đến giảm đáng kể hàm lượng TG, như được thể hiện trên Fig.26A và Fig.26B lần lượt là đồ thị thể hiện mức thay đổi trung bình và trung vị tuyệt đối so với thời điểm ban đầu. Fig.27 minh họa tỉ lệ phần trăm các đối tượng có mức giảm TG là 0-10%, mức giảm TG là 10-20% , mức giảm TG là 20-30%, mức giảm TG là 30-40%, mức giảm TG là 40-50%, và mức giảm TG lớn hơn 50%, đối với các liều Epanova[®] 2g và 4g.

Fig.26A và Fig.26B còn thể hiện rằng non-HDL-C và VLDL-C bị giảm, còn HDL-C tăng. Hàm lượng LDL-C cũng được tăng lên, kết quả đo này có vẻ là do tăng kích thước hạt LDL khi điều trị (được bàn luận thêm trong ví dụ 12). Tỉ lệ phần trăm thay đổi trung bình và trung vị được biểu thị lần lượt trên Fig.28A và Fig.28B.

Các hàm lượng trung bình tuyệt đối ở thời điểm ban đầu và EOT được vẽ đồ thị trên các Fig.24A - 24I đối với TG (Fig.24A), Non-HDL-C (Fig.24B), HDL-C (Fig.24C), V-LDL-C (Fig.24D), LDL-C (Fig.24E), ApoB (Fig.24F), ApoCIII (Fig.24G), RLP (Fig.24H), và LpPLA2 (Fig.24I). Các hàm lượng trung vị tuyệt đối ở thời điểm ban đầu và EOT được vẽ đồ thị trên các Fig.25A - 25I đối với TG (Fig.25A), Non-HDL-C (Fig.25B), HDL-C (Fig.25C), V-LDL-C (Fig.25D), LDL-C (Fig.25E), ApoB (Fig.25F), ApoCIII (Fig.25G), RLP (Fig.25H), và LpPLA2 (Fig.25I).

Sinh khả dụng cực kì cao của PUFA omega-3 trong Epanova[®] đã phát hiện ra các khác biệt về đáp ứng được động học trong số các loại khác trong huyết tương. Fig.29 là biểu đồ thể hiện mức độ thay đổi của tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị so với thời điểm ban đầu về hàm lượng trong huyết tương của EPA, DHA, DPA, AA, TG, non-HDL-C, và HDL-C (trị số tuyệt đối) giữa các liều 2g và 4g Epanova[®]. Bảng 38 dưới đây thống kê các kết quả này:

Bảng 38 (Mức độ thay đổi về tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị so với thời điểm ban đầu) (trị số tuyệt đối)						
EPA	DHA	DPA	AA	TG	non-HDL-C	HDL-C
0,59432847	0,07026143	0,00571049	0,66025641	0,189922	0	0,285714

Với mức tăng ít hoặc không tăng hàm lượng DHA và DPA huyết tương khi nhân đôi liều Epanova[®] từ 2g đến 4g mỗi ngày, mức độ thay đổi (độ dốc) của tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị so với thời điểm ban đầu là gần bằng không, dự đoán hàm lượng DHA và DPA huyết tương sẽ tăng thêm ít nếu liều được tăng lên nữa. Mức bằng phẳng tương tự của đáp ứng cũng thấy trong hàm lượng triglycerit, hàm lượng HDL-C, và hàm lượng non-HDL-C (số liệu không được chỉ ra).

Ngược lại, mức độ thay đổi đối với EPA vẫn cao, với độ dốc bằng 0,59; việc tăng hơn nữa hàm lượng EPA huyết tương được mong đợi đạt được nhờ tăng liều Epanova[®] trên 4g/ngày. Một cách đáng kể, mức độ thay đổi hàm lượng AA khi nhân đôi liều Epanova[®] từ 2g đến 4g mỗi ngày thậm chí còn cao hơn mức độ thay đổi đối với EPA; việc giảm hơn nữa hàm lượng AA huyết tương được mong đợi khi liều Epanova[®] được tăng lên trên 4g/ngày. Do đó, Epanova[®] thể hiện hiệu lực chưa từng thấy về khả năng làm giảm hàm lượng AA.

Tóm tắt các kết quả của thử nghiệm EVOLVE được thống kê trong Bảng 39 dưới đây.

Bảng 39																	
	OO (olive oil - dầu oliu) (n=98)				2 gam (n=99)				3 gam (n=97)				4 gam (n=99)				
	Thời điểm ban đầu (mmol/l)	%A	Thời điểm ban đầu (mmol/l)	%A	giá trị p	Chênh lệch LSM đối với OO	Thời điểm ban đầu	%A	giá trị p	Chênh lệch LSM đối với OO	Thời điểm ban đầu	%A	giá trị p	Chênh lệch LSM đối với OO	Thời điểm ban đầu	%A	giá trị p
TG	686,3	-10,4	717	-25,8	0,003	-22,1	715	-21,7	0,021	-20	655	30,7	<0,001	-26,7			
Non-HDL- C	214,5	-0,9	205,3	-7,7	0,018	-10,3	215,3	-3,2	0,042	-9	225	-7,7	0,002	-12,2			
HDL-C	28,7	2,2	27,3	7	0,088	5,5	28	6,2	0,127	1,4	28,7	5	0,127	3,7			
TC/HDL-C	8,8	-1,9	8,8	-9,5	0,024	-11,8	8,8	-7,2	0,137	-7,7	9	14,1	0,004	-12,9			
LDL-C	78,2	9,8	77,3	21,4	0,003	16,2	81	15,5	0,092	10,8	90,3	26,2	<0,001	16,3			
VLDL-C	124,5	-11,3	123,3	-24,7	0,006	-18,4	124	-21,5	0,017	-17	126	34,7	<0,001	-24,6			
ApoB	110	2,3	114	6,3	0,344	3	112	5,6	0,834	1,4	118	5,7	0,449	2,9			

Thử nghiệm EVOLVE cũng thể hiện rằng Apolipoprotein CIII (ApoCIII) được giảm một cách đáng kể khi điều trị bằng Epanova®. ApoCIII ức chế hoạt tính lipoprotein lipaza và sự hấp thu lipoprotein giàu triglycerit của gan. Hàm lượng ApoCIII tăng đã thấy là yếu tố dự đoán độc lập đối với nguy cơ bệnh tim mạch (CHD), còn ApoCIII giảm nói chung liên quan đến việc bảo vệ khỏi CHD.

Các chế phẩm axit béo omega-3 chứa DHA đã thể hiện là làm tăng LDL-C ở các bệnh nhân bị chứng tăng triglycerit huyết nặng (Kelley et al., 2009, J. Nutrition, 139(3):495-501). Tác dụng lên LDL-C này được giả thiết là kết quả của việc tăng kích thước hạt lipoprotein (Davidson et al., 2009, J. Clin. Lipidology, 3(5):332-340). Các dữ liệu lâm sàng gợi ý rằng axit eicosapentaenoic (EPA) riêng lẻ, ở liều làm giảm triglycerit xuống mức tương tự như EPA + DHA, không làm tăng LDL-C, mà cũng không làm giảm ApoCIII (Homma et al., 1991, Atherosclerosis, 91(1):145-153).

Fig.34 thể hiện sự tương quan giữa tỉ lệ phần trăm thay đổi về LDL và tỉ lệ phần trăm thay đổi về ApoCIII đối với dữ liệu từ thử nghiệm EVOLVE. Hệ số tương quan Pearson là -0,28 thu được khi các dữ liệu này được điều chỉnh khớp bằng cách sử dụng hồi quy tuyến tính, thể hiện rằng việc tăng LDL liên quan đến việc giảm ApoCIII khi điều trị bằng Epanova®. Các kết quả này là phù hợp với các báo cáo trước đó về việc tăng LDL khi dùng DHA, điều này có thể được cho là do tăng kích thước hạt lipoprotein. Các tác dụng của Epanova® lên kích thước hạt lipoprotein được bàn luận thêm trong ví dụ 12 dưới đây.

Một nhóm đối tượng, được thể hiện trong Bảng 40, biểu hiện mức tăng EPA lớn hơn 800% cùng với mức giảm hàm lượng triglycerit ít hơn 5%. Việc không đáp ứng này có thể được cho là do sự thiếu hụt hoặc suy giảm chức năng enzym lipoprotein lipaza (LPL) loại 1. LPL thủy phân triglycerit có mặt trong vi thể nhũ trấp thành các axit béo tự do, và sự suy giảm LPL đã biết là liên quan đến chứng tăng triglycerit huyết nặng (Fojo and Brewer, 1992, J. of Int. Med. 231:669-677). Các đối

tượng biểu hiện mức tăng EPA đáng kể sau khi điều trị bằng Epanova[®], được đi kèm bởi sự thay đổi nhẹ các thông số lâm sàng như hàm lượng triglycerit, hàm lượng AA, v.v., có thể được phân loại là đối tượng không đáp ứng. Các đối tượng như vậy có thể bị loại khỏi việc điều trị bằng Epanova[®].

Bảng 40

Quốc gia của đối tượng	Liều	BMI	TG thời điểm ban đầu (mg/dl)	TG EOT (mg/dl)	TG % thay đổi so với thời điểm ban đầu	EPA thời điểm ban đầu (mcg/ml)	EPA EOT (mcg/ml)	EPA % thay đổi so với thời điểm ban đầu	HbA1c thời điểm ban đầu	HbA1c EOT
Hungary	2	32,4	778	831	6,8	18,4	171,4	832	7,3	8,1
Hungary	2	33,4	924	937	1,4	11,4	133,6	1067	5,9	6,2
Hungary	2	36,2	782	803	2,6	12,5	173,6	1288	6,0	5,6
Nga	2	31,2	857	1723	101,1	22,1	243,7	1001	5,6	6,2
Hà Lan	2	27,1	511	589	15,2	15,4	257,4	1572	5,0	5,0
Ấn Độ	2	25,1	460	544	18,4	4,6	79,9	1632	6,7	6,6
US	3	34,6	1047	1077	2,8	16,7	273,7	1543	6	5,6
US	3	36	622	687	10,3	16,4	193,8	1080	6,6	7,2
US	3	31	838	870	3,8	14,3	151,2	961	5,6	6,1
US	3	40,8	888	995	12	61,8	650,6	953	8	8,7
Hungary	3	36,3	484	463	-4,3	10,1	185,3	1740	6,1	6,0
Hungary	3	29,6	647	627	-3,1	8,6	110,3	1177	6,2	6,3
Hungary	3	36,6	851	1016	19,3	10,4	94,4	811	8,2	8,6
Hungary	3	28,6	707	730	3,2	8,3	408,5	4827	5,8	6
Hungary	3	32,8	2158	2273	5,3	24,5	480,1	1863	5,6	5,1

Bảng 40

Quốc gia của đối tượng	Liều	BMI	TG thời điểm ban đầu (mg/dl)	TG EOT (mg/dl)	TG % thay đổi so với thời điểm ban đầu	EPA thời điểm ban đầu (mcg/ml)	EPA EOT (mcg/ml)	EPA % thay đổi so với thời điểm ban đầu	HbA1c thời điểm ban đầu	HbA1c EOT
Hungary	3	31,7	1034	992	-4,1	10,6	280,5	2538	5,3	5,5
Hungary	3	34,8	976	1110	13,7	22,4	224,8	905	7,3	7,9
Hungary	3	28,8	728	1210	66,1	22,4	289	1071	7,1	7,9
Ukraina	3	36,2	1664	10317	520,1	91,9	1238,8	1248	8,1	10,8
Hungary	4	30,1	714	702	-1,7	11,1	256,7	2214	5,1	5,4
Hungary	4	31,7	785	1300	65,6	11,7	466	3886	8,5	10,9
Hungary	4	27,3	513	527	2,6	16,6	198,3	1093	7,8	8
Hungary	4	31,9	508	625	23,2	3,5	198,4	5504	6	7,3
Ukraina	4	33,6	563	589	-2,5	34,9	327,9	841	7	7,3
Nga	4	29,7	664	702	5,7	38,2	795,2	1984	5,5	5,1
Nga	4	41,6	483	504	4,3	10,9	231,1	2026	6,2	6,3
Ấn Độ	4	32,8	839	1721	105,0	13,8	1066,6	7624	5,6	5,2

Ví dụ 11: Thử nghiệm tương tác thuốc-thuốc statin

Các thuốc

Thuốc nghiên cứu (Epanova[®]) – viên nang gelatin mềm loại A của lợn được chuẩn bị, mỗi viên chứa một gam (1g) chế phẩm chứa PUFA bao gồm các PUFA omega-3 ở dạng axit tự do ("API"). Viên nang này được bao bằng Eudragit NE 30-D (Evonik Industries AG). API có thành phần được nêu trong mê 3 của Bảng 9 (xem ví dụ 4, trên đây).

Thuốc nghiên cứu (Zocor[®]) – viên nén simvastatin 40 mg do Merck Sharp & Dohme Ltd. sản xuất thu được từ nguồn thương mại.

Thuốc nghiên cứu (Aspirin[®]) – viên bao tan trong ruột 81 mg do Bayer HealthCare Pharmaceuticals sản xuất thu được từ nguồn thương mại.

Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu chéo 2 chiều, nhãn mở, được ngẫu nhiên hóa được thiết kế để đánh giá tác dụng của nhiều liều Epanova[®] trên được động học nhiều liều của simvastatin ở các đối tượng bình thường khỏe mạnh. Aspirin liều thấp (81 mg) cũng được dùng hằng ngày trong cả hai nhánh nghiên cứu.

Điều kiện điều trị "A" bao gồm việc dùng phối hợp liều dùng qua đường miệng của 40 mg simvastatin (1 viên nén), 81 mg aspirin (1 viên nén) và 4 g (4 viên nang) Epanova[®], mỗi ngày một lần (mỗi 24 giờ) với 240 ml nước vào buổi sáng của ngày 1 đến 14, trong tổng số 14 liều, trong tình trạng đói. Điều kiện điều trị "B" bao gồm việc dùng liều dùng qua đường miệng của 40 mg simvastatin (1 viên nén) và 81 mg aspirin (1 viên nén) ngày một lần (mỗi 24 giờ) với 240 ml nước vào buổi sáng của ngày 1 đến 14, trong tổng số 14 liều, trong tình trạng đói. Có 14 ngày rửa thuốc giữa các đợt điều trị.

Tổng số 52 đối tượng được tuyển chọn và được ngẫu nhiên hóa về thứ tự điều trị. Trong số đó, 46 đối tượng tham gia là người Tây Ban Nha và Bồ Đào Nha.

Lấy máu để đo hàm lượng axit béo trong huyết tương (EPA, DHA, AA) ở ngày đầu (ngày 1) và ở ngày cuối (ngày 15) sau khi điều trị bằng Epanova® (điều trị "A"). Việc xác định kiểu gen được thực hiện ở các SNP khác nhau được xác nhận từ trước, bao gồm các SNP trong gen FADS1 (ví dụ, rs174546), bao gồm SNP liên quan đến việc chuyển hóa DGLA thành AA (SNP rs174537), gen FADS2, và gen Scd-1.

Kết quả

Hàm lượng trong huyết tương trung bình ở thời điểm ban đầu và kết thúc điều trị ("EOT") (tính theo $\mu\text{g/ml}$) của hàm lượng EPA được thể hiện trên Fig.20E.

Fig.56 thể hiện hàm lượng axit arachidonic (AA) huyết tương của các đối tượng được nhóm theo kiểu gen ở rs174546 SNP, ở (A) thời điểm ban đầu (tính theo $\mu\text{g/ml}$), và (B) ngày 15 điều trị bằng Epanova® (tính theo tỉ lệ phần trăm thay đổi so với thời điểm ban đầu). Đối với mỗi kiểu gen, khoảng tứ phân vị được biểu thị bằng hộp, trung vị được biểu thị bằng đường nằm ngang bên trong của hộp tứ phân vị, và trung bình được biểu thị bởi hình thoi. Các giá trị ngoại lai được biểu diễn bởi các hình tròn rỗng. Các sợi râu kéo dài giá trị không ngoại lai từ tối thiểu đến tối đa. Điểm 1 xác nhận các đối tượng là đồng hợp tử ở các alen chính; Điểm 3 xác nhận các đối tượng là đồng hợp tử ở các alen phụ; và Điểm 2 thể hiện các dị hợp tử.

Trước khi điều trị, nhóm người Tây Ban Nha và Bồ Đào Nha có tỉ lệ đồng hợp tử TT (41%) cao hơn so với tỉ lệ đồng hợp tử CC (24%) đối với SNP rs174546. Kết quả tương ứng với hàm lượng ở thời điểm ban đầu khác nhau đáng kể của EPA (CC=18 $\mu\text{g/ml}$; CT=11 $\mu\text{g/ml}$; TT=7 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,0001$) và axit arachidonic (AA) (CC=266 $\mu\text{g/ml}$; CT=202 $\mu\text{g/ml}$; TT=167 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,0001$) qua kiểu gen.

Trong đáp ứng với điều trị bằng Epanova®, quan sát thấy mức tăng EPA đáng kể, với tỉ lệ phần trăm tăng lớn nhất ở kiểu gen TT (TT: 1054%, CT:573%, CC:253%).

Ví dụ 12: Thử nghiệm ESPRIT

Các thuốc

Thuốc nghiên cứu (Epanova[®]) – viên nang gelatin mềm loại A của lợn được chuẩn bị, mỗi viên chứa một gam (1g) chế phẩm chứa PUFA bao gồm các PUFA omega-3 ở dạng axit tự do ("API"). Viên nang này được bao bằng Eudragit NE 30-D (Evonik Industries AG). API có thành phần được nêu trong mê 3 của Bảng 9 (xem ví dụ 4, trên đây).

Giả dược – Viên nang được điều chế chứa dầu oliu để sử dụng làm đối chứng.

Thiết kế nghiên cứu

Như được thể hiện trên Fig.38, một nhóm đối tượng trong nhánh điều trị liều 2g của thử nghiệm EVOLVE nhận phép trị liệu statin đồng thời biểu hiện mức thay đổi tỉ lệ phần trăm lớn hơn (chênh lệch LS trung bình), so với đối chứng, đối với TG, non-HDL-C, HDL-C, LDL-C, TC, VLDL-C, và TC/HDL-C, khi so sánh với nhóm đối tượng trong nhánh điều trị liều 2g mà không nhận phép trị liệu statin đồng thời. Các đối tượng nhận phép trị liệu statin đồng thời thể hiện đáp ứng phụ thuộc liều với Epanova[®], như được thể hiện trong dữ liệu so sánh đối với Epanova[®] 2g và Epanova[®] 4g được trình bày trên Fig.39.

Tiếp theo hiệu lực tăng quan sát được đối với Epanova[®] khi kết hợp với phép trị liệu statin, thử nghiệm lâm sàng ESPRIT được tiến hành đối với các bệnh nhân nghiên cứu trên phép trị liệu statin ban đầu. Như được thể hiện trên Fig.40, các bệnh nhân được chọn vào nghiên cứu ESPRIT dựa trên hàm lượng TG nằm trong khoảng 200-500 mg/dl và phép trị liệu statin ban đầu. Trong số 660 bệnh nhân được chọn vào thử nghiệm, 220 bệnh nhân được điều trị bằng giả dược dầu oliu, 220 bệnh nhân được điều trị bằng Epanova[®] liều 2g, và 220 bệnh nhân được điều trị bằng Epanova[®] liều 4g. Tất cả các phép điều trị bằng giả dược và Epanova[®] được dùng cùng với phép trị liệu statin ban đầu.

Bảng 41 dưới đây thể hiện hàm lượng ở thời điểm ban đầu của TG, HDL-C, LDL-C, non-HDL-C, và VLDL-C của các đối tượng trong thử nghiệm ESPRIT, so với hàm lượng mong muốn như được mô tả bởi Third Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), do National Heart Lung and Blood Institute đưa ra.

Bảng 41 Hàm lượng ban đầu				
	Mong muốn (mg/dl)	2 g/ngày	4 g/ngày	Dầu Oliu (OO)
TG	<150	265	265	269
HDL-C	>40	38	37	38
LDL-C	<100	92	91	87
Non-HDL-C	<130	139	135	132
VLDL-C	<30	42	43	42

Kết quả

Fig.41 minh họa sự bố trí bệnh nhân trong thử nghiệm ESPRIT, thể hiện rằng 6 bệnh nhân được rút khỏi nhánh dùng giả dược, 6 bệnh nhân được rút khỏi nhánh điều trị bằng liều 2g, và 12 bệnh nhân được rút khỏi nhánh điều trị bằng liều 4g. Số lượng bệnh nhân gặp phải tác dụng bất lợi (AE) nói chung là thấp, với 2 bệnh nhân trong nhánh dùng giả dược, 3 bệnh nhân trong nhánh điều trị bằng liều 2g, và 7 bệnh nhân trong nhánh điều trị bằng liều 4g.

Các bệnh nhân trong thử nghiệm ESPRIT biểu hiện tỉ lệ phần trăm thay đổi đáng kể về hàm lượng EPA và DHA trong huyết tương, như được thể hiện lần lượt trên Fig.42A và Fig.42B. Các bệnh nhân này cũng thể hiện mức giảm TG phụ thuộc liều, giảm non-HDL-C, và tăng HDL-C, so với giả dược dầu oliu (xem Fig.43). Ngoài ra, cũng quan sát thấy sự giảm VLDL-C và TC/HDL-C phụ thuộc liều (xem Fig.44). Đồng thời, các kết quả trên các Fig.42-44 thể hiện hiệu lực của Epanova[®] làm thuốc bổ sung vào phép trị liệu statin.

Các Fig.45-52 mô tả chi tiết hơn các kết quả của thử nghiệm ESPRIT, minh họa rằng Epanova[®] có hiệu quả làm thuốc bổ sung cho cả hai statin có hiệu lực thấp và hiệu lực cao, trong phạm vi tình trạng bệnh của bệnh nhân ở thời điểm ban đầu. Fig.45 thể hiện các kết quả về tỉ lệ phần trăm thay đổi TG trung vị so với thời điểm ban đầu đối với ba tam phân vị của bệnh nhân, được phân bố theo hàm lượng TG thời điểm ban đầu. Fig.46 thể hiện các kết quả về tỉ lệ phần trăm thay đổi non-HDL-C trung vị so với thời điểm ban đầu đối với ba tam phân vị của bệnh nhân, được phân bố theo hàm lượng non-HDL-C thời điểm ban đầu. Fig.47 thể hiện các kết quả về tỉ lệ phần trăm thay đổi LDL-C trung vị so với thời điểm ban đầu đối với ba tam phân vị của bệnh nhân, được phân bố theo hàm lượng LDL-C thời điểm ban đầu.

Như được thấy trên Fig.48, quan sát thấy sự giảm hàm lượng TG đối với các bệnh nhân nhận phép trị liệu rosuvastatin, atorvastatin, và simvastatin đồng thời. Quan sát thấy các tác dụng có ý nghĩa thống kê lên hàm lượng triglyxerit, non-HDL-C, và LDL-C không quan tâm xem các statin có hiệu lực thấp hoặc hiệu lực cao được dùng đồng thời, như được thể hiện trên các Fig.49-51.

Fig.52 so sánh tỉ lệ phần trăm thay đổi trung vị so với thời điểm ban đầu của triglyxerit đối với (A) bệnh nhân có hàm lượng TG thời điểm ban đầu cao hơn (≥ 294 mg/dl), (B) bệnh nhân có hàm lượng EPA EOT cao ($\geq 26,58$ μ g/ml), và (C) bệnh nhân nhận phép trị liệu bằng rosuvastatin đồng thời. Các kết quả này thể hiện rằng Epanova[®] liều 2g tác dụng tương tự như liều 4g ở các nhóm bệnh nhân được thể hiện trên Fig.52.

Hàm lượng LDL-C tăng quan sát được khi điều trị bằng Epanova[®] là phù hợp với việc tăng kích thước hạt lipoprotein quan sát được. VLDL Lớn, VLDL trung bình, VLDL nhỏ, VLDL toàn phần, và kích thước VLDL được đo đối với nhánh dùng giả dược và mỗi nhánh điều trị của thử nghiệm ESPRIT. Các kết quả được biểu thị trên Fig.53 và thể hiện rằng việc điều trị bằng Epanova[®] dẫn đến tăng lượng hạt VLDL lớn

và giảm tương ứng lượng hạt VLDL nhỏ. Việc giảm các hạt VLDL quan sát được cùng với việc tăng kích thước hạt LDL, như được thể hiện trên Fig.54. Như được thể hiện trên Fig.55, do hàm lượng TG ở kết thúc điều trị giảm, mức tăng tỉ lệ phần trăm kích thước LDL-P là lớn hơn. Đồng thời, các Fig.53-55 chứng tỏ rằng việc điều trị bằng Epanova[®] dẫn đến tăng kích thước hạt lipoprotein, kết quả quan sát này có thể giải thích cho việc tăng LDL-C quan sát được.

Bảng 42 dưới đây tóm tắt các kết quả của thử nghiệm ESPRIT.

Bảng 42

Bảng 42														
	Dầu Oliu (OO)				4 g/ngày*				2 g/ngày*					
	Ban đầu	EOT	%Δ		Ban đầu	EOT	%Δ	Giá trị p	Khá c biệt	Ban đầu	EOT	%Δ	Giá trị p	Khá c biệt
Non-HDL-C	trung vị	132	134	1	135	129	-6	<0,001	-6	139	133	-3	0,037	-3
	trung bình	135	136	1	139	132	-5			140	136	-2		
TG	trung vị	269	260	-4	265	215	-21	<0,001	-15	265	222	-15	<0,001	-9
	trung bình	280	268	-3	287	233	-18			284	244	-14		
HDL-C	trung vị	38	38	2	37	38	3	0,988	1	38	39	2	0,988	0
	trung bình	39	40	3	39	40	4			39	40	3		
LDL-C	trung vị	87	91	2	91	92	1	0,647	0	92	95	5	0,025	4
	trung bình	92	93	4	94	94	4			92	97	6		
VLDL-C	trung vị	42	41	-3	43	33	-20	<0,001	-16	42	37	-12	0,008	-8
	trung bình	46	44	3	47	38	-14			47	40	-10		
TC	trung vị	174	174	1	170	167	-4	<0,001	-4	177	174	-1	0,049	-2
	trung bình	174	176	1	178	172	-3			179	176	-1		
TC/HDL-C	trung vị	5	5	-2	5	4	-7	0,001	-5	5	5	-4	0,119	-3
	trung bình	5	5	-1	5	5	-6			5	5	-3		

Tất cả các công bố đơn, bằng sáng chế, đơn sáng chế và các tài liệu khác được trích dẫn trong bản mô tả này được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ nhằm tất cả các mục đích ở phạm vi tương tự như thể từng công bố đơn, bằng sáng chế, đơn sáng chế hoặc tài liệu khác được chỉ dẫn riêng rẽ được kết hợp bằng cách viện dẫn nhằm tất cả các mục đích.

Trong khi các phương án cụ thể khác nhau đã được minh họa và mô tả, cần hiểu rằng các thay đổi khác nhau có thể được thực hiện mà không vượt quá phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ**1. Dược phẩm chứa:**

Axit eicosapentaenoic (EPA), với lượng tính theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng nằm trong khoảng từ 50% đến 60%;

Axit docosahexaenoic (DHA), với lượng tính theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng nằm trong khoảng từ 17% đến 23%;

Axit docosapentaenoic (DPA), với lượng tính theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 8%;

trong đó ít nhất 90% trọng lượng của axit béo đa bất bão hòa trong dược phẩm này có mặt ở dạng axit tự do.

2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó ít nhất 95% trọng lượng của axit béo đa bất bão hòa trong dược phẩm này có mặt ở dạng axit tự do.

3. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó DPA có mặt với lượng tính theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng là ít nhất 1,5%.

4. Dược phẩm theo điểm 3, trong đó DPA có mặt với lượng tính theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng là ít nhất 2%.

5. Dược phẩm theo điểm 4, trong đó DPA có mặt với lượng tính theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng là ít nhất 2,5%.

6. Dược phẩm theo điểm 5, trong đó DPA có mặt với lượng tính theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng là ít nhất 3%.

7. Dược phẩm theo điểm 6, trong đó DPA có mặt với lượng tính theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng là ít nhất 3,5%.

8. Dược phẩm theo điểm 7, trong đó DPA có mặt với lượng tính theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng là ít nhất 4%.

9. Dược phẩm theo điểm 8, trong đó DPA có mặt với lượng tính theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng là ít nhất 4,5%.

10. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này chứa liều đơn vị là ít nhất 500 mg dược phẩm.

11. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này chứa liều đơn vị là khoảng 1 gam dược phẩm.

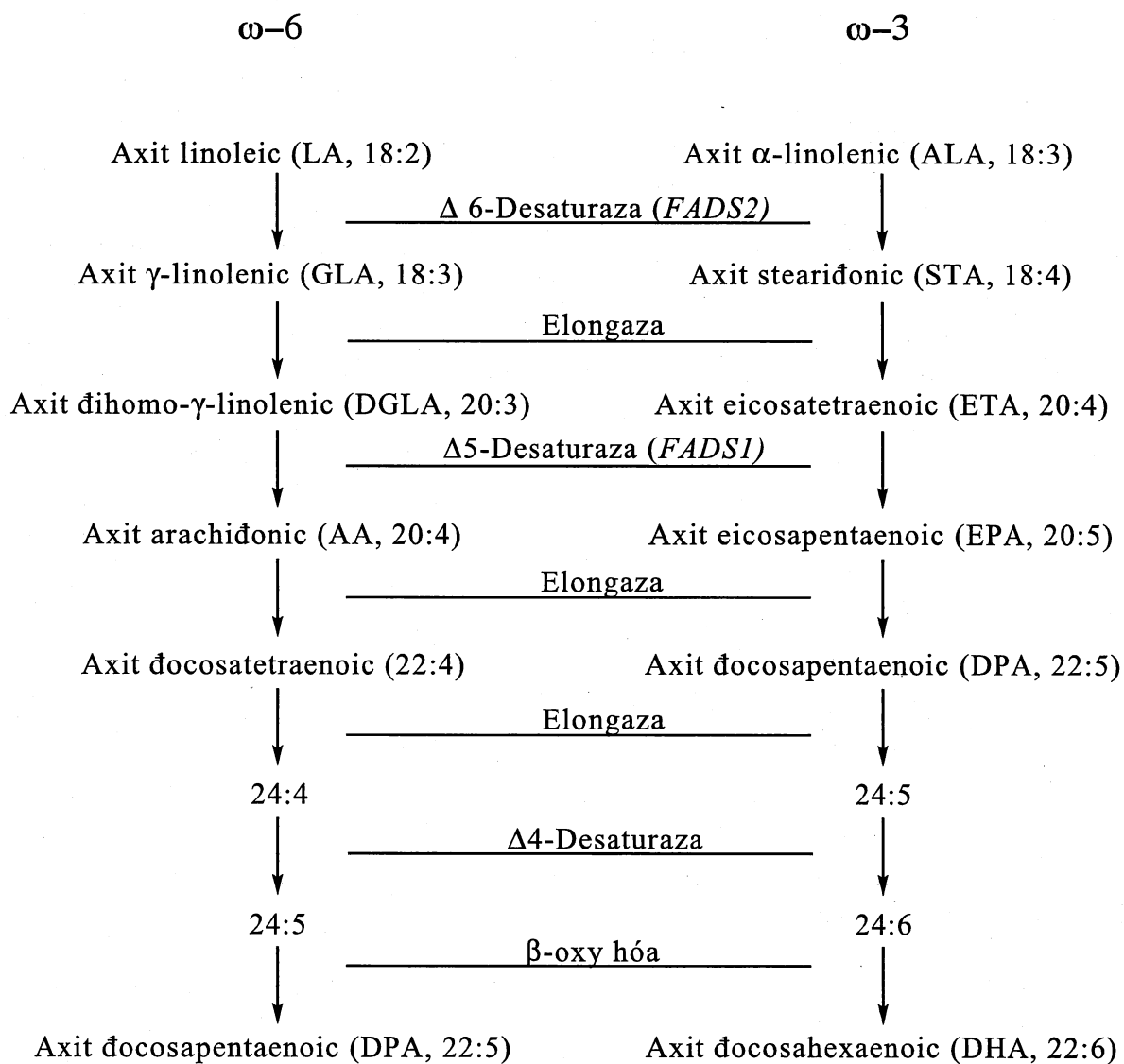


FIG. 1

2/66

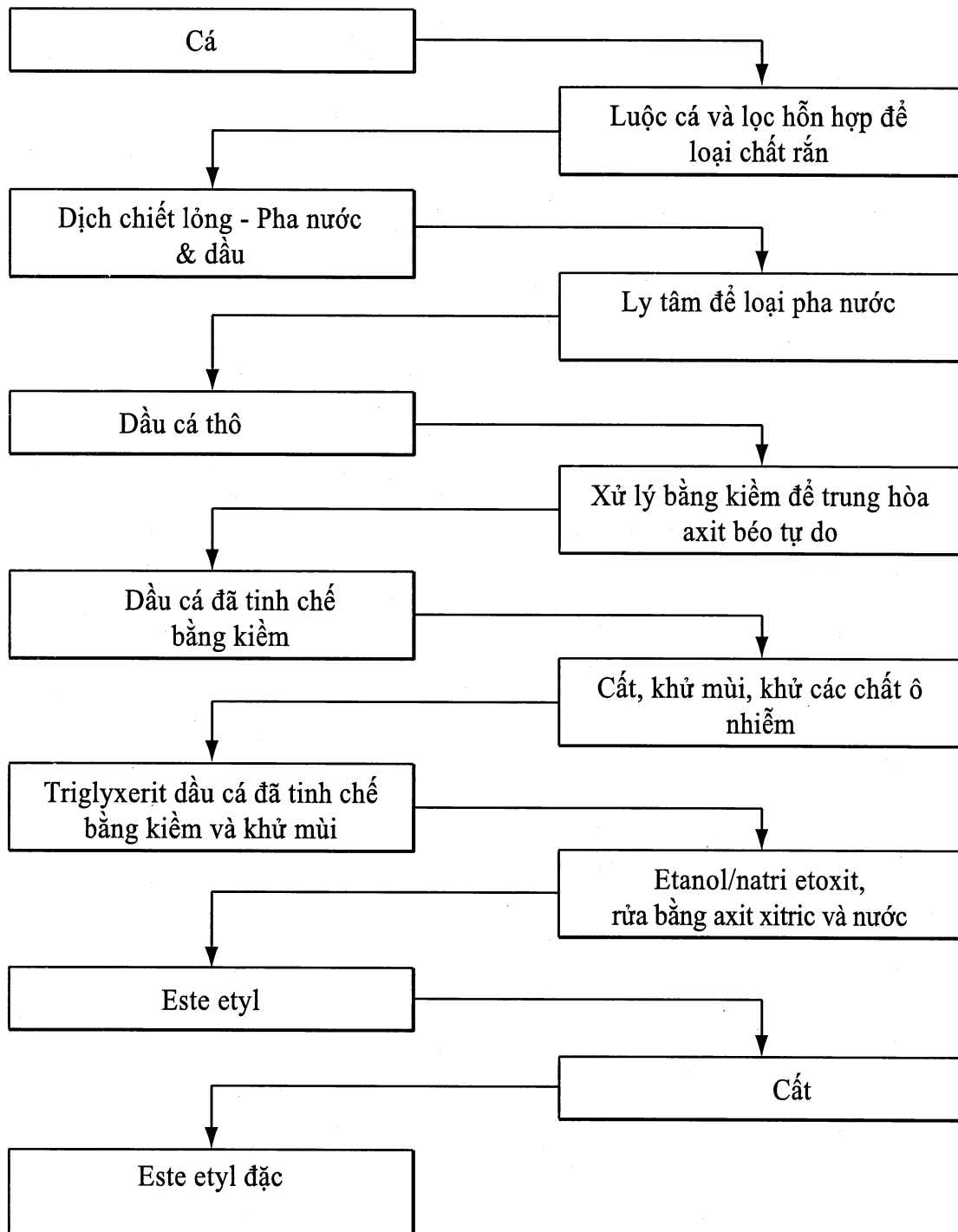


FIG. 2

**Tác dụng tổng cộng của việc sắp xếp dạng lưới với ure
lên sản phẩm trung gian EE**

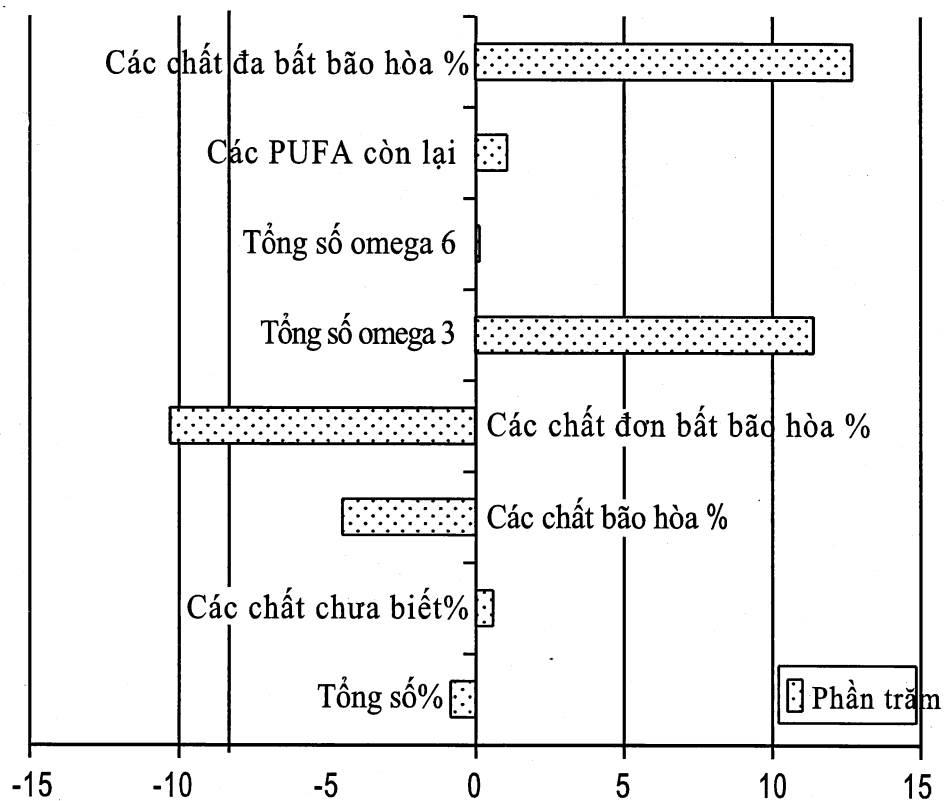


FIG. 3A

**Tác dụng của việc tạo phức với ure lên
các loại axit béo omega 3 và omega 6**

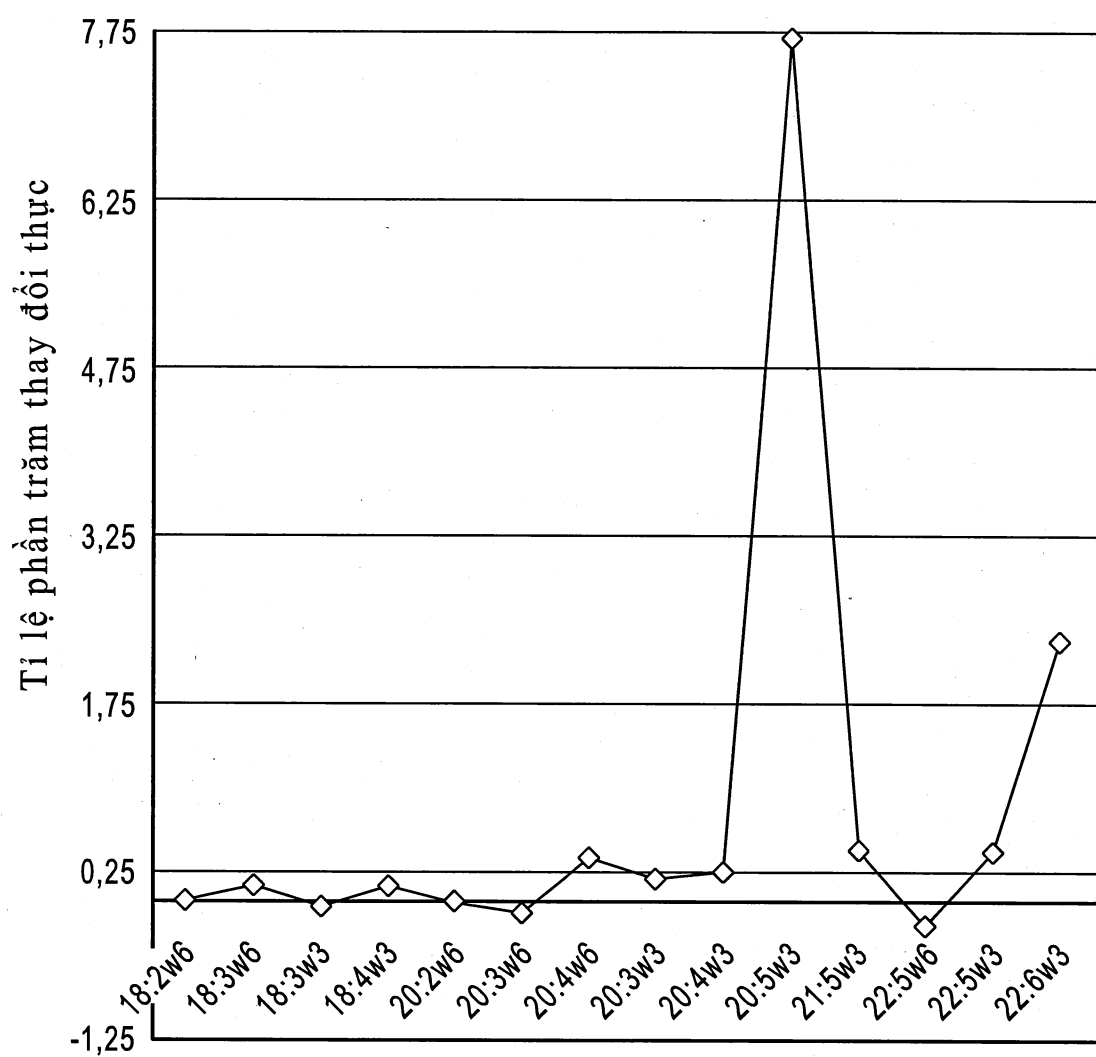
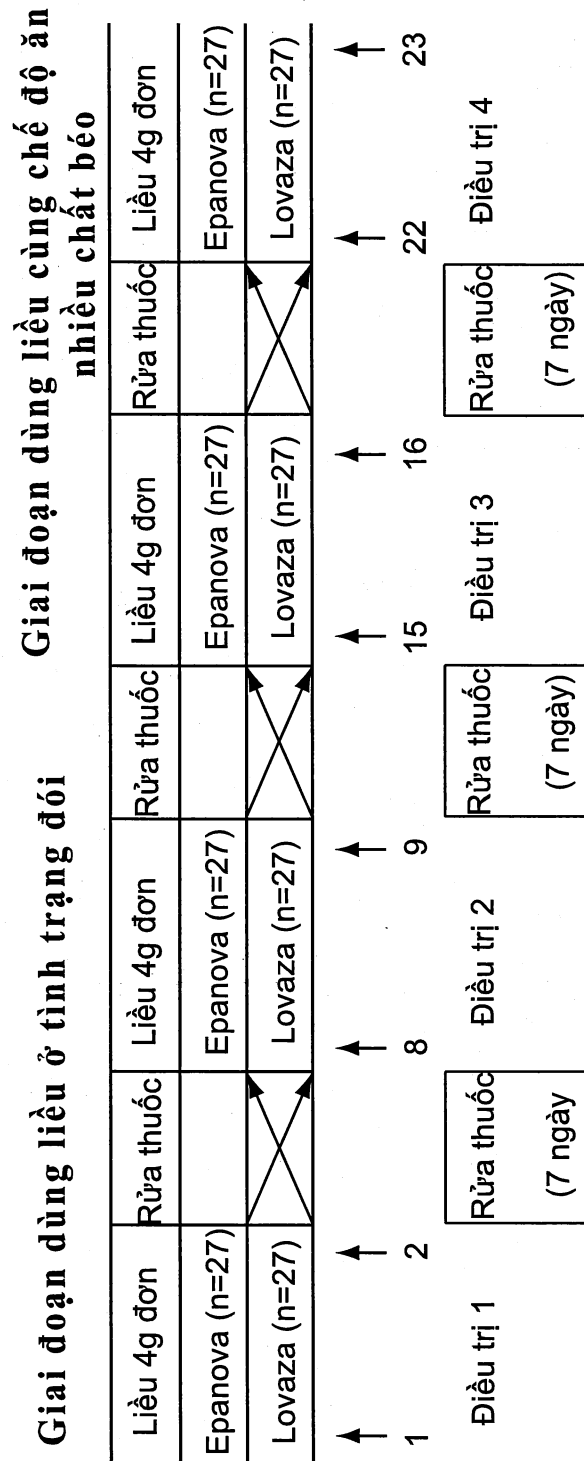


FIG. 3B



(↑ Chỉ định khám lâm sàng và ngày nghiên cứu)

FIG. 4

6/66

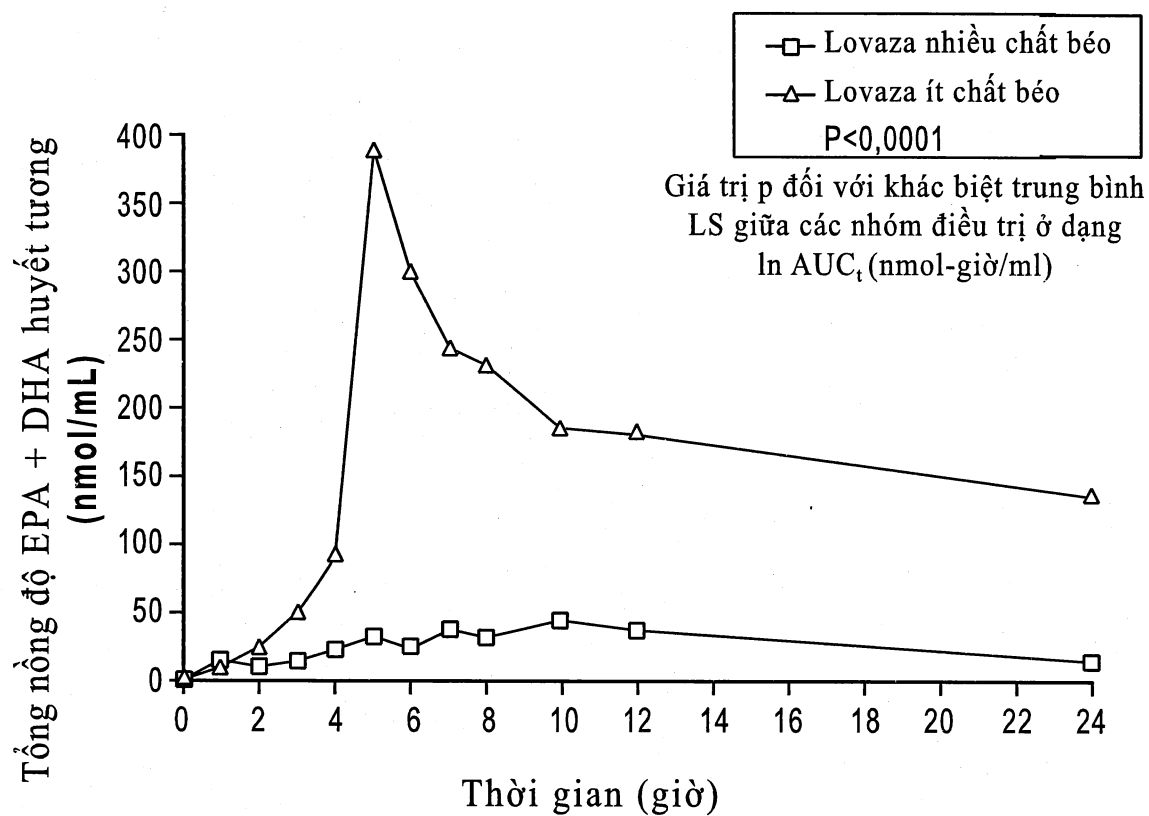


FIG. 5

Sinh khả dụng của EPA + DHA, trong chế độ ăn nhiều chất béo,
ở dạng FFA lớn hơn đáng kể so với dạng EE-FA ($p < 0,0007$)

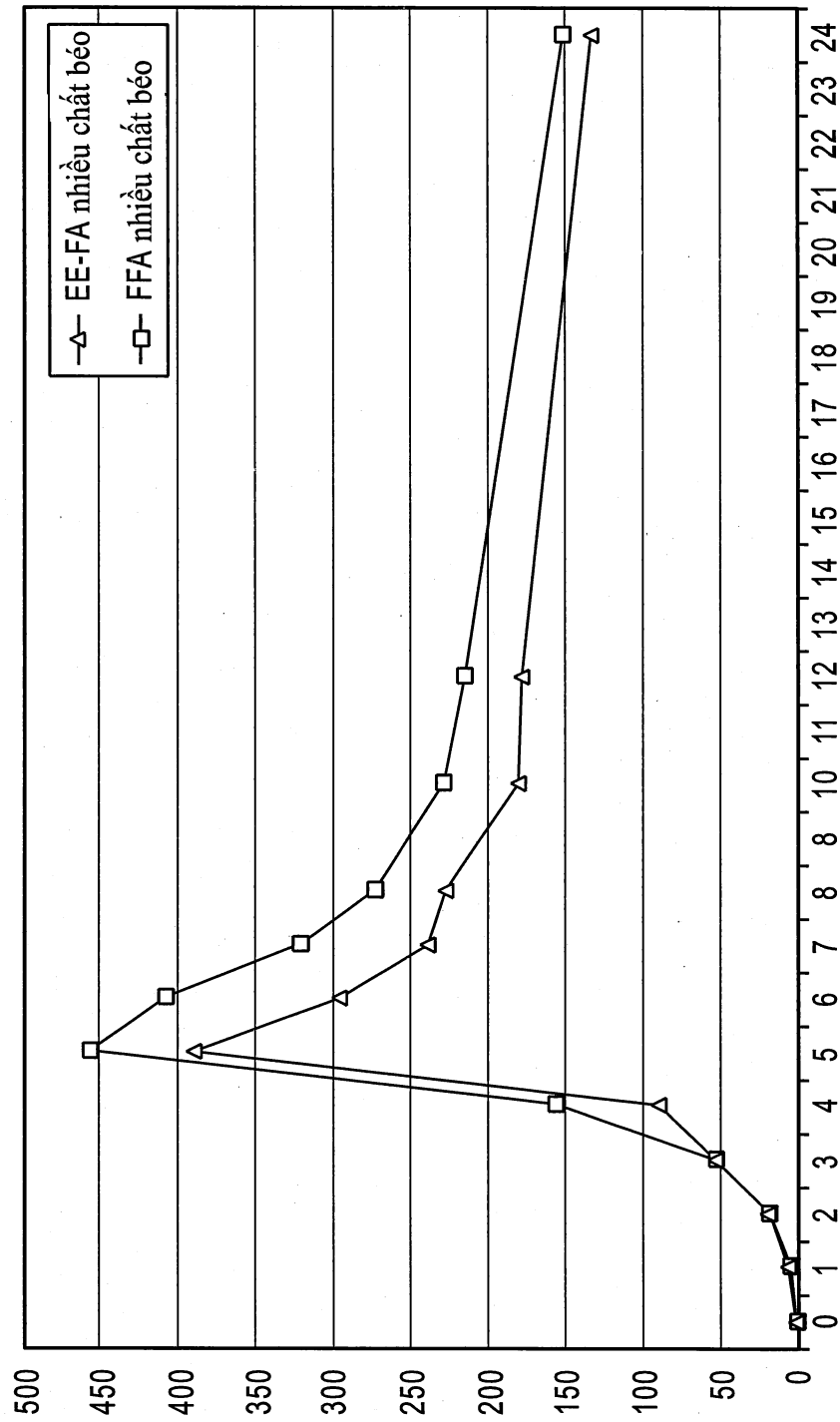


FIG. 6

8/66

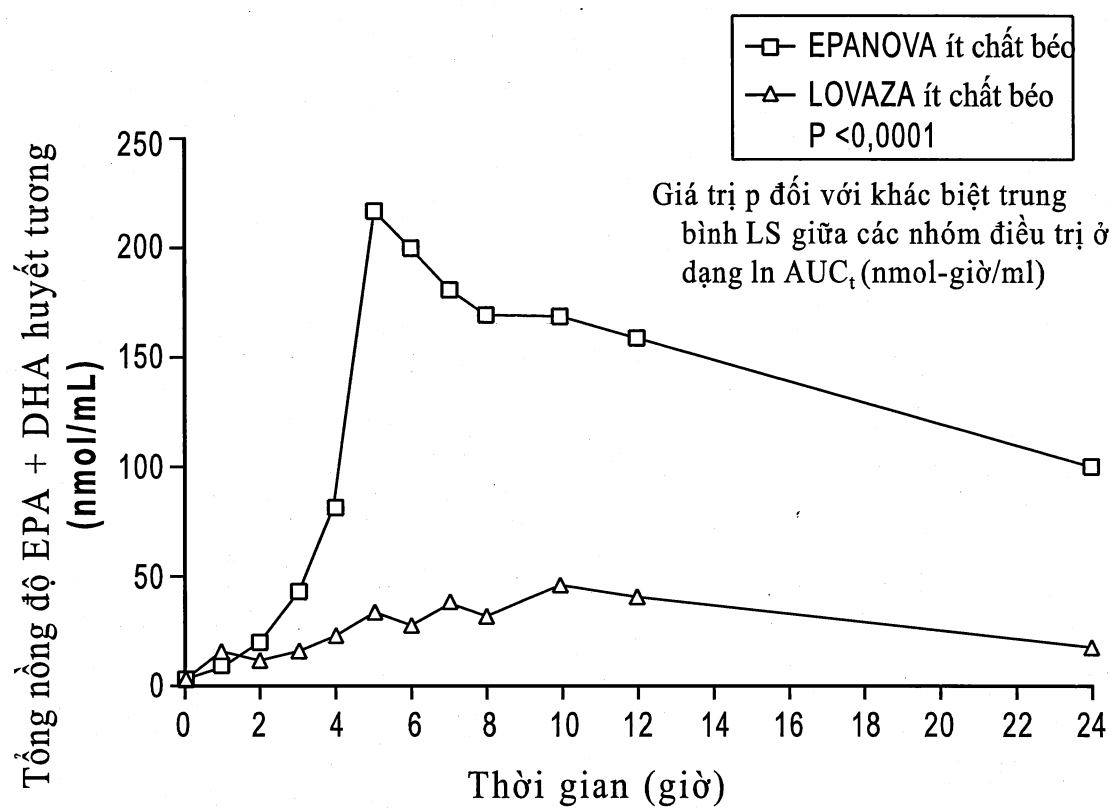


FIG. 7

9/66

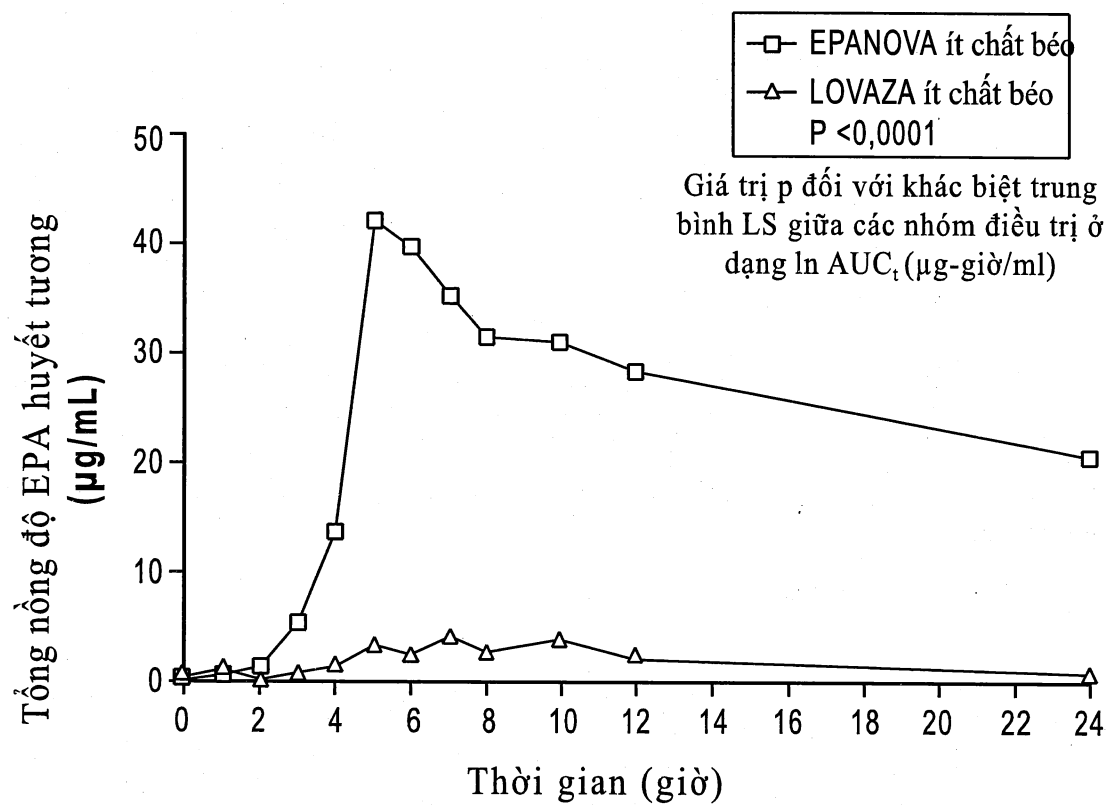


FIG. 8

10/66

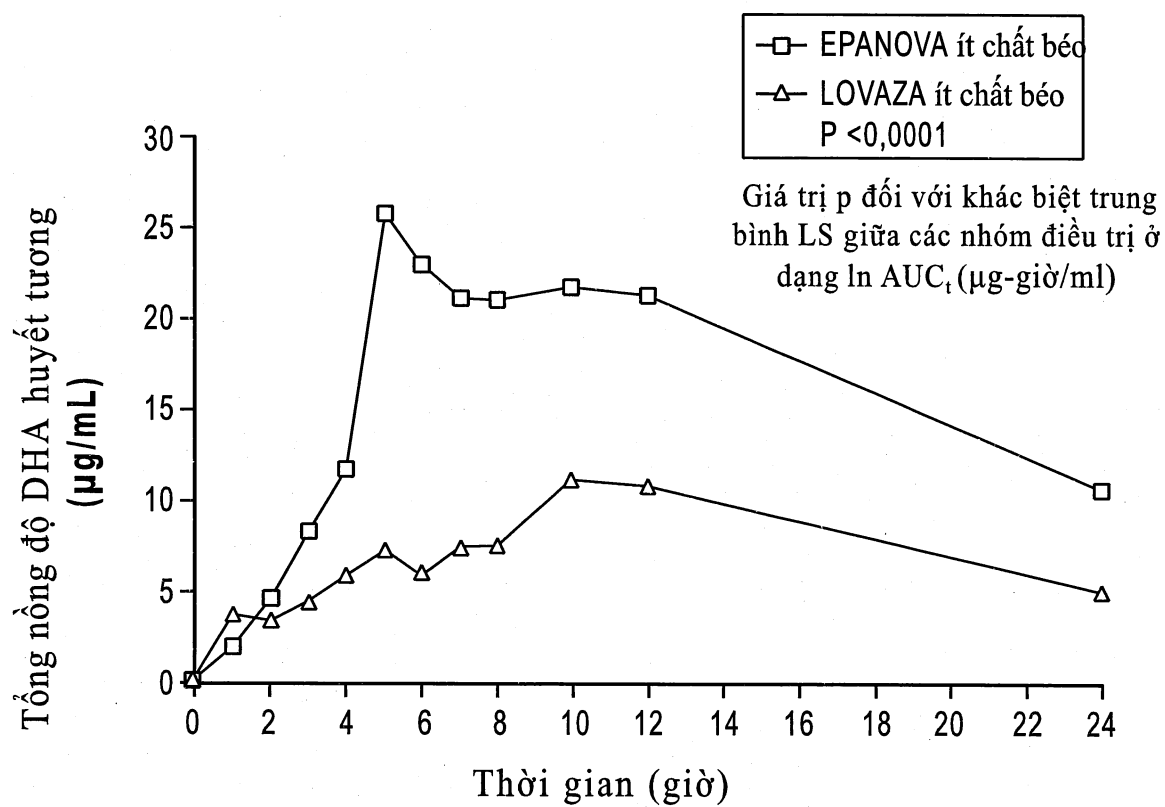


FIG. 9

19630

11/66

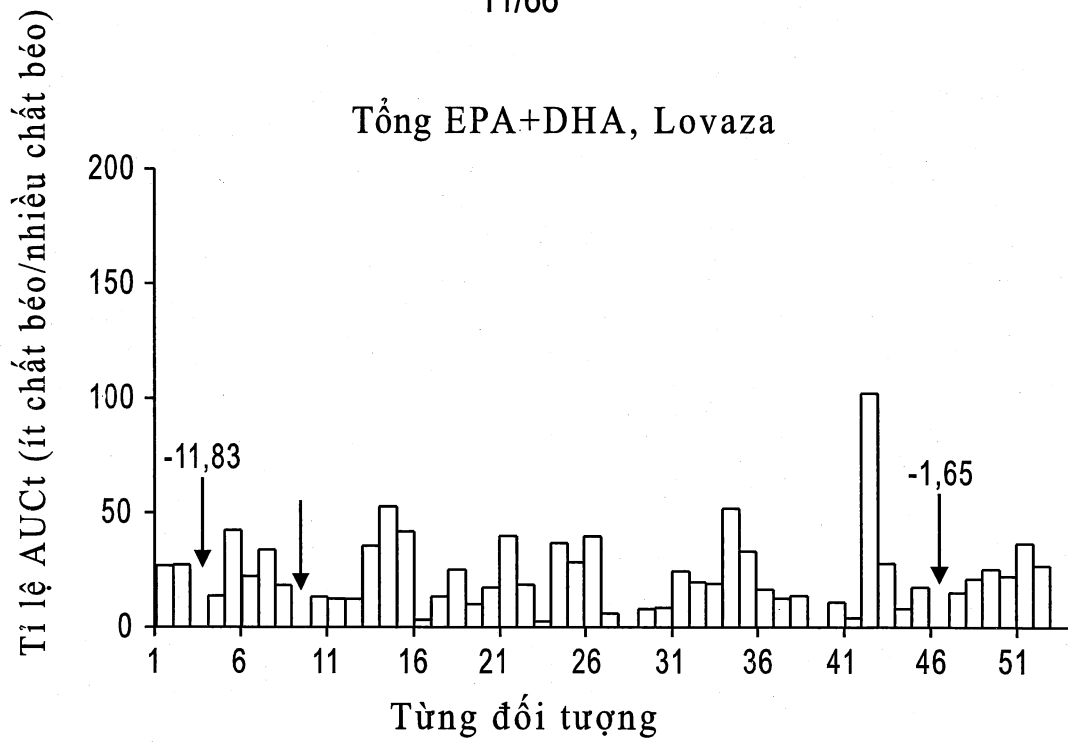


FIG. 10A

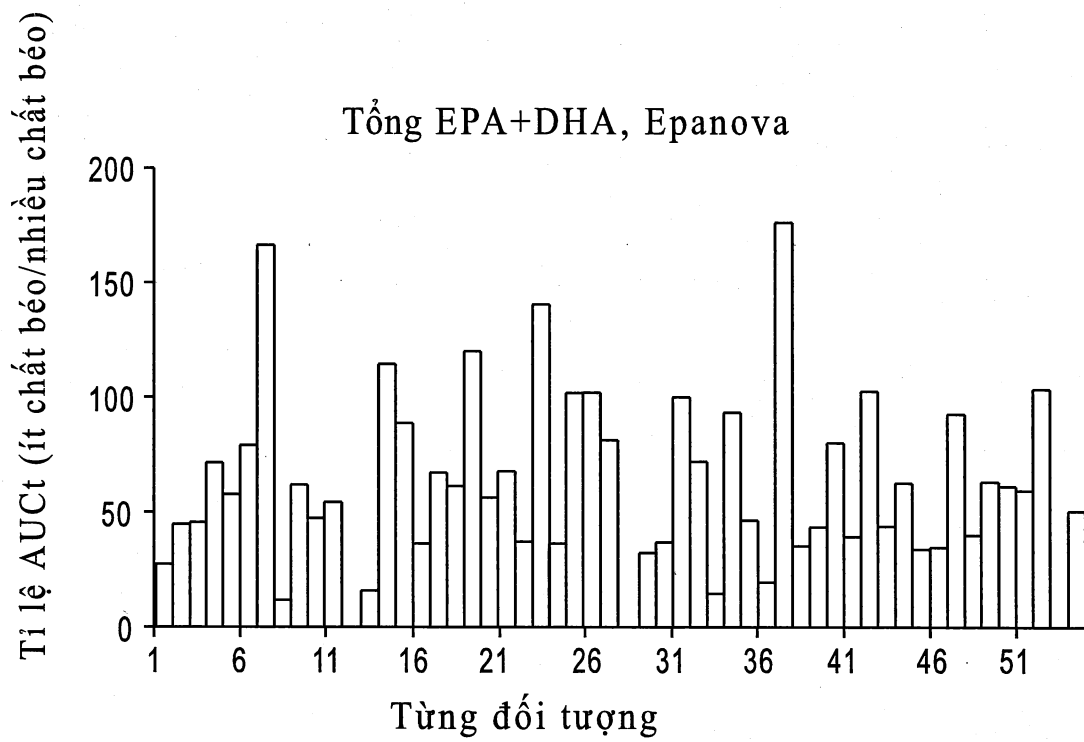


FIG. 10B

12/66

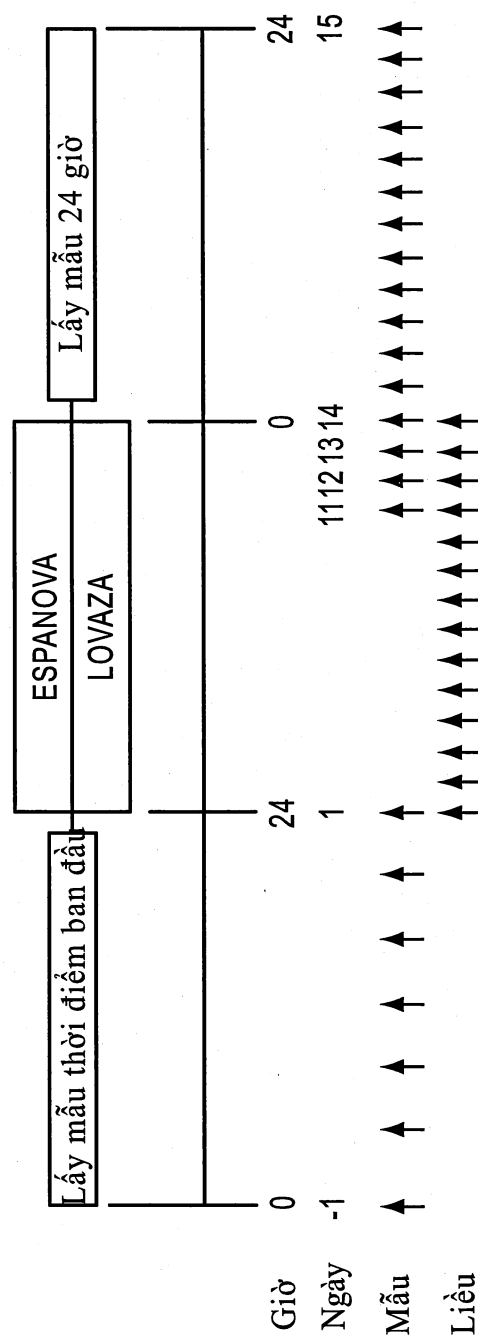


FIG. 11

13/66

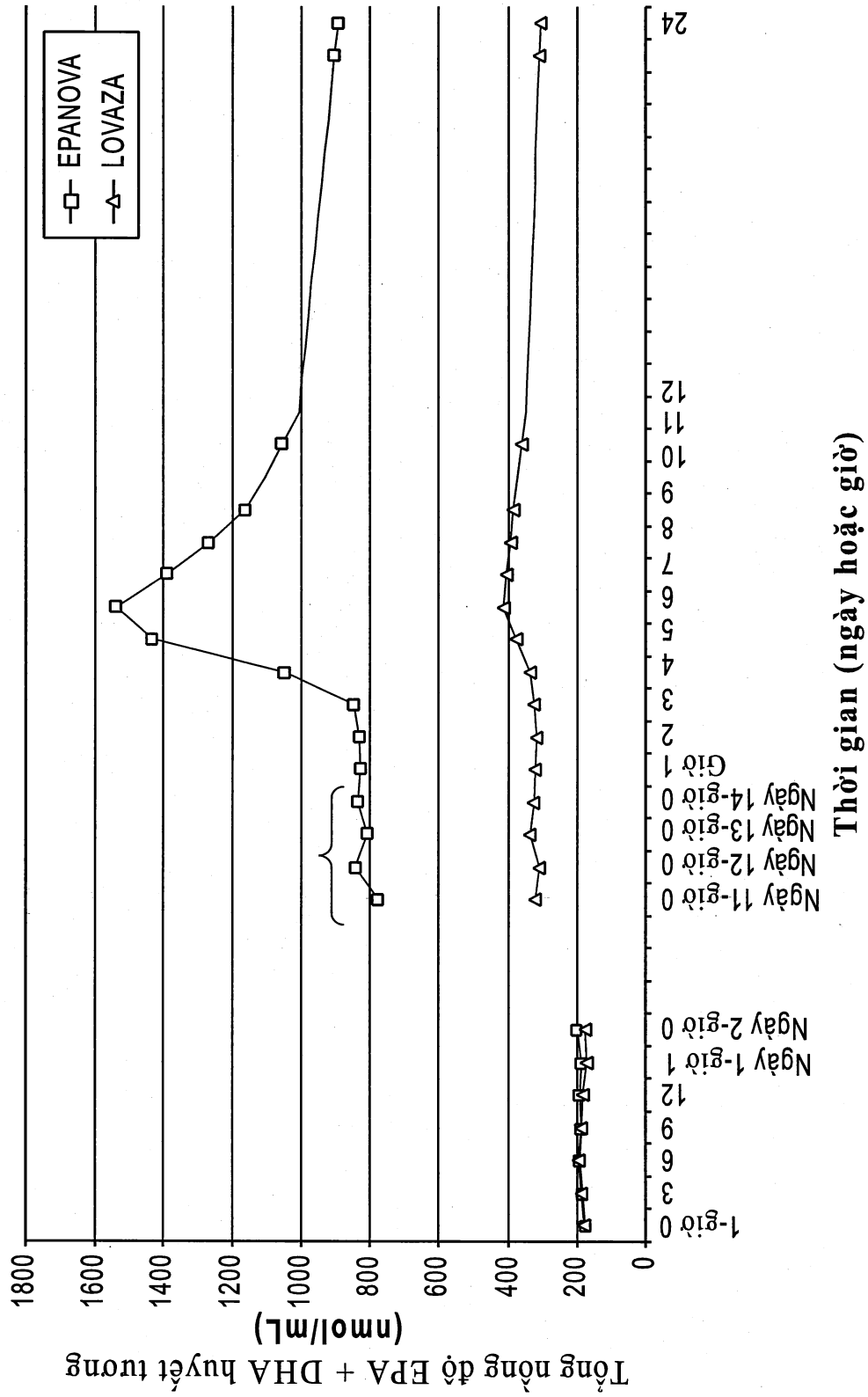


FIG. 12A

14/66

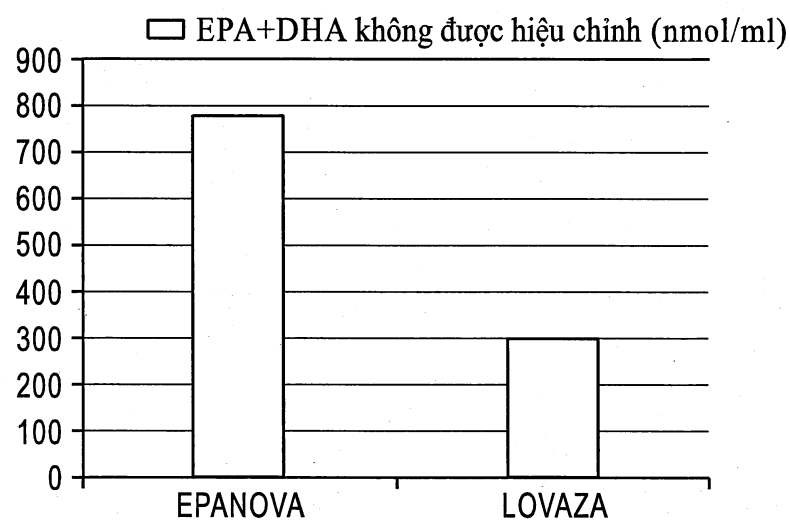


FIG. 12B

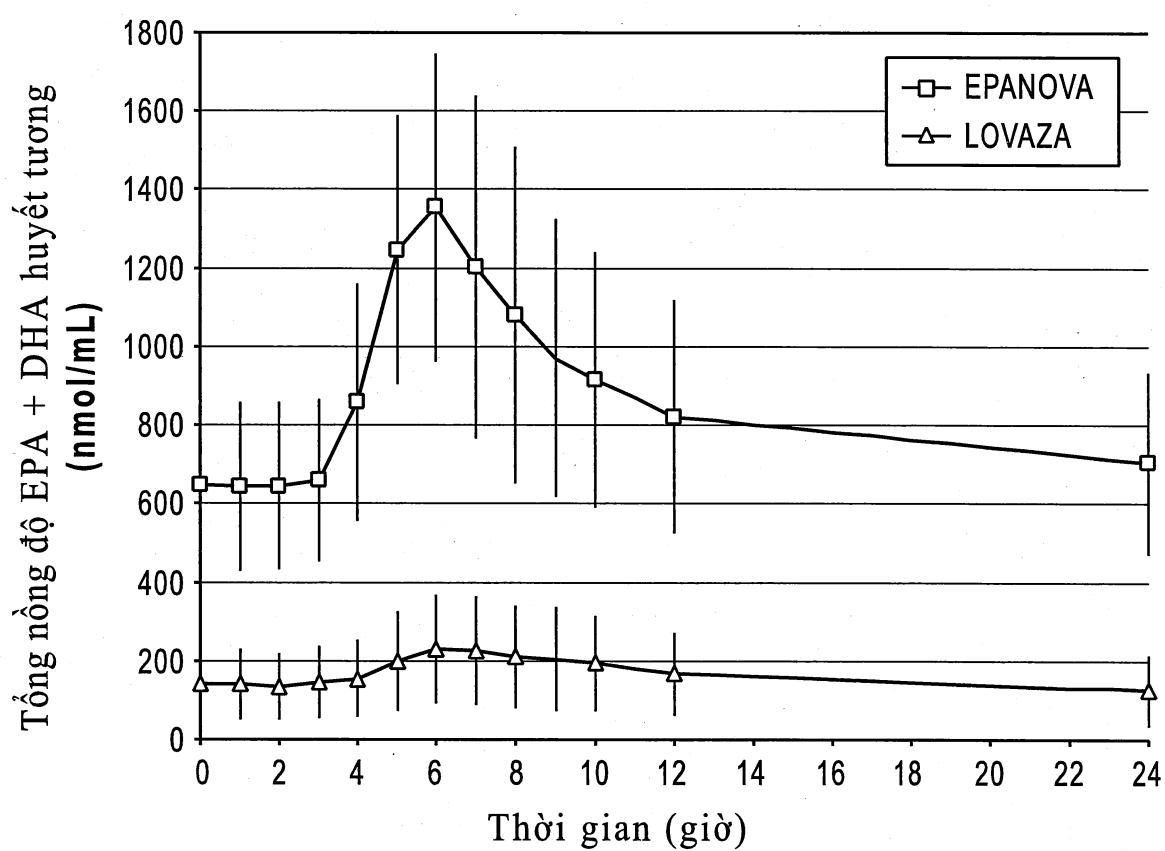


FIG. 13

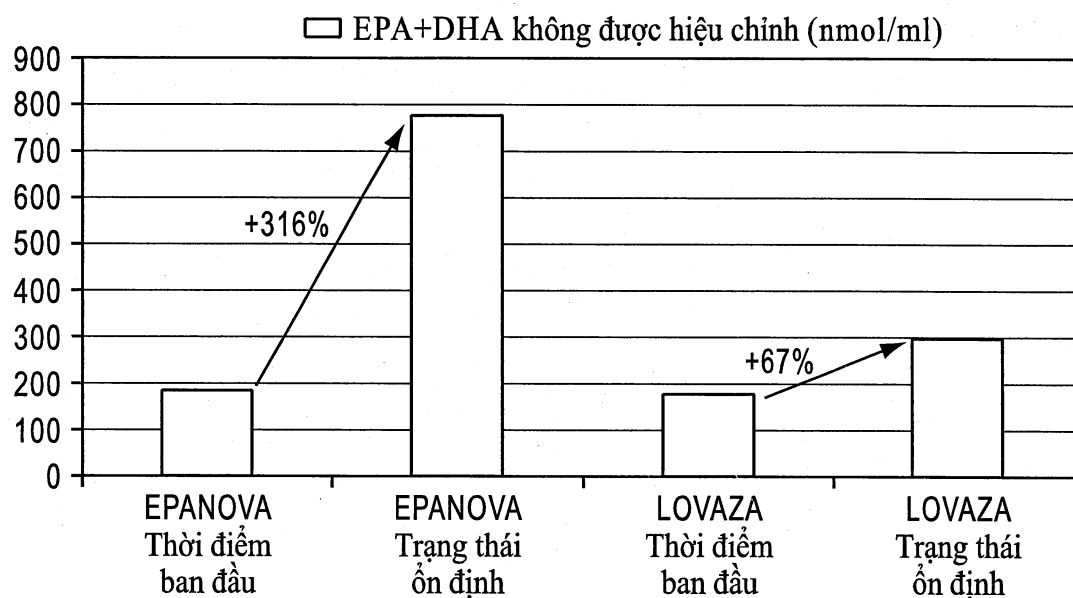


FIG. 14A

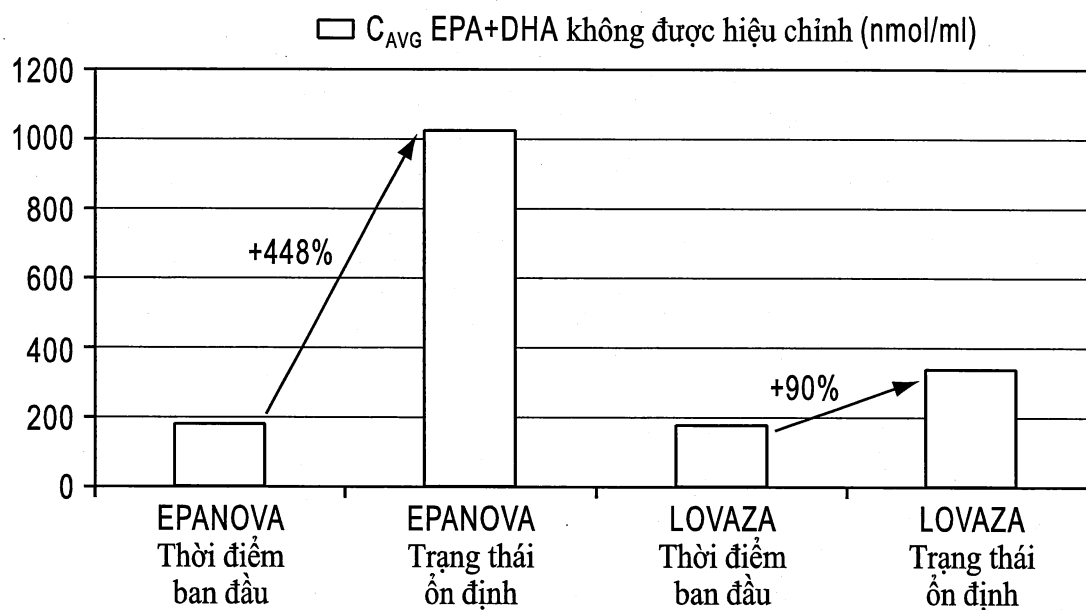
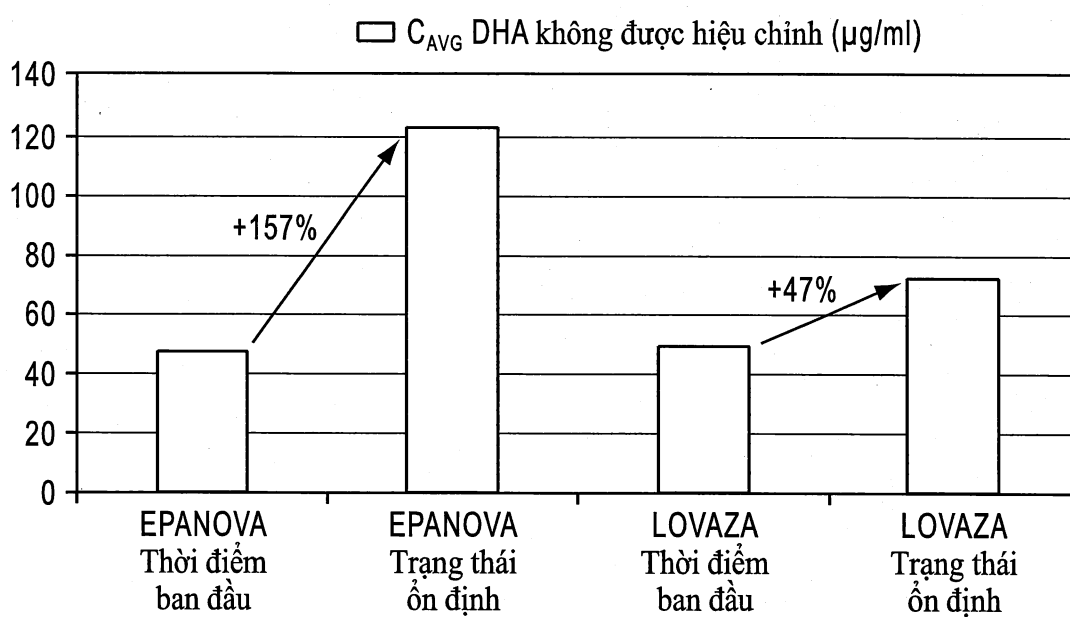
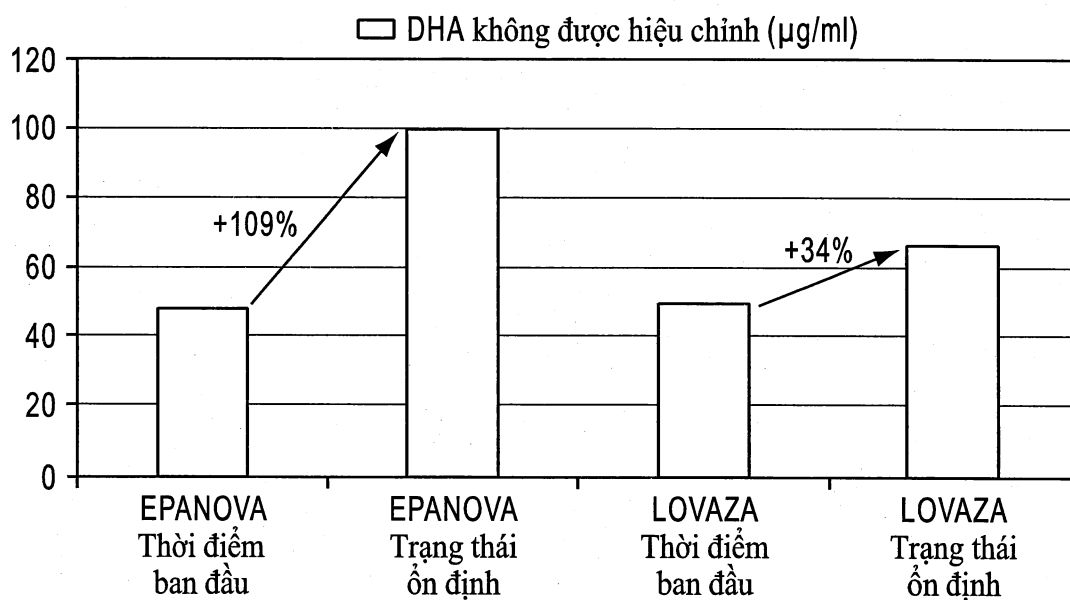


FIG. 14B



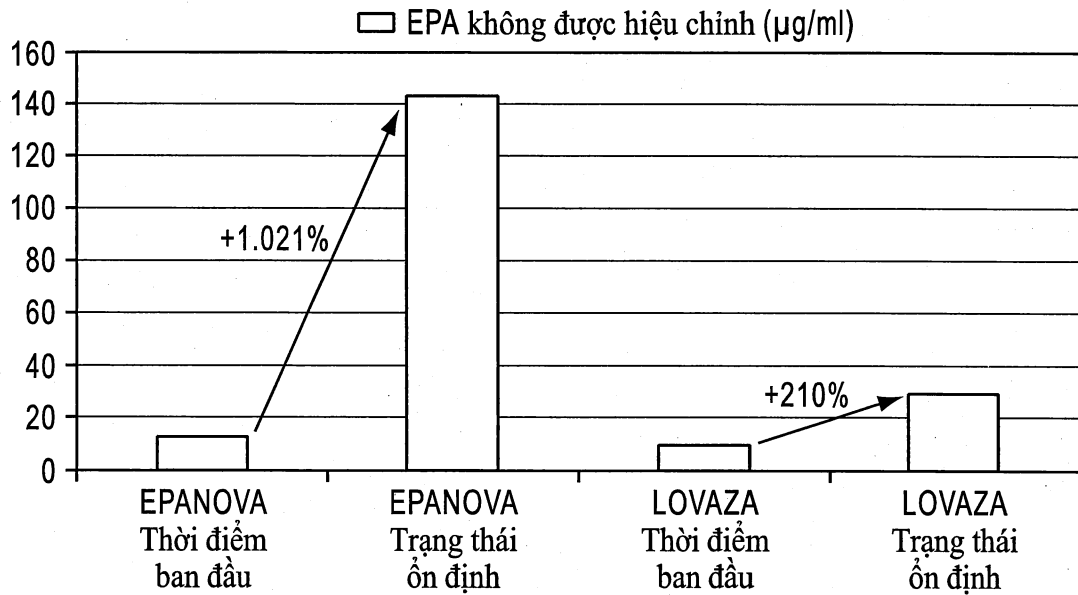


FIG. 16A

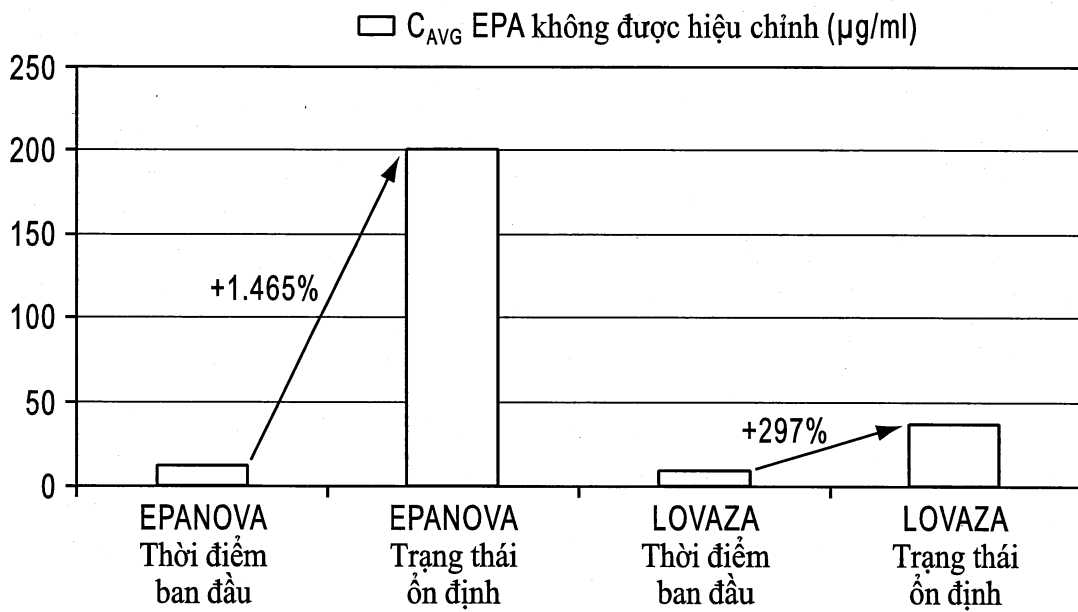


FIG. 16B

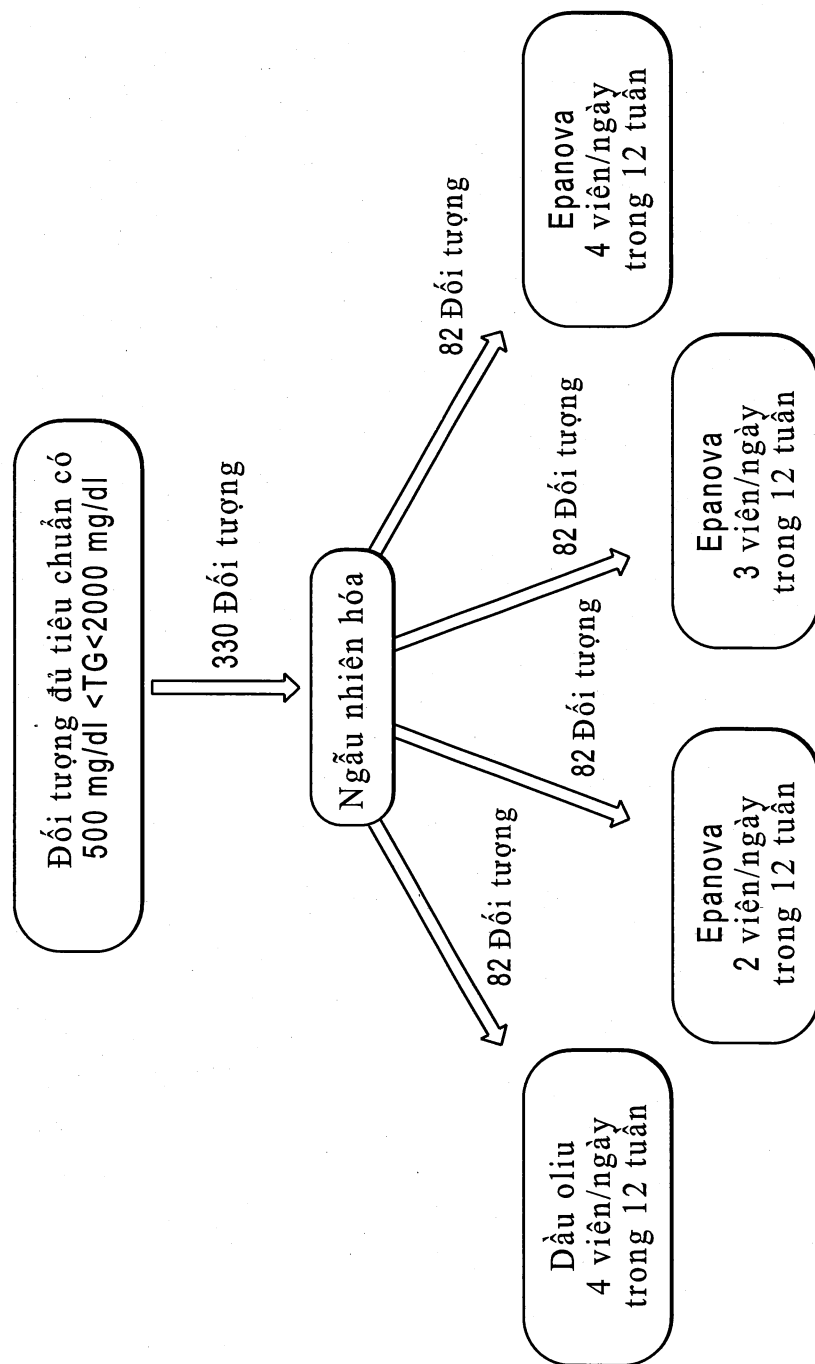


FIG. 17

Lần khám 1 Lần khám 2 Lần khám 3 Lần khám 4 Lần khám 5 Lần khám 6 Lần khám 7 Lần khám 8

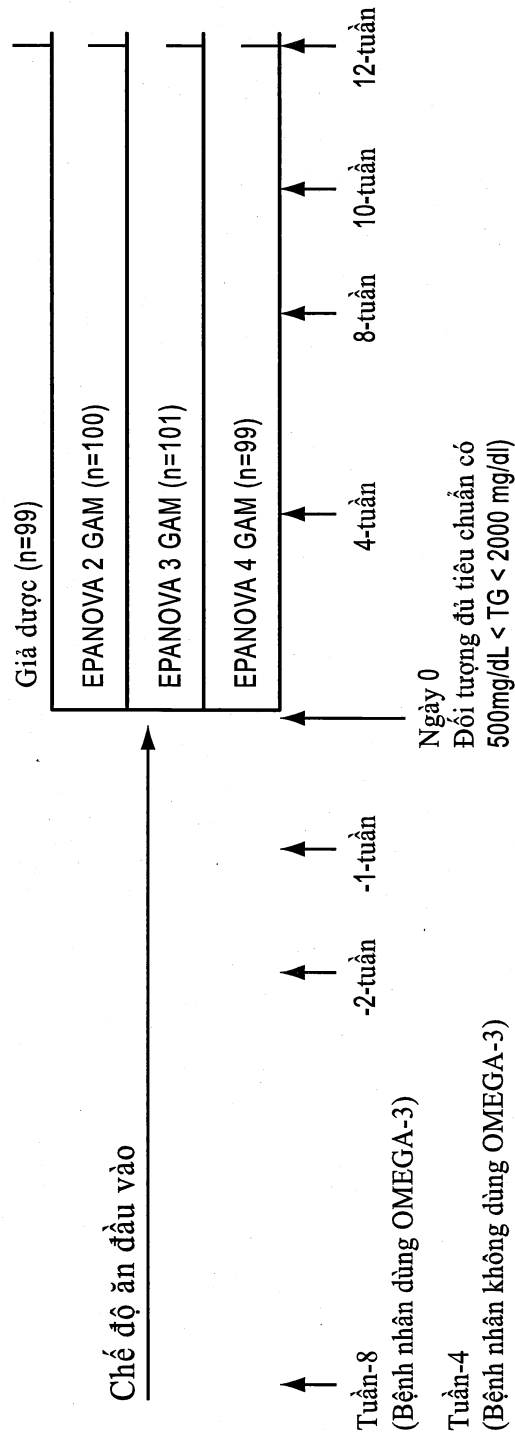


FIG. 18

20/66

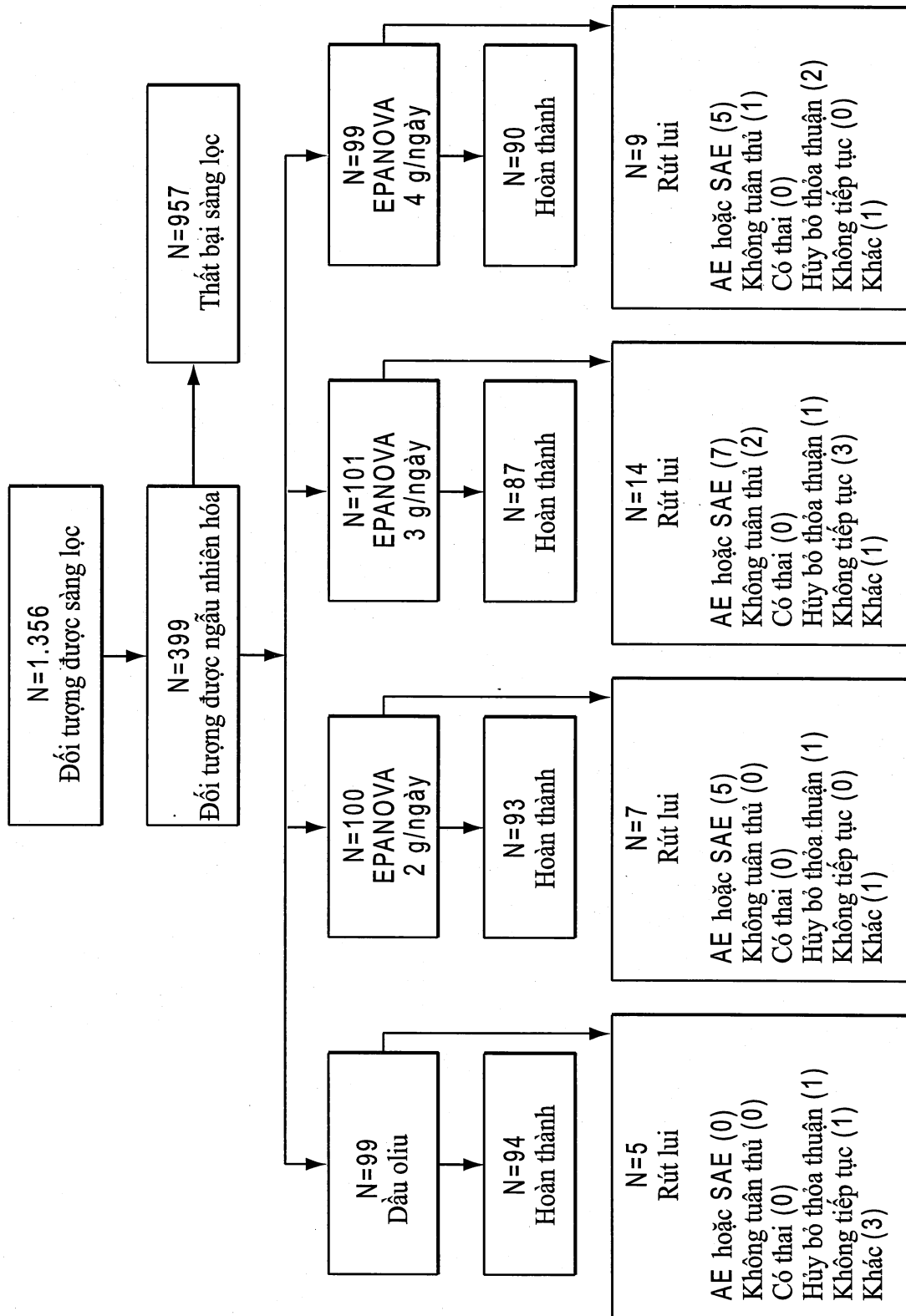


FIG. 19

Hàm lượng tuyệt đối trung bình trong huyết tương ($\mu\text{g/ml}$)

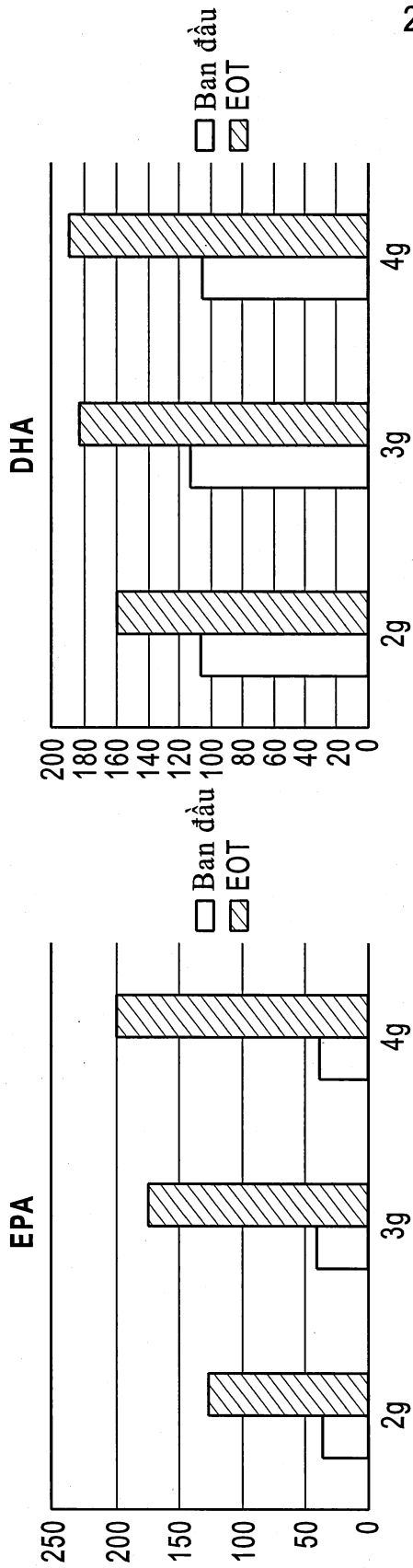


FIG. 20A

21/66

FIG. 20B

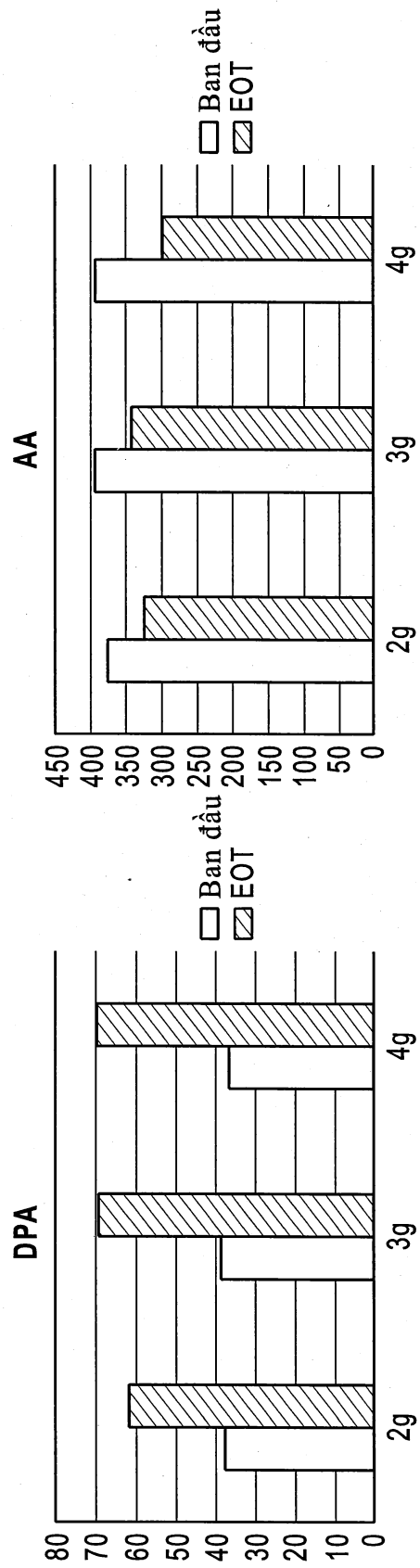


FIG. 20C

FIG. 20D

22/66

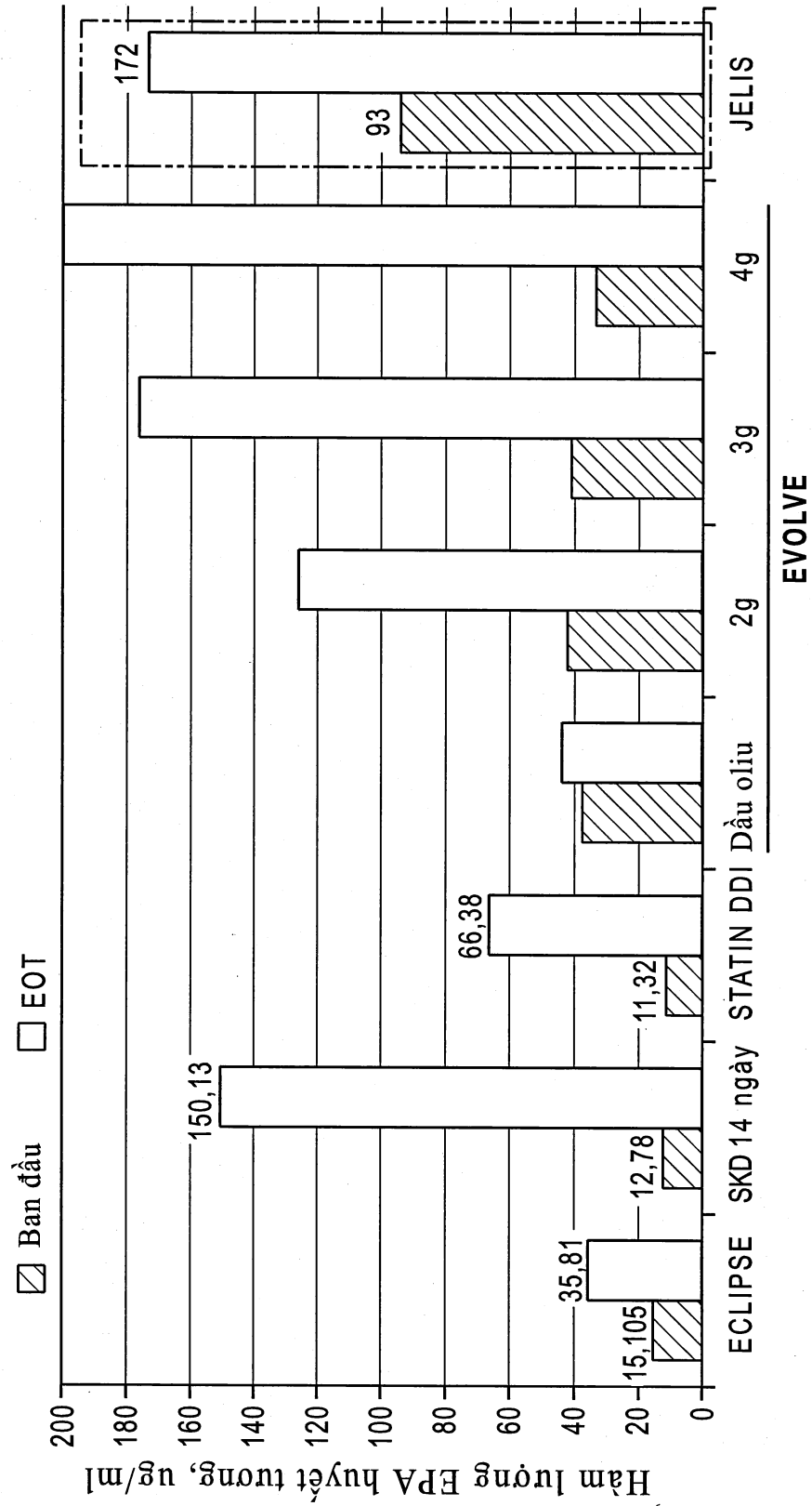


FIG. 20E

Hàm lượng tuyệt đối trung vị trong huyết tương ($\mu\text{g/ml}$)

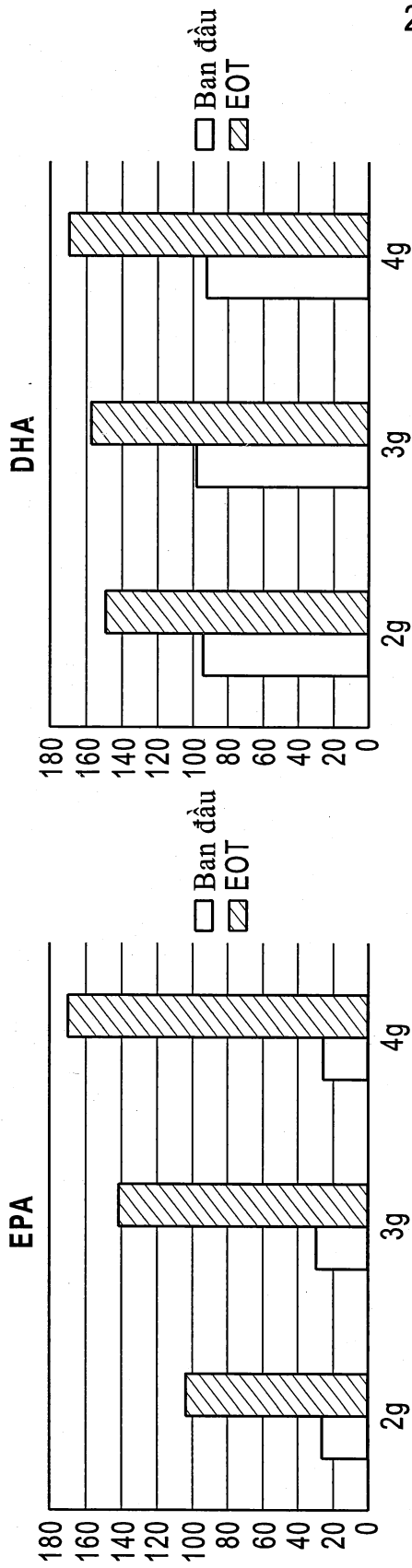


FIG. 21B

23/66

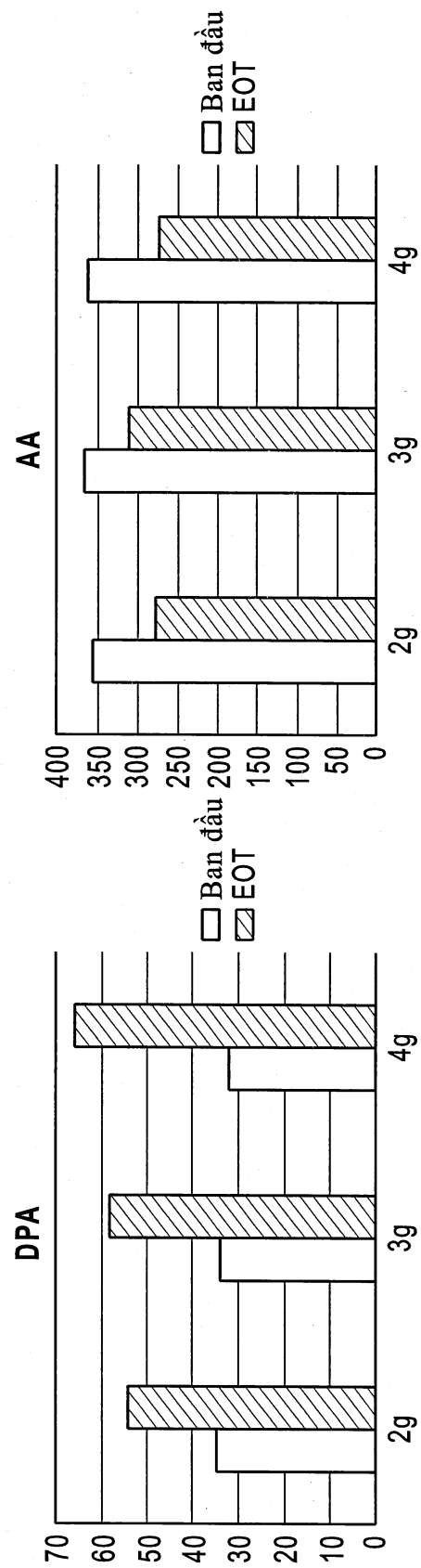


FIG. 21D

24/66

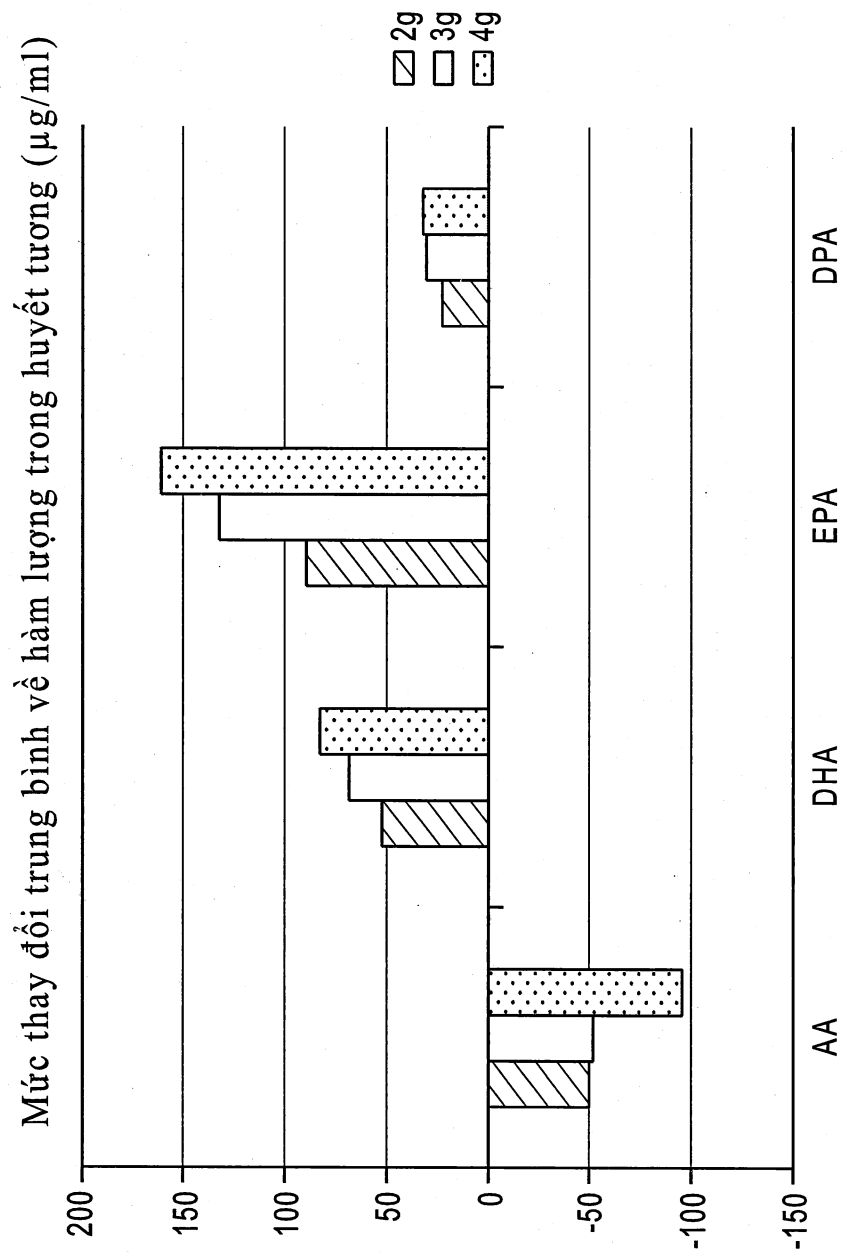


FIG. 22A

25/66

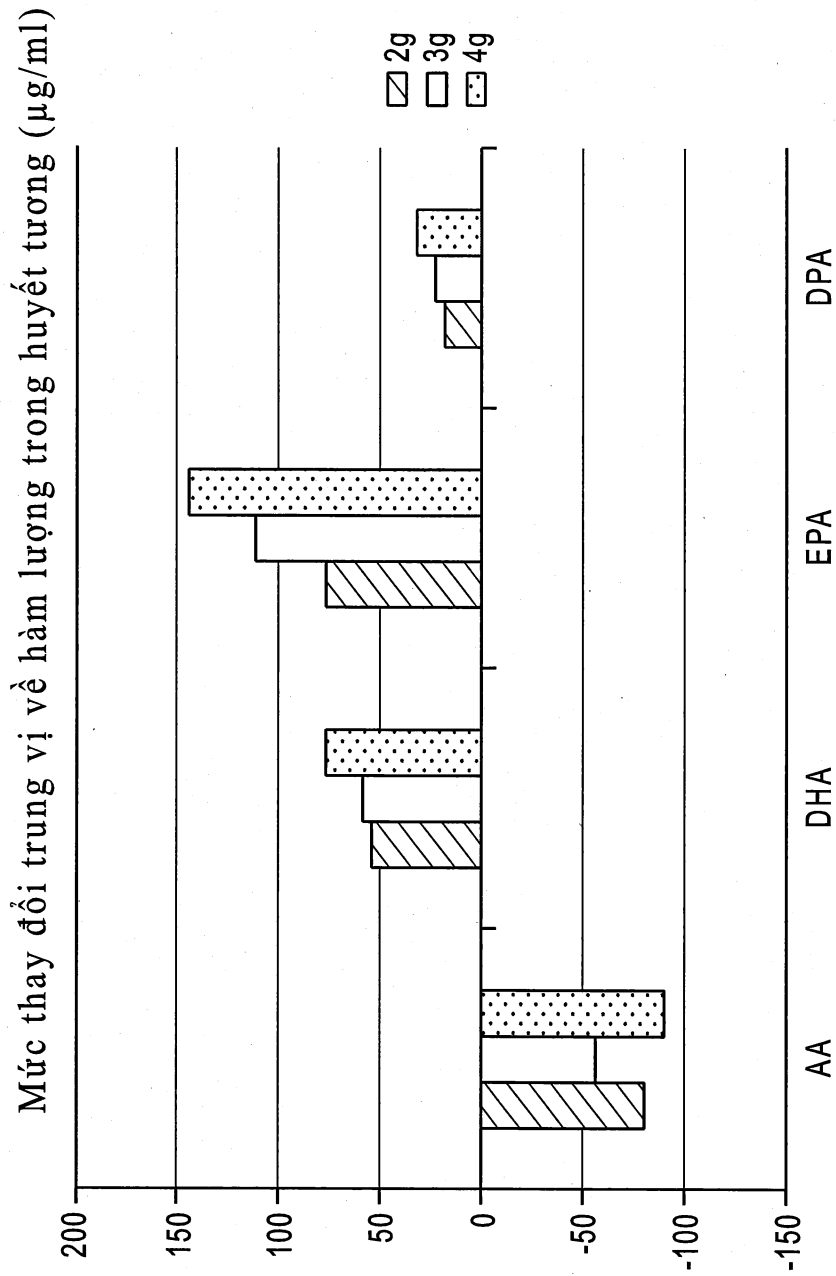


FIG. 22B

26/66

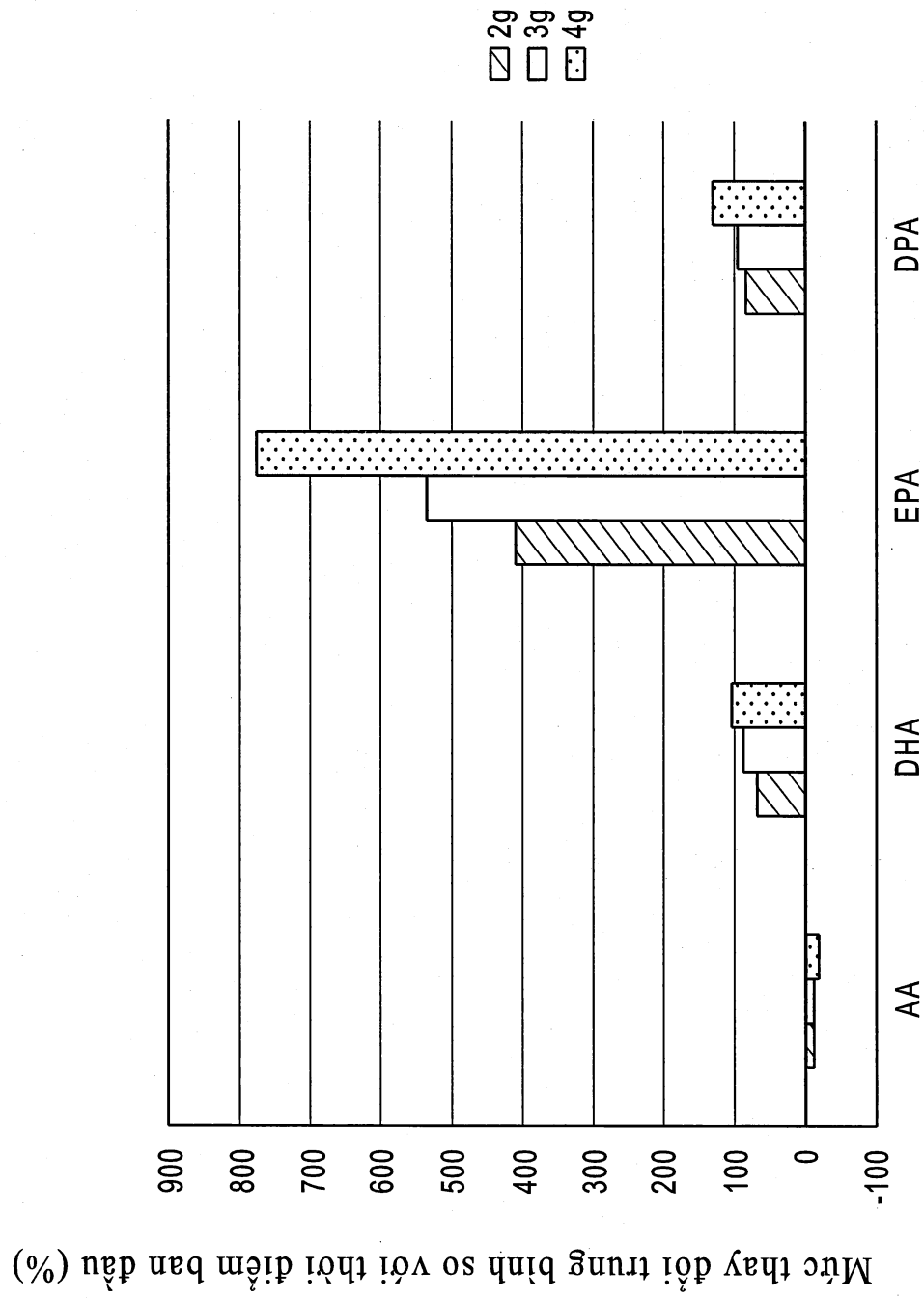


FIG. 23A

27/66

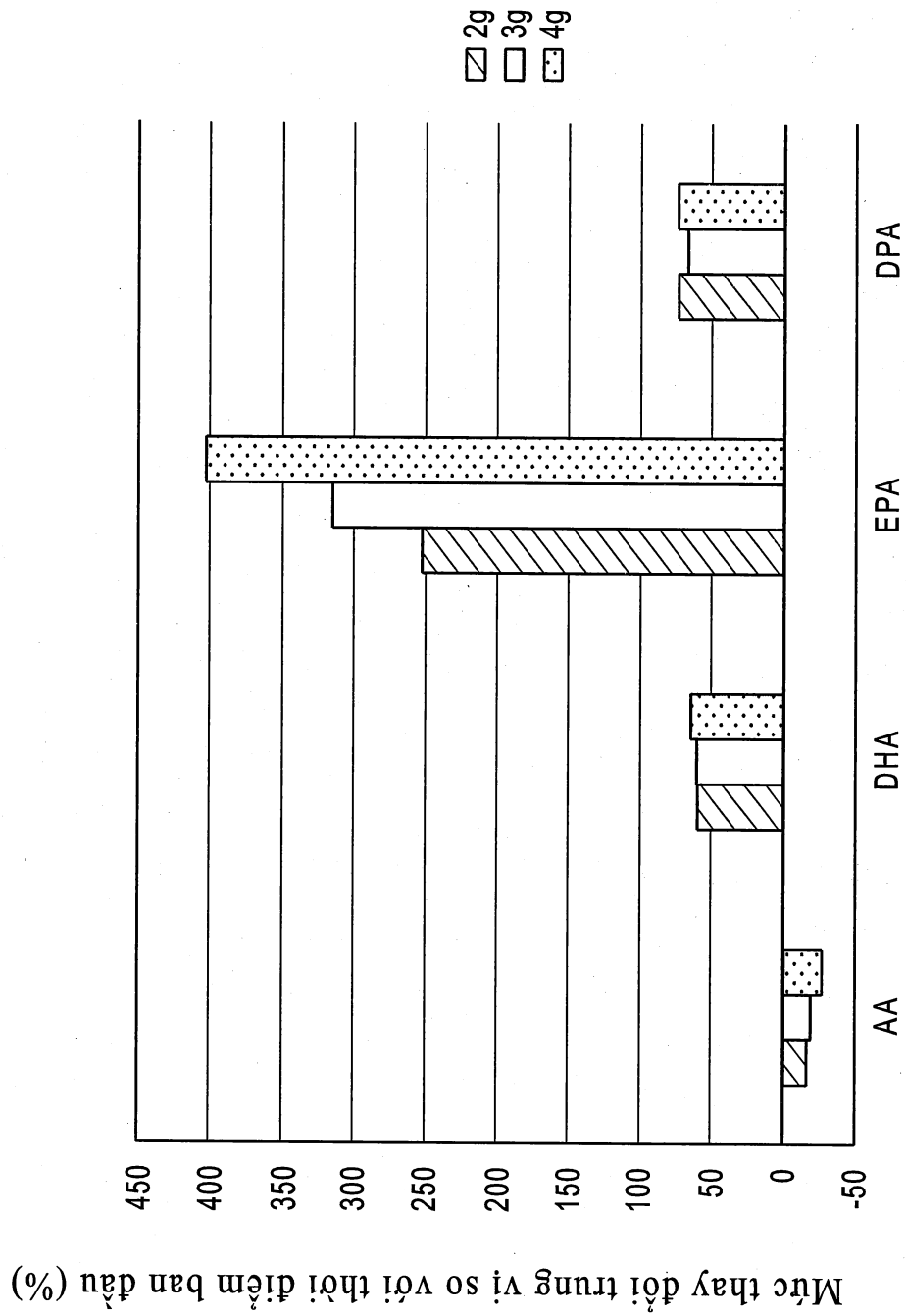
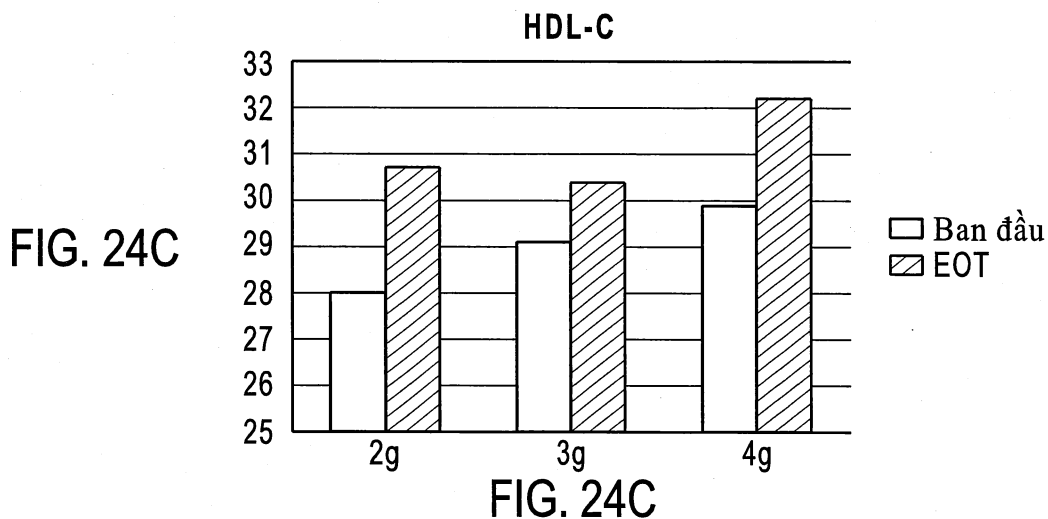
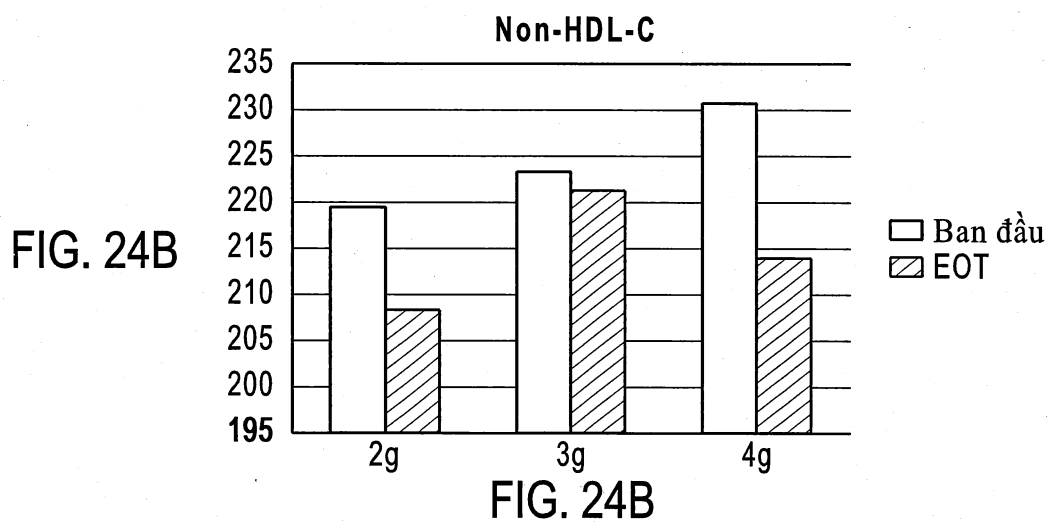
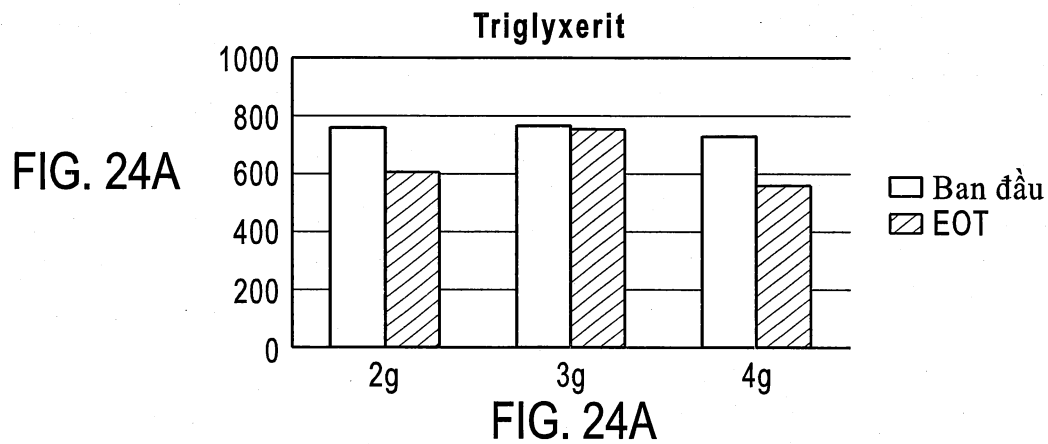


FIG. 23B

28/66

Hàm lượng tuyệt đối trung bình trong huyết tương (mg/dl)



29/66

Hàm lượng tuyệt đối trung bình trong huyết tương (mg/dl)

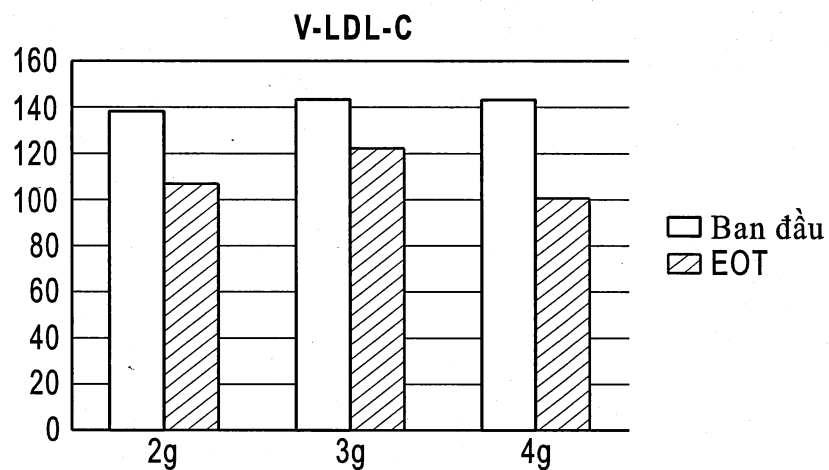


FIG. 24D

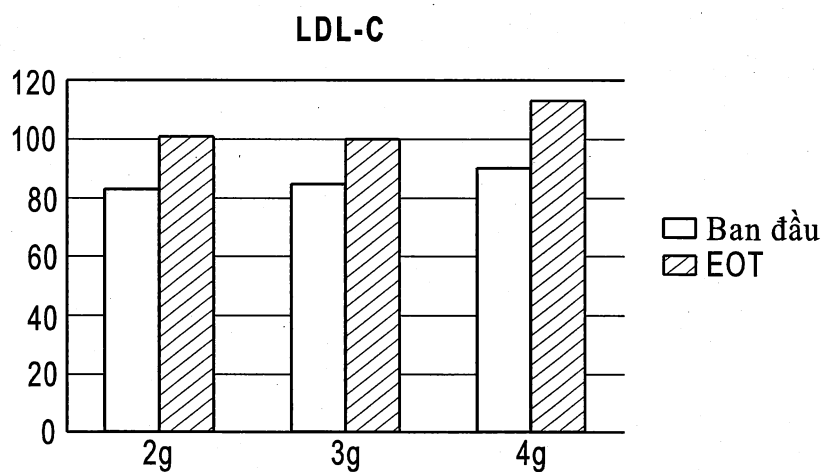


FIG. 24E

30/66

Hàm lượng tuyệt đối trung bình trong huyết tương (mg/dl)

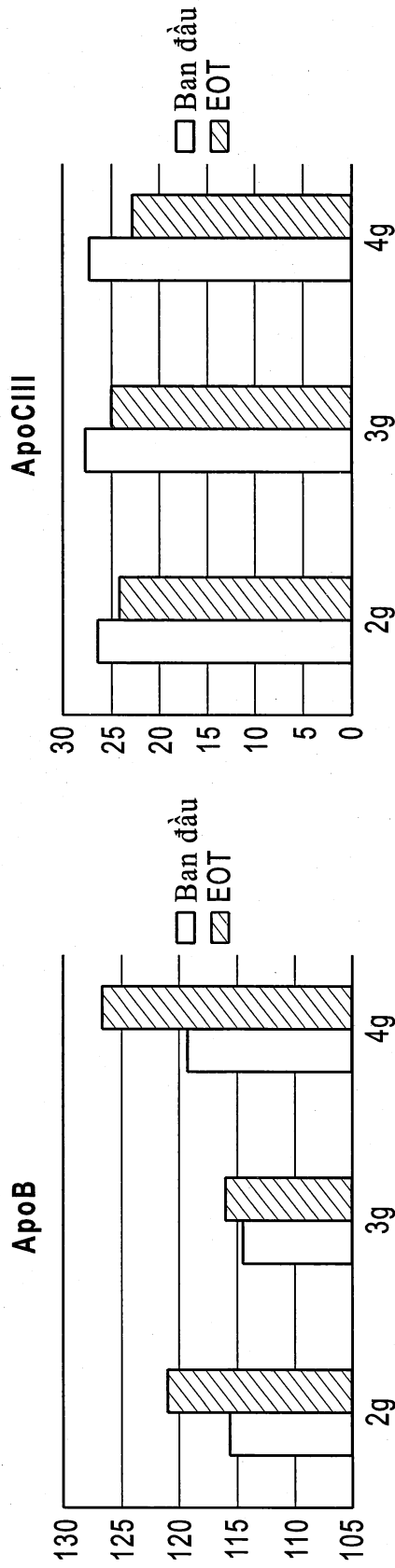


FIG. 24G

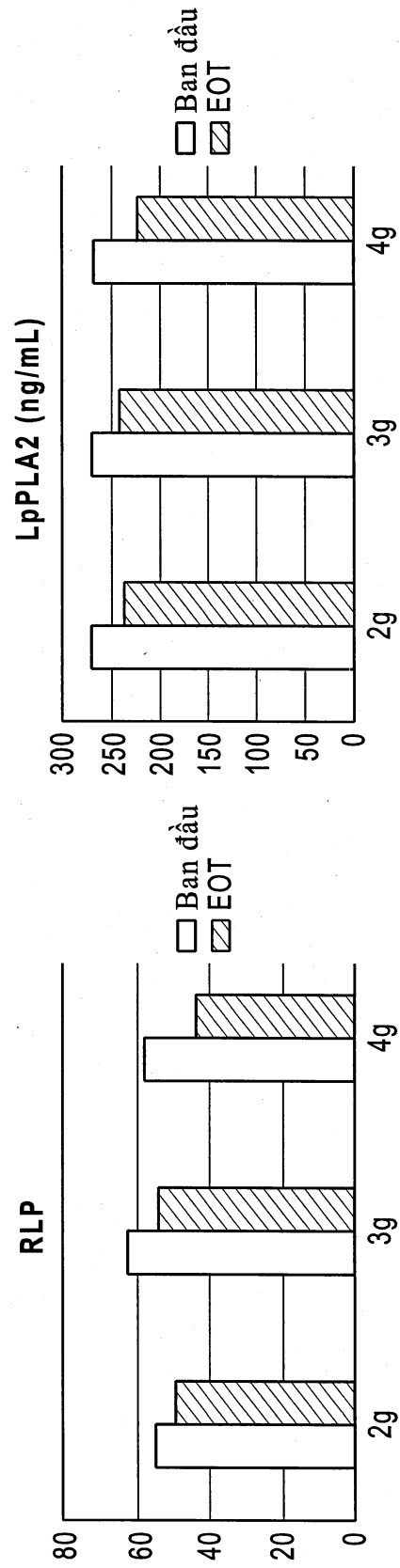


FIG. 24I

FIG. 24F

FIG. 24H

19630

31/66

Hàm lượng tuyệt đối trung vị trong huyết tương (mg/dl)

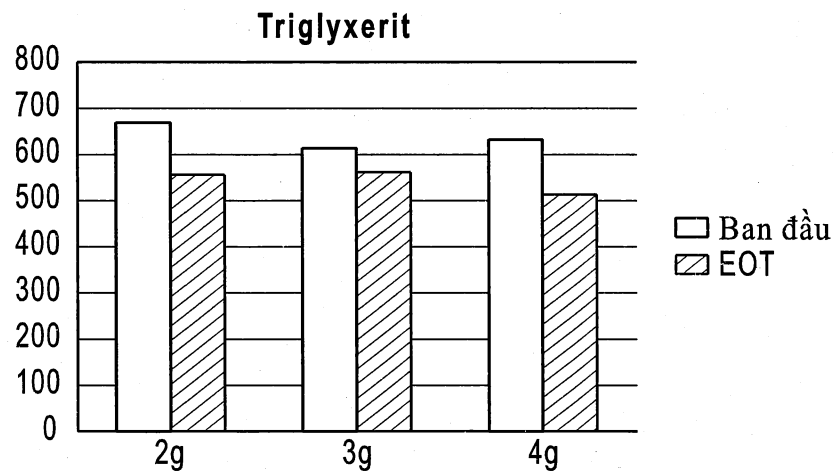


FIG. 25A

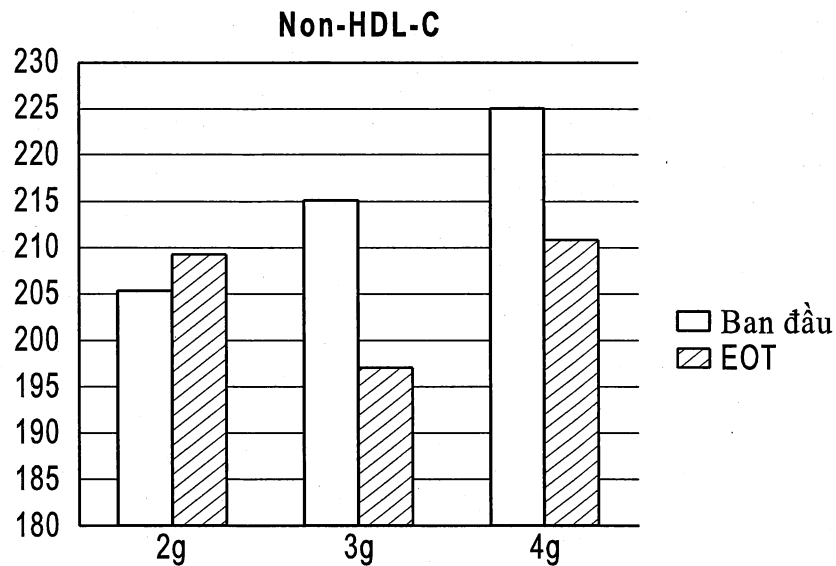


FIG. 25B

32/66

Hàm lượng tuyệt đối trung vị trong huyết tương (mg/dl)

FIG. 25C

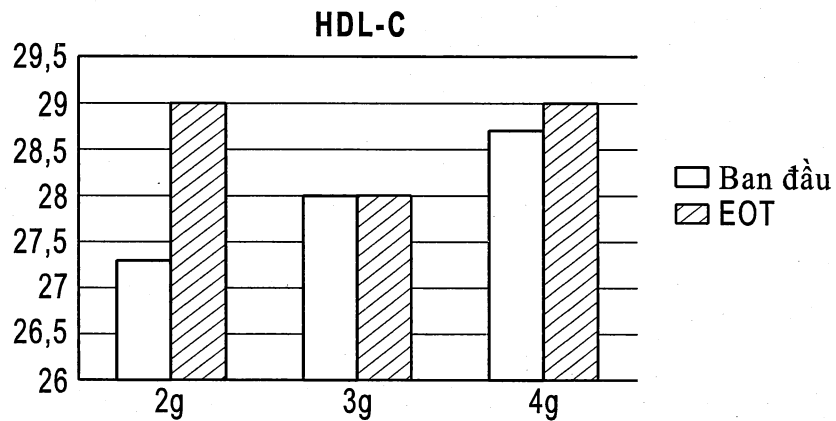


FIG. 25D

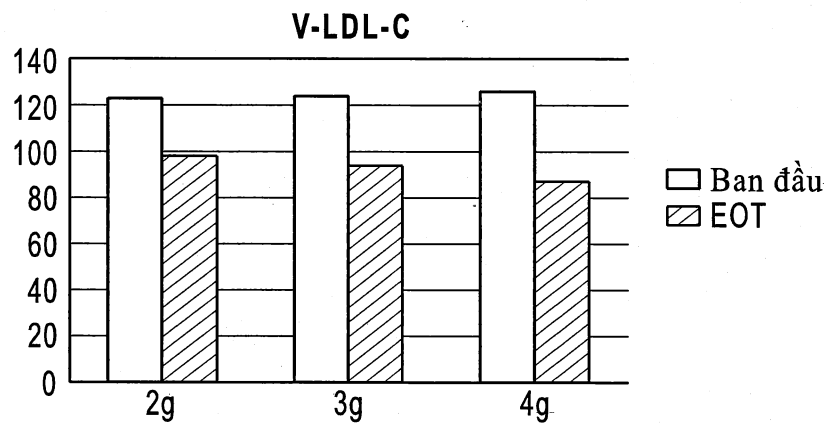
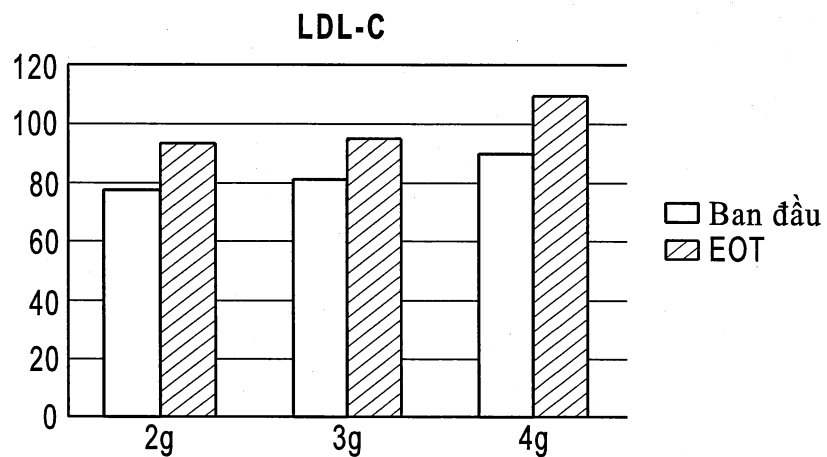


FIG. 25E



33/66

Hàm lượng tuyệt đối trung vị trong huyết tương (mg/dl)

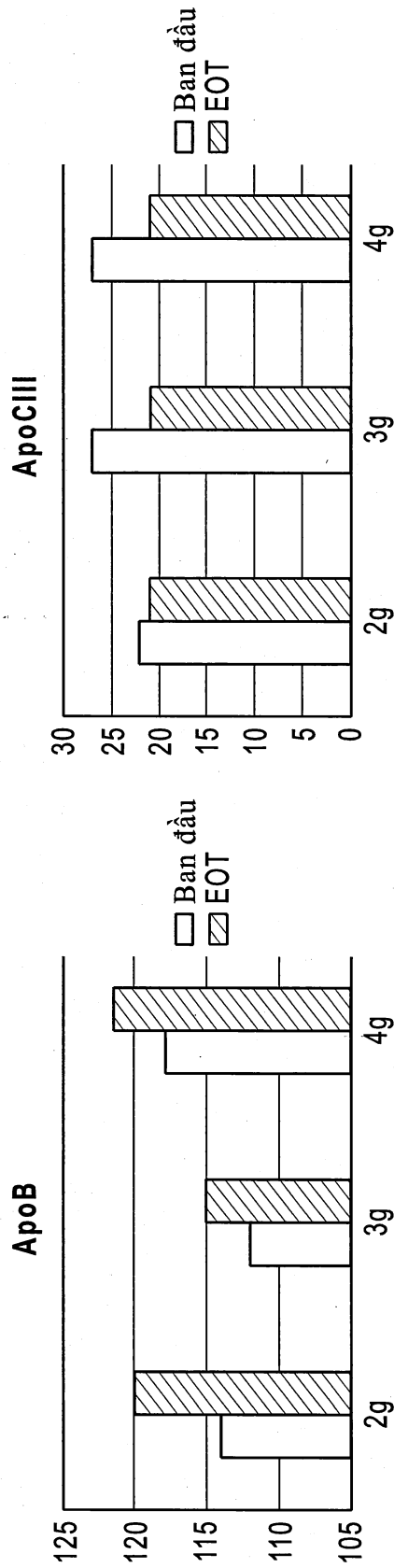


FIG. 25G

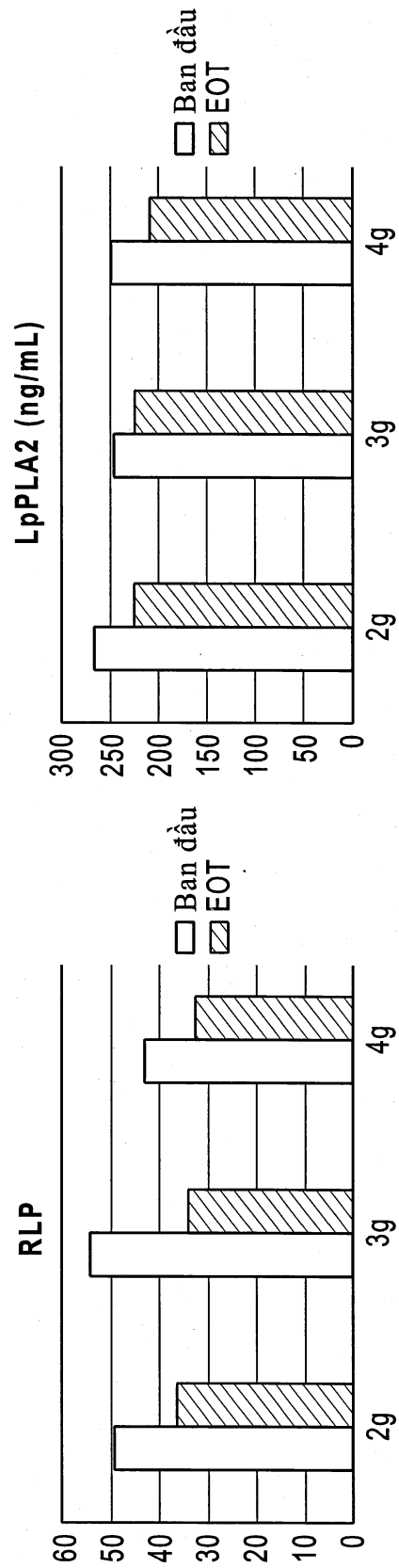


FIG. 25I

FIG. 25F

FIG. 25H

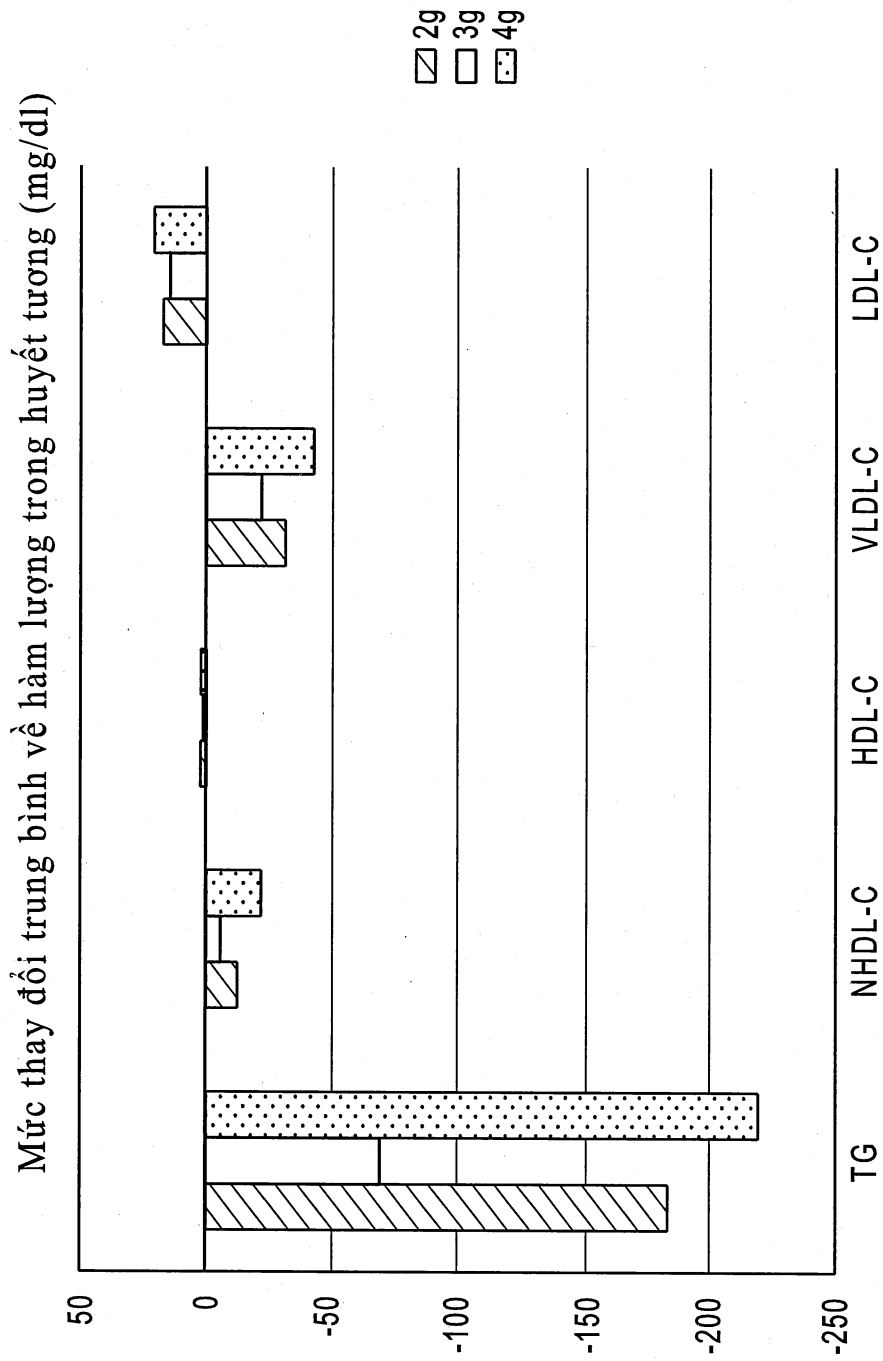


FIG. 26A

35/66

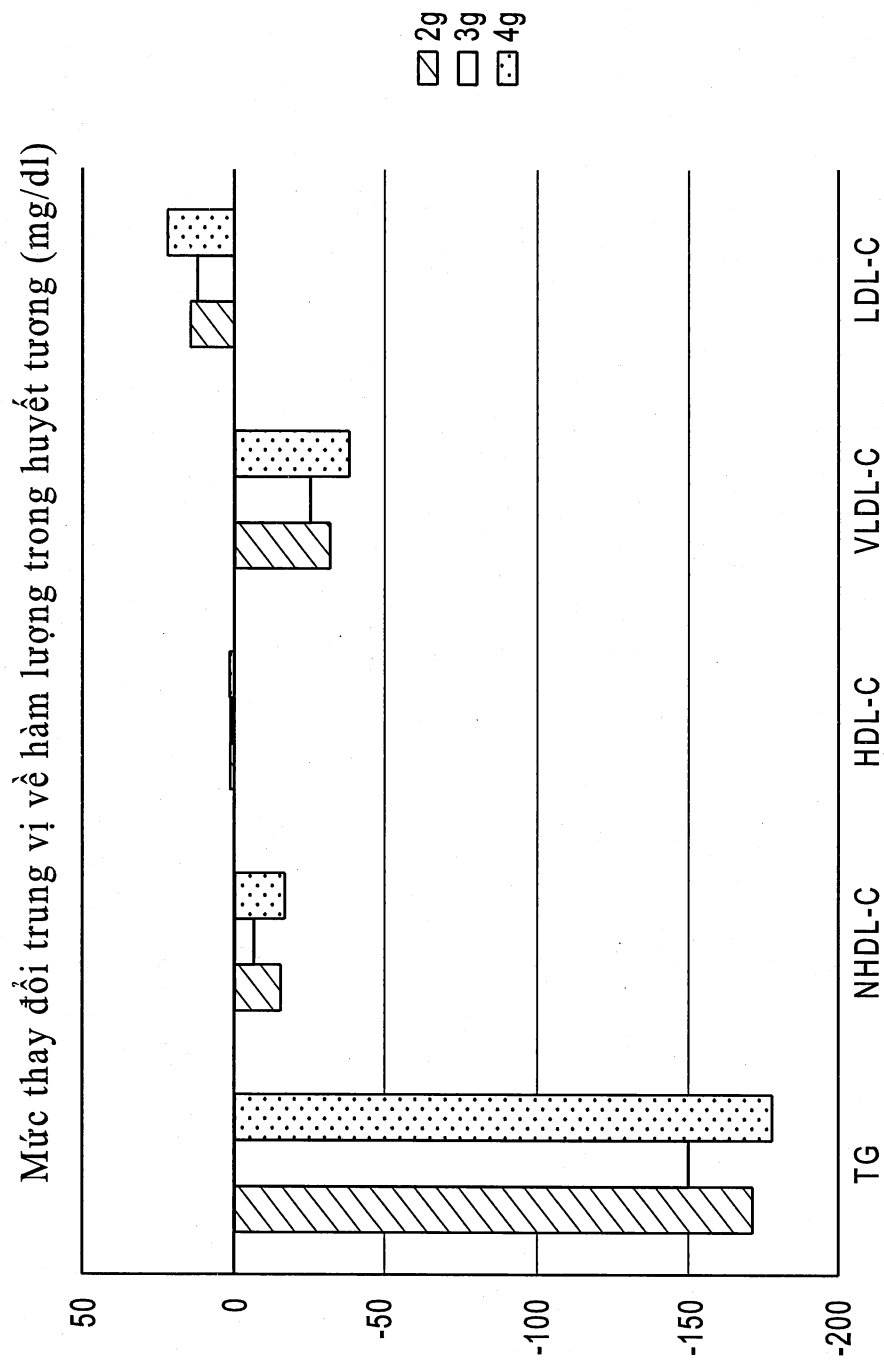


FIG. 26B

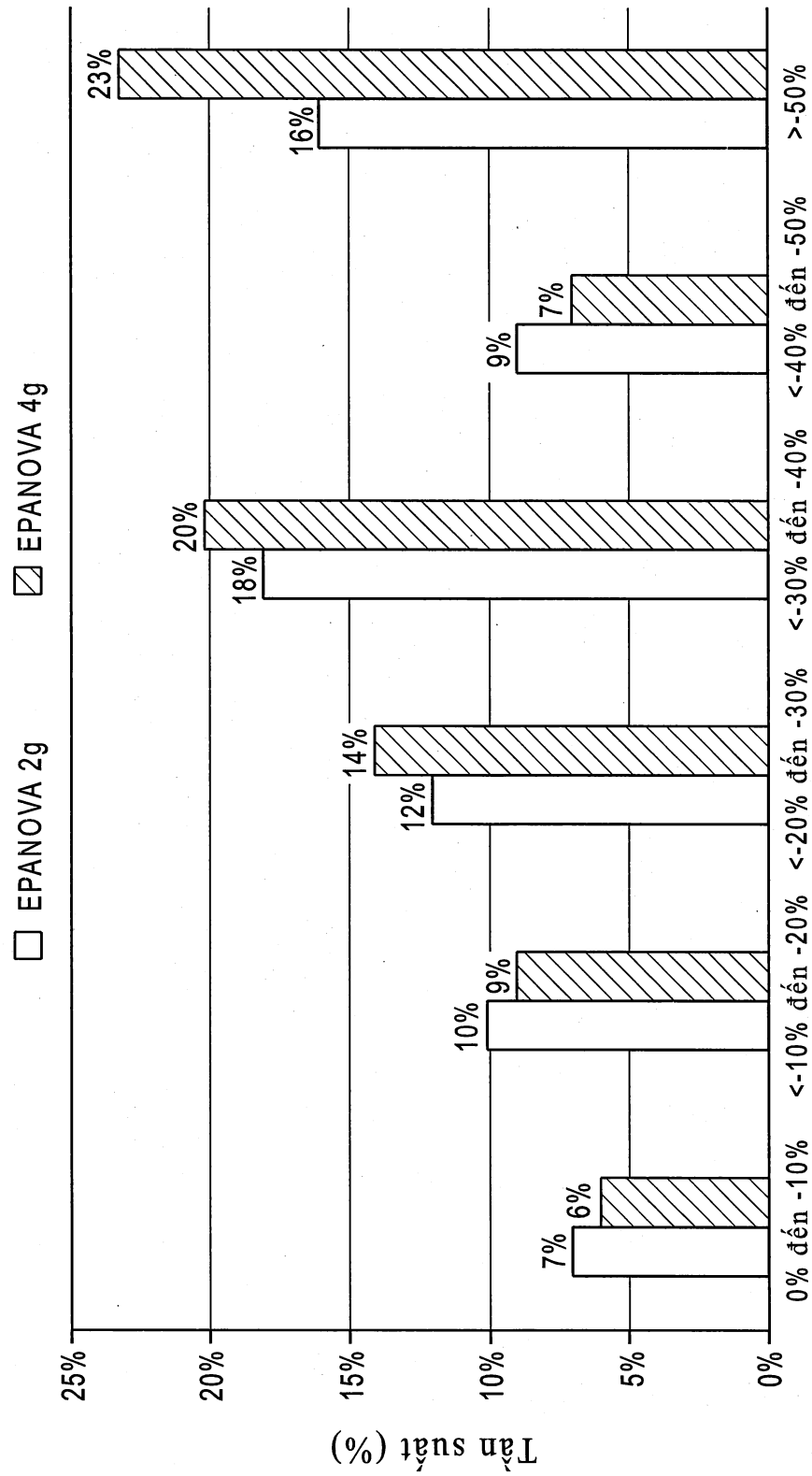


FIG. 27

37/66

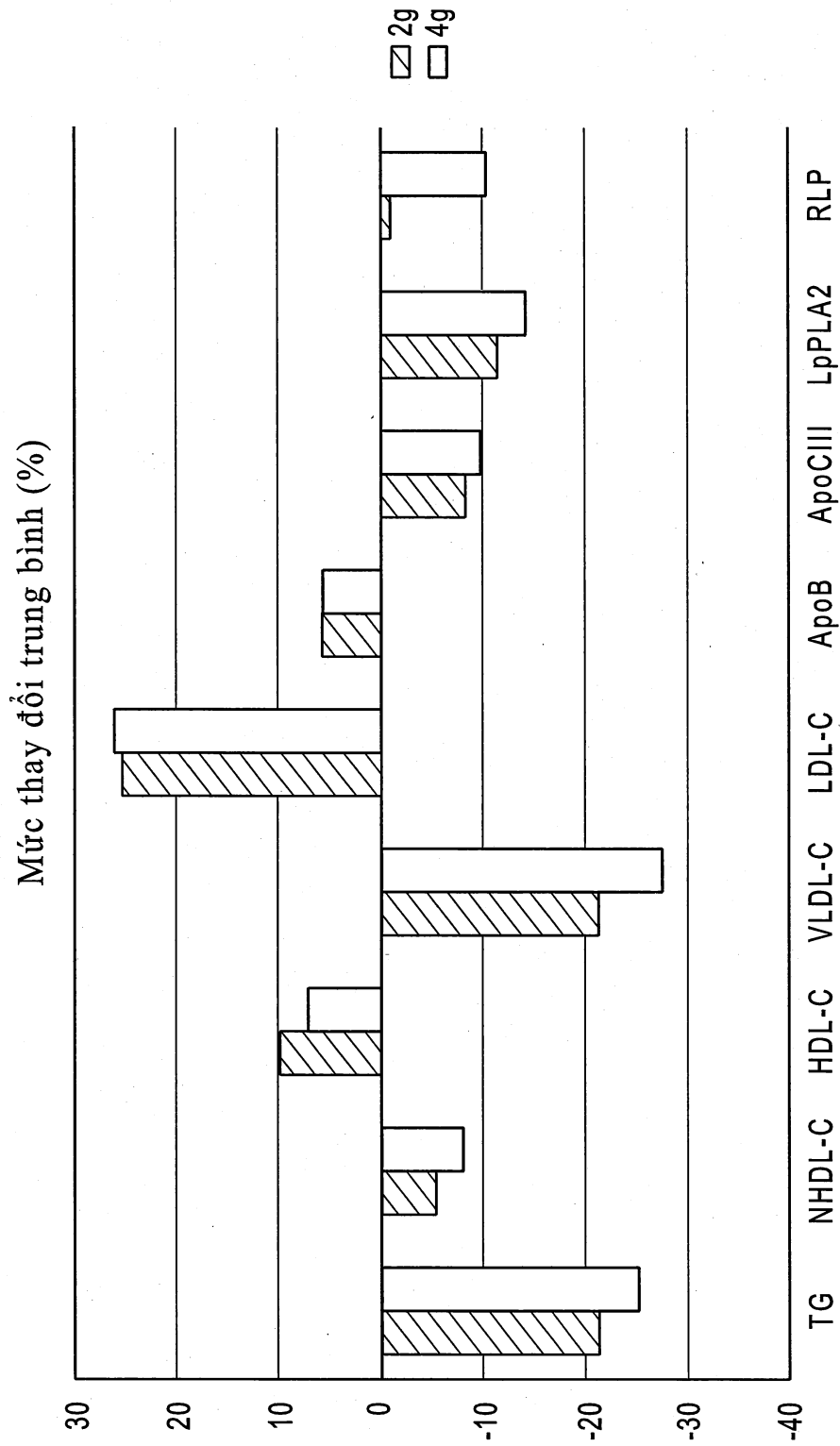


FIG. 28A

38/66

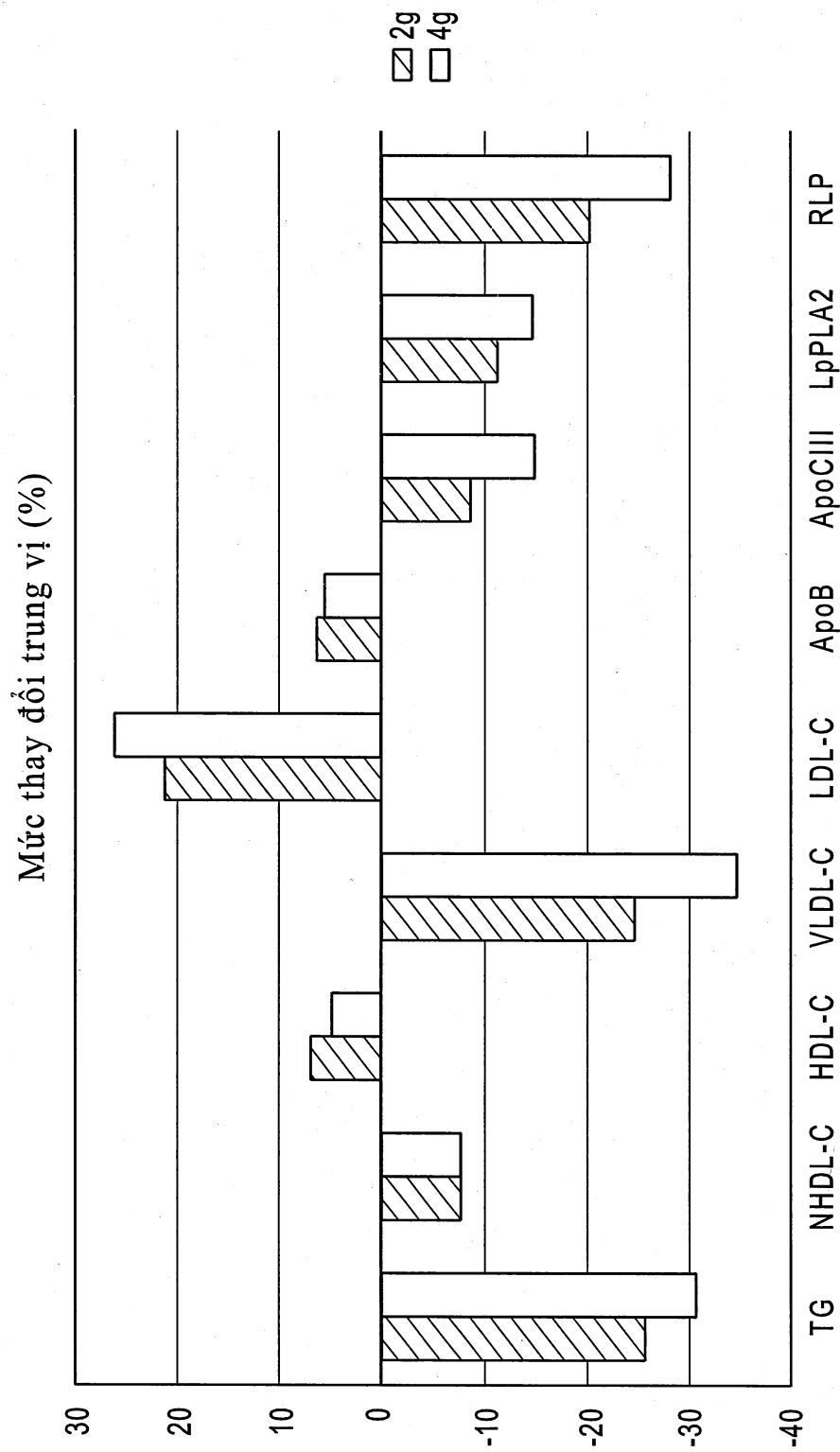


FIG. 28B

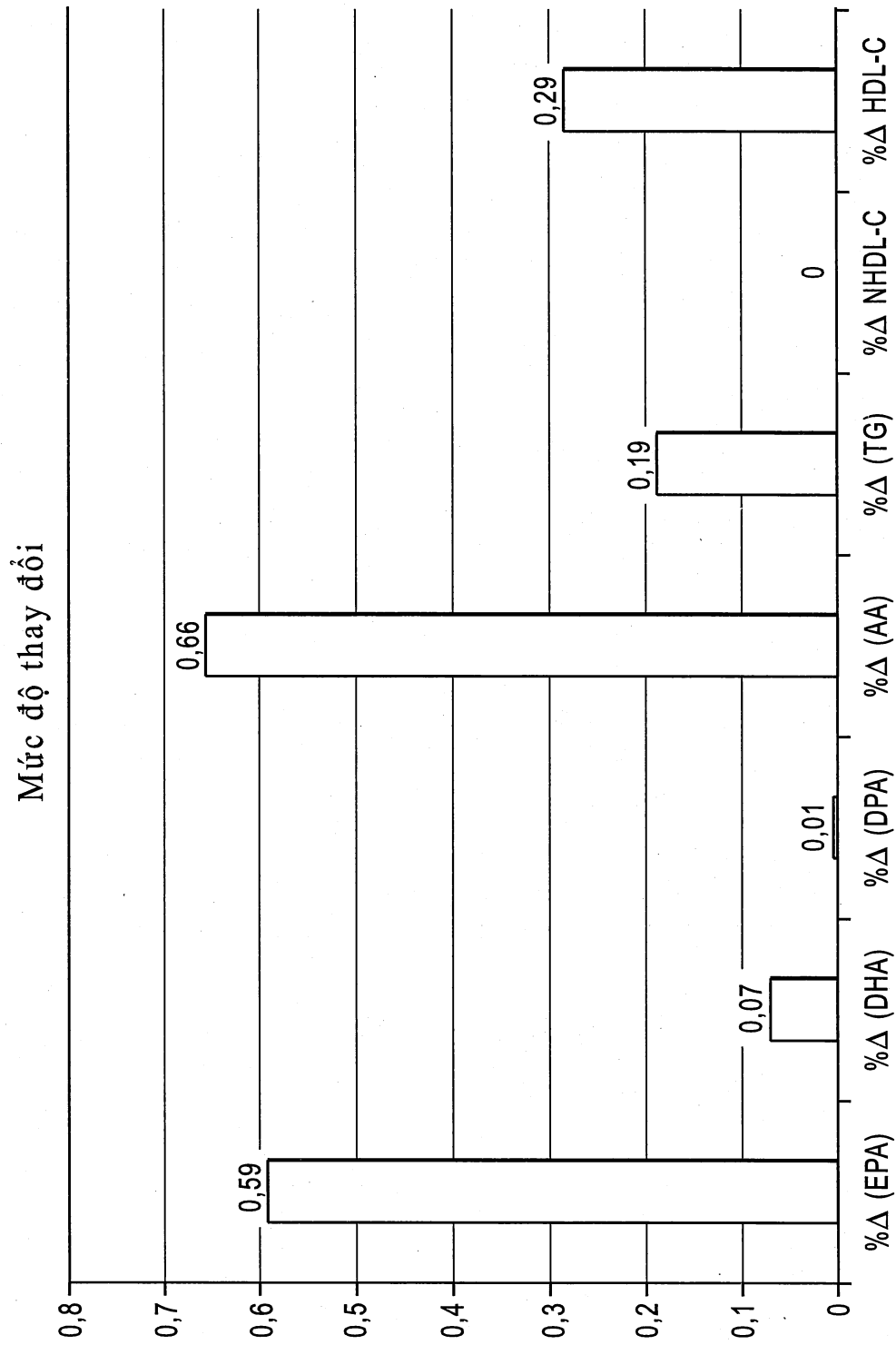


FIG. 29

40/66

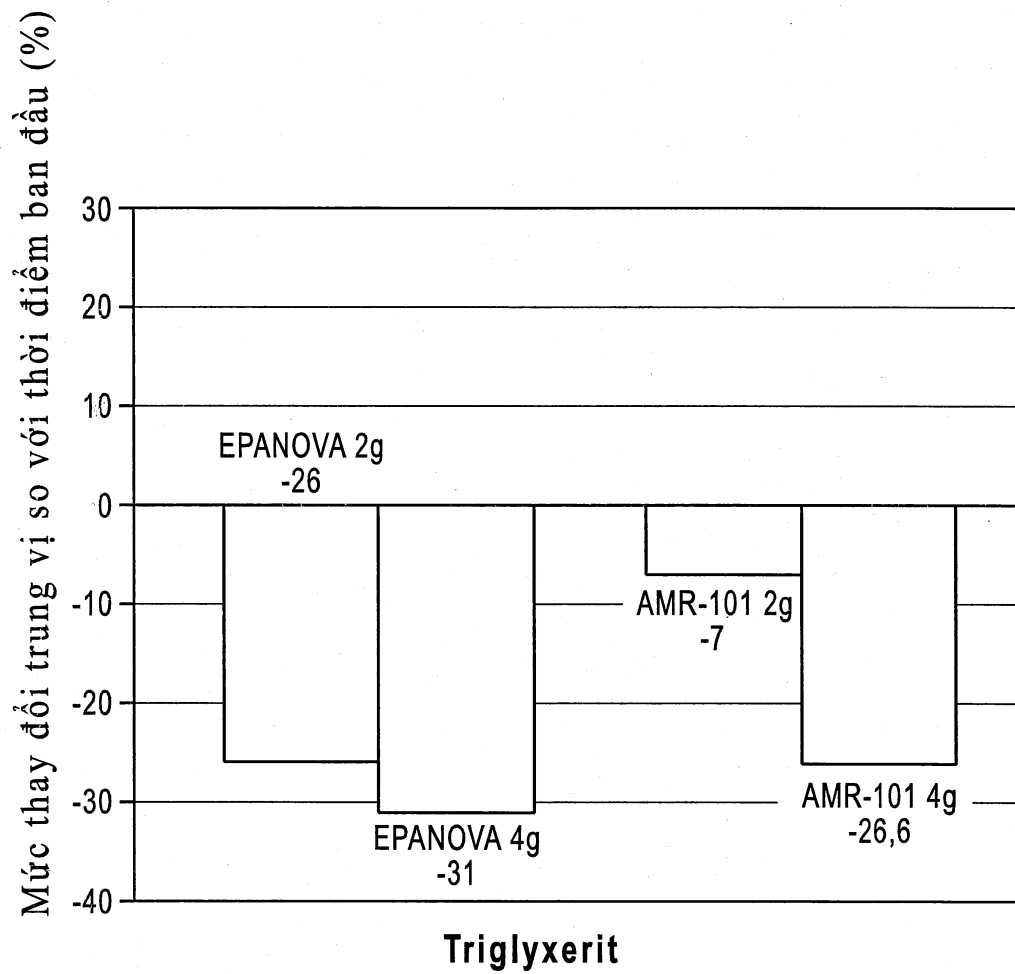


FIG. 30

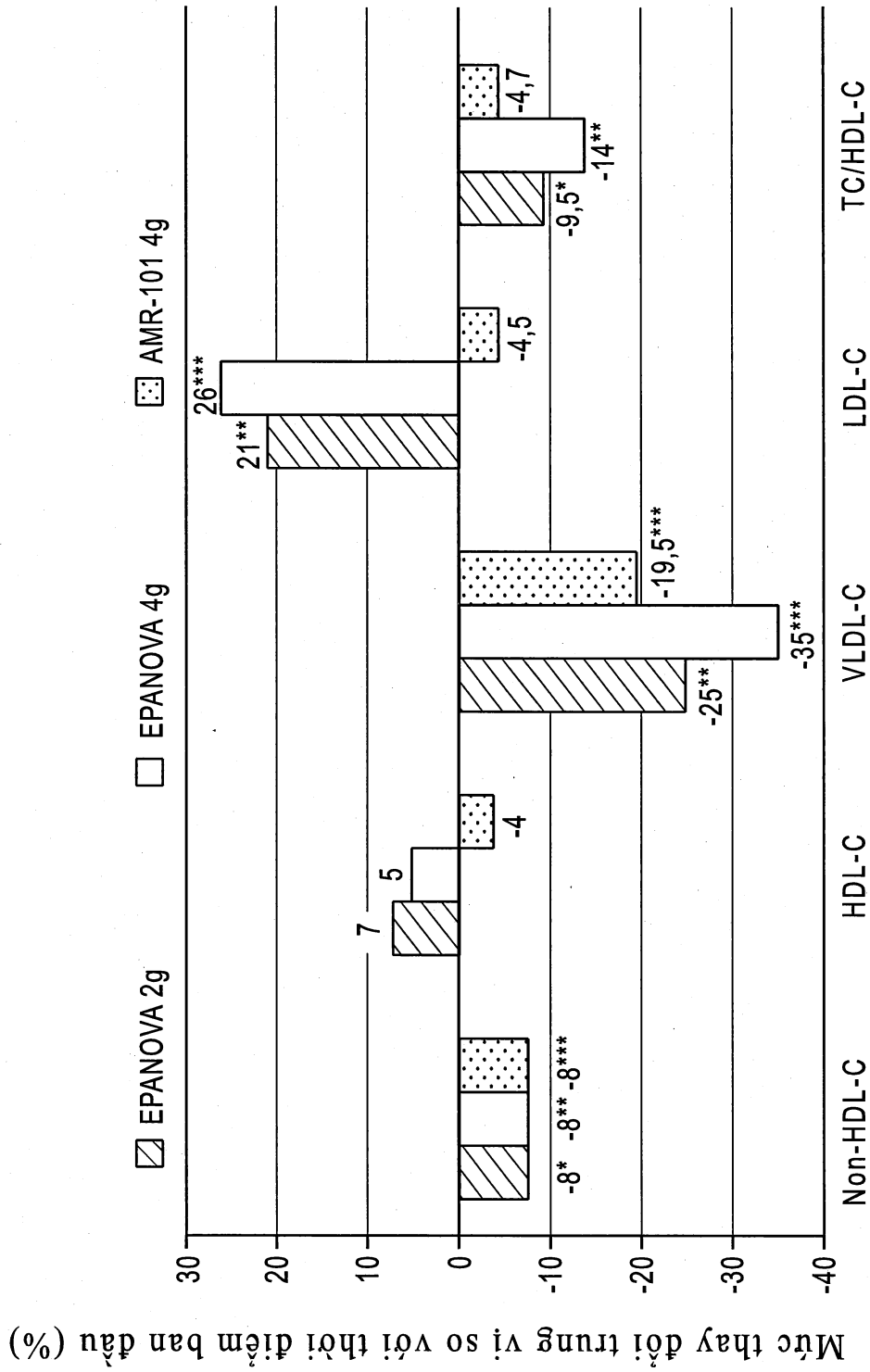


FIG. 31

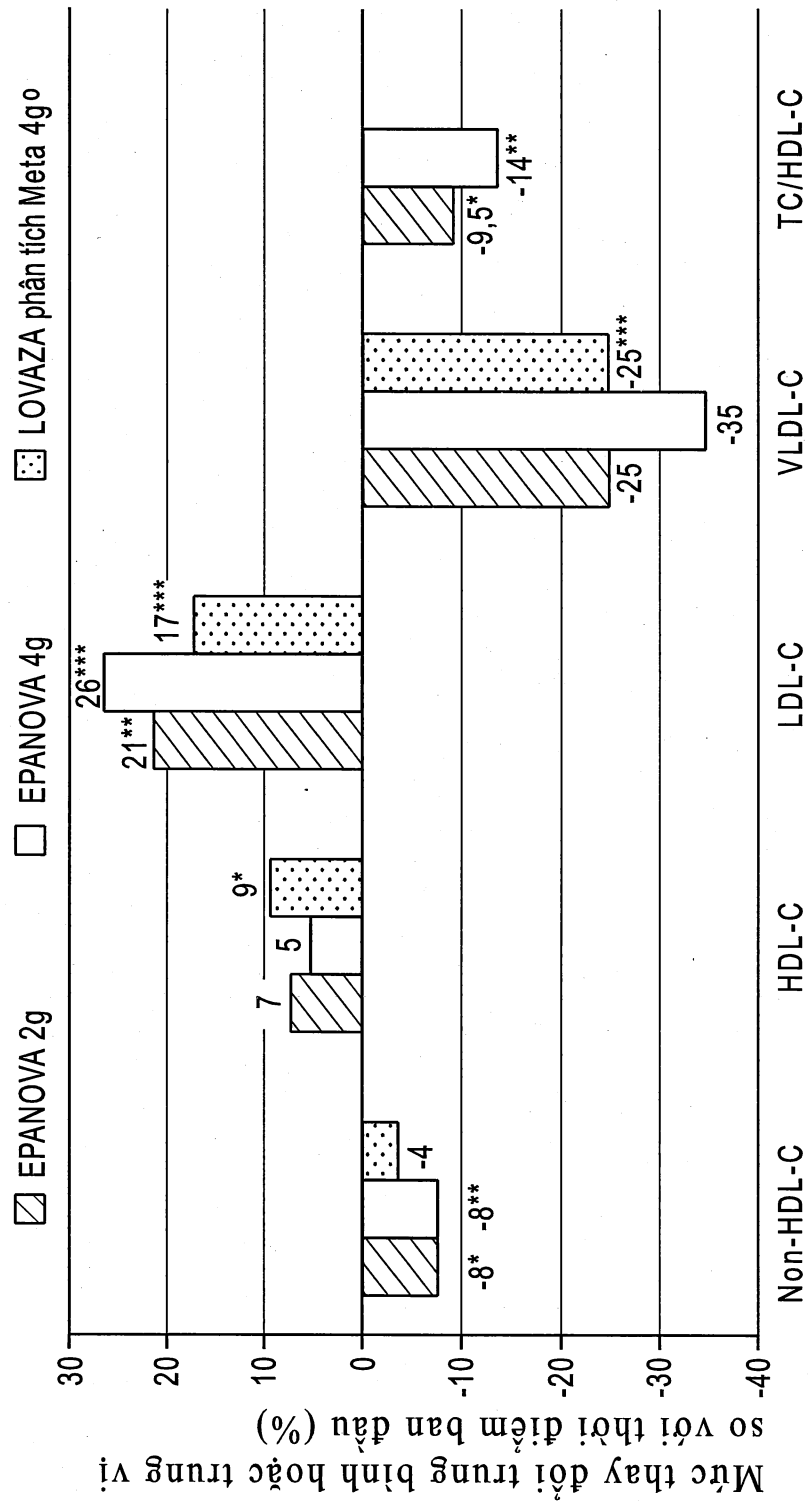


FIG. 32

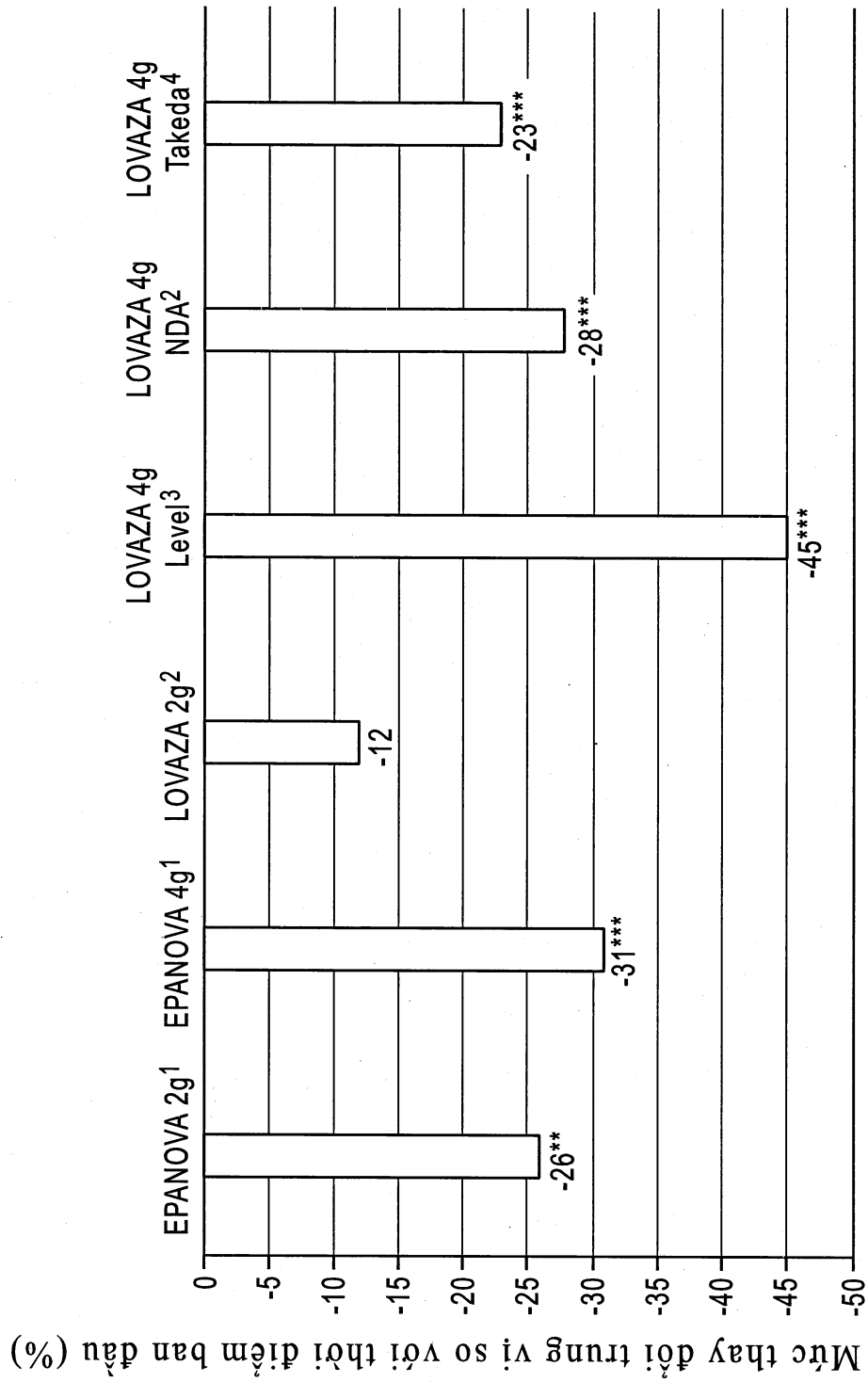
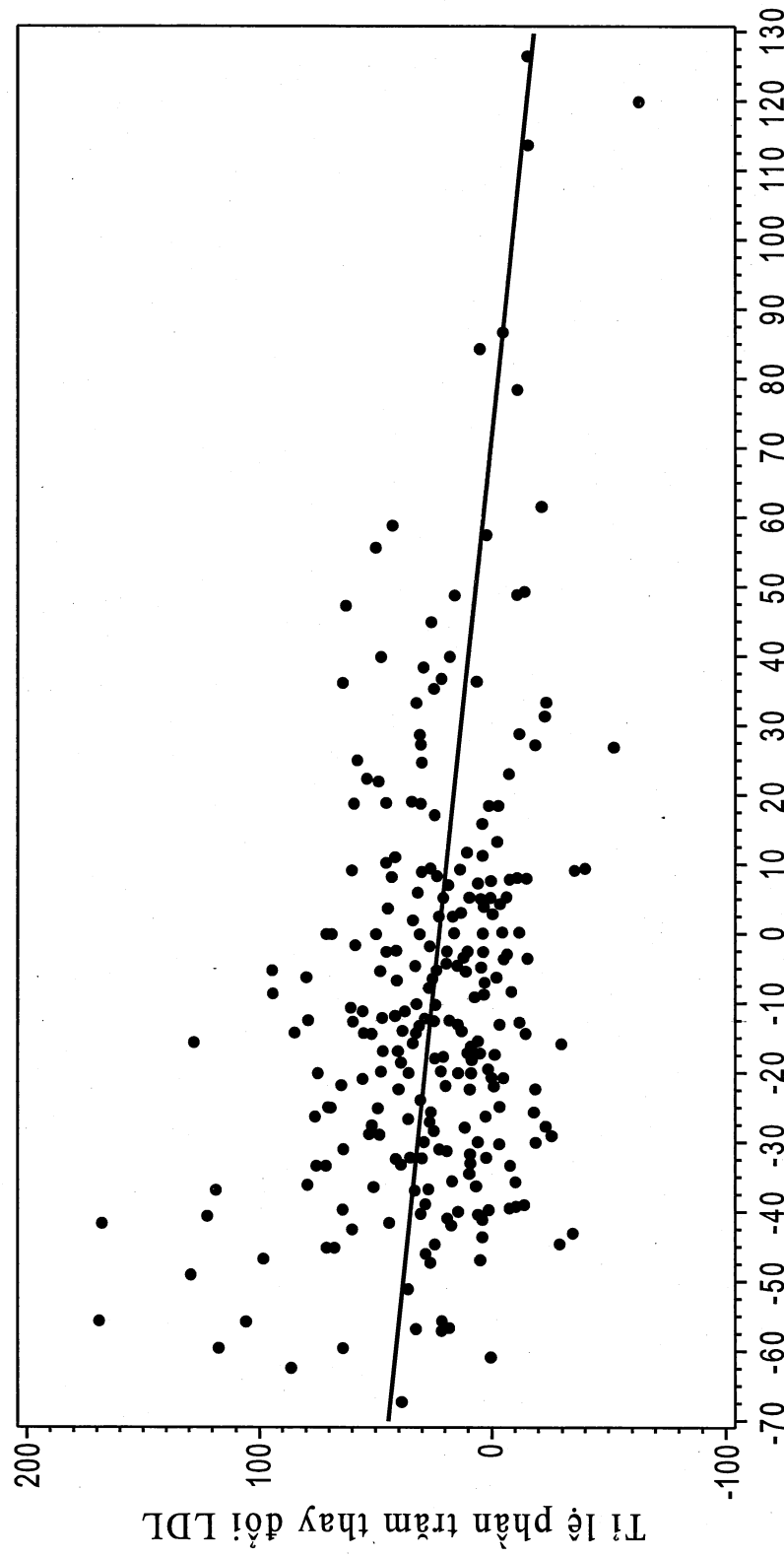


FIG. 33



Tỉ lệ phần trăm thay đổi APOC3

FIG. 34

45/66

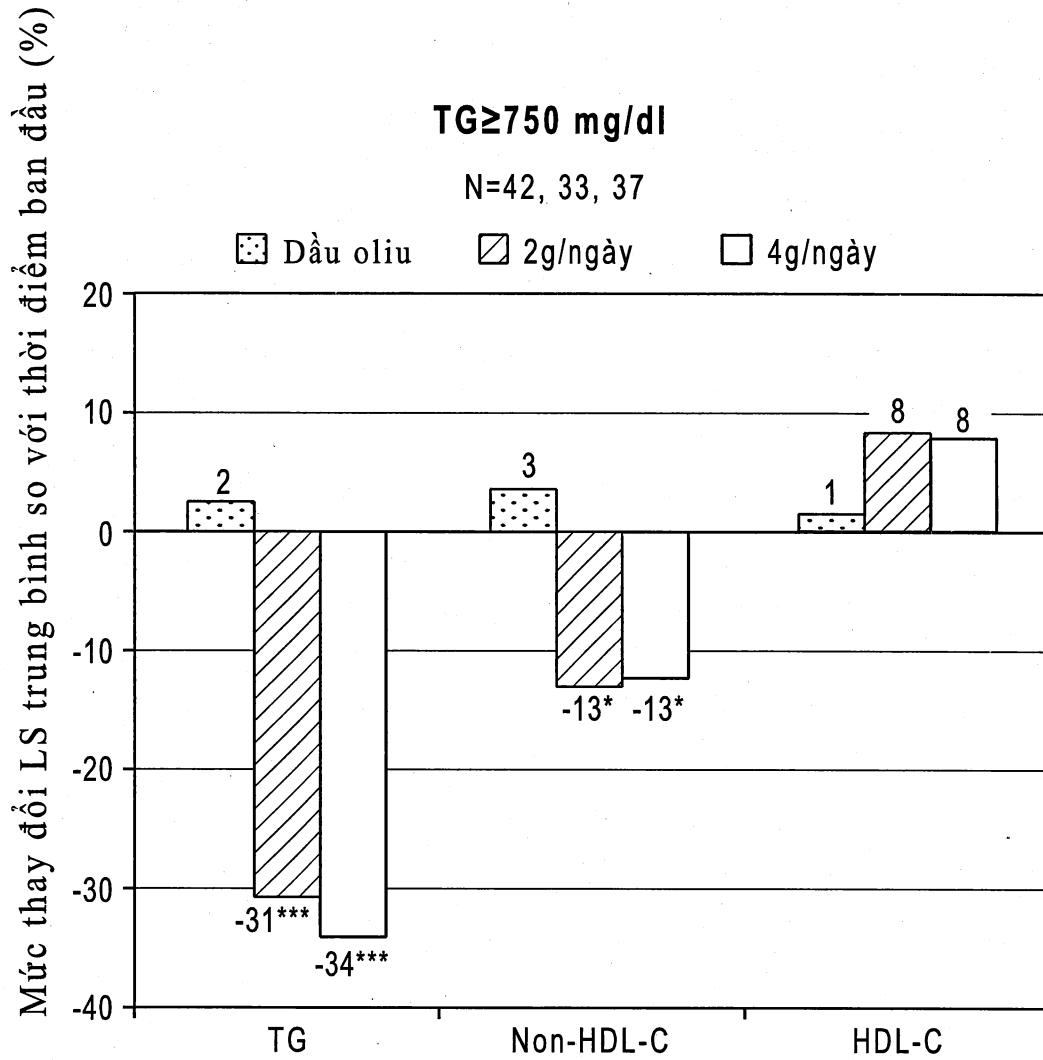


FIG. 35

46/66

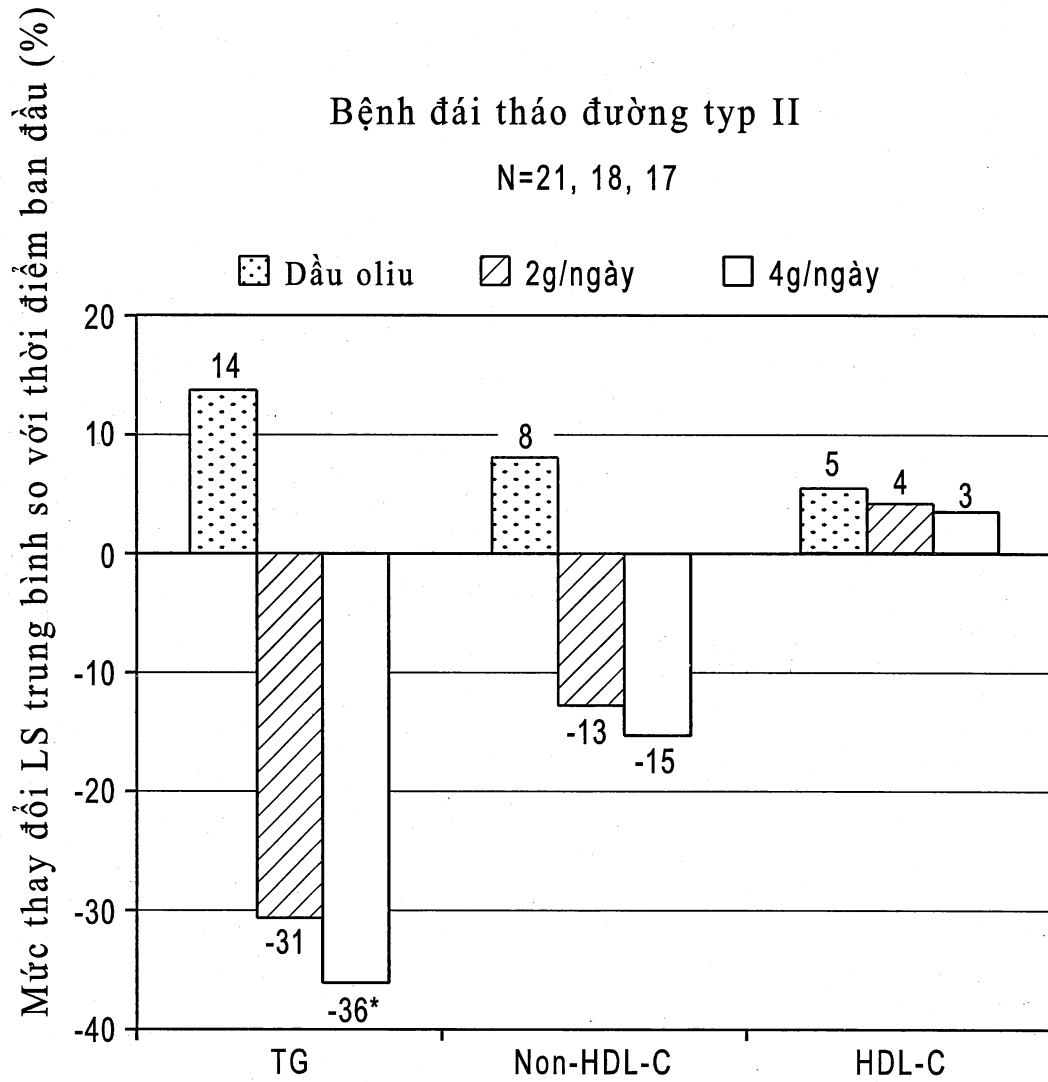


FIG. 36

47/66

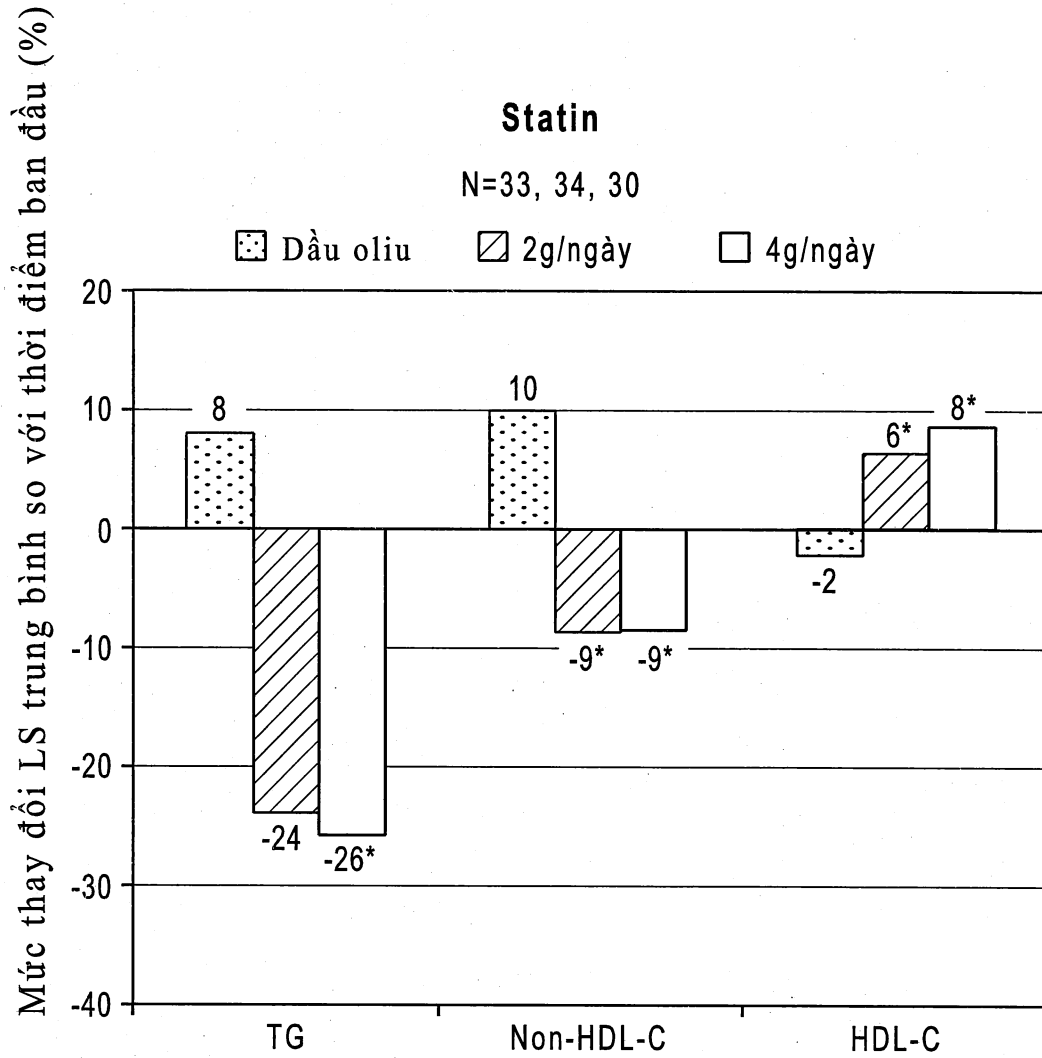


FIG. 37

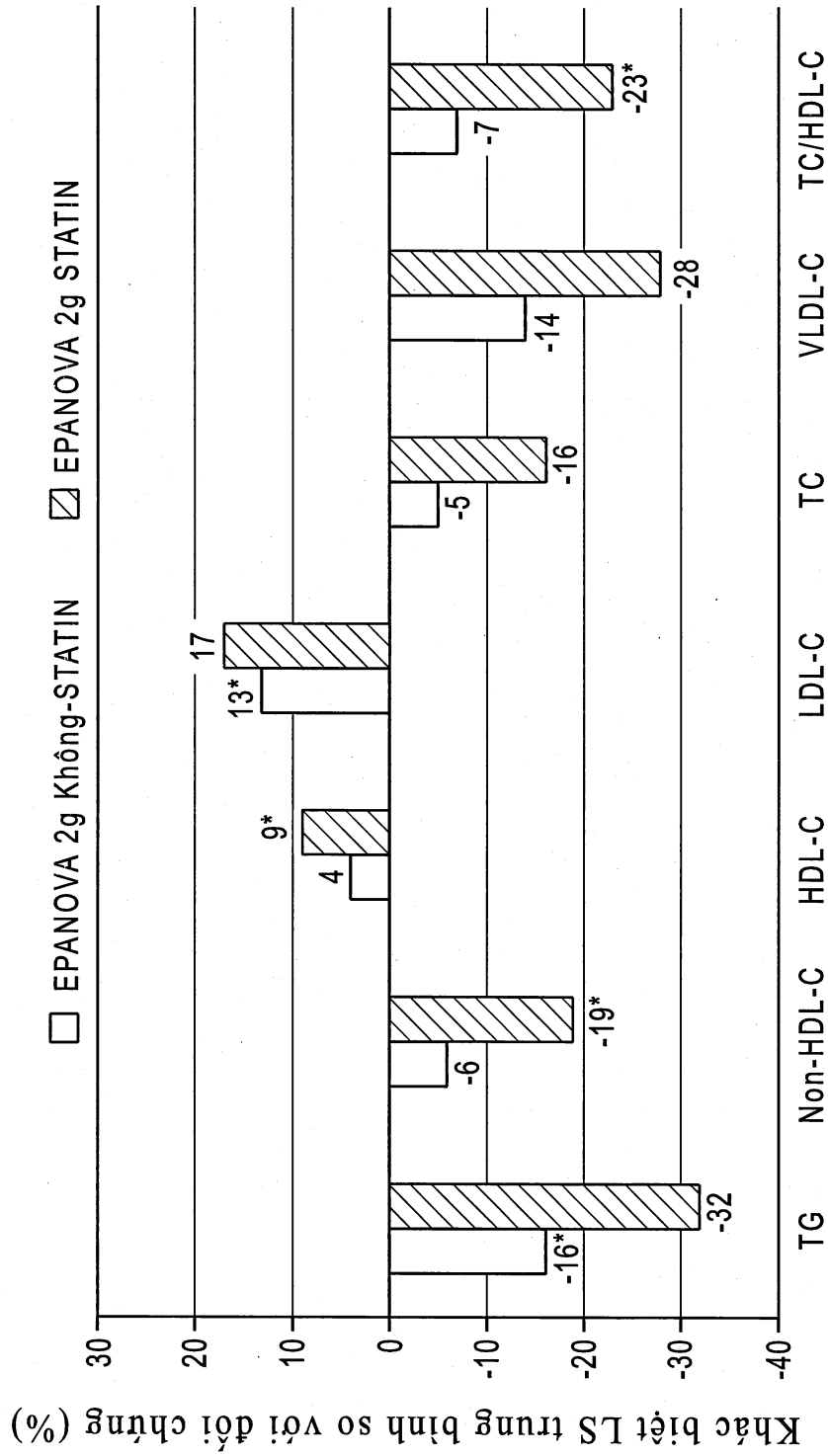


FIG. 38

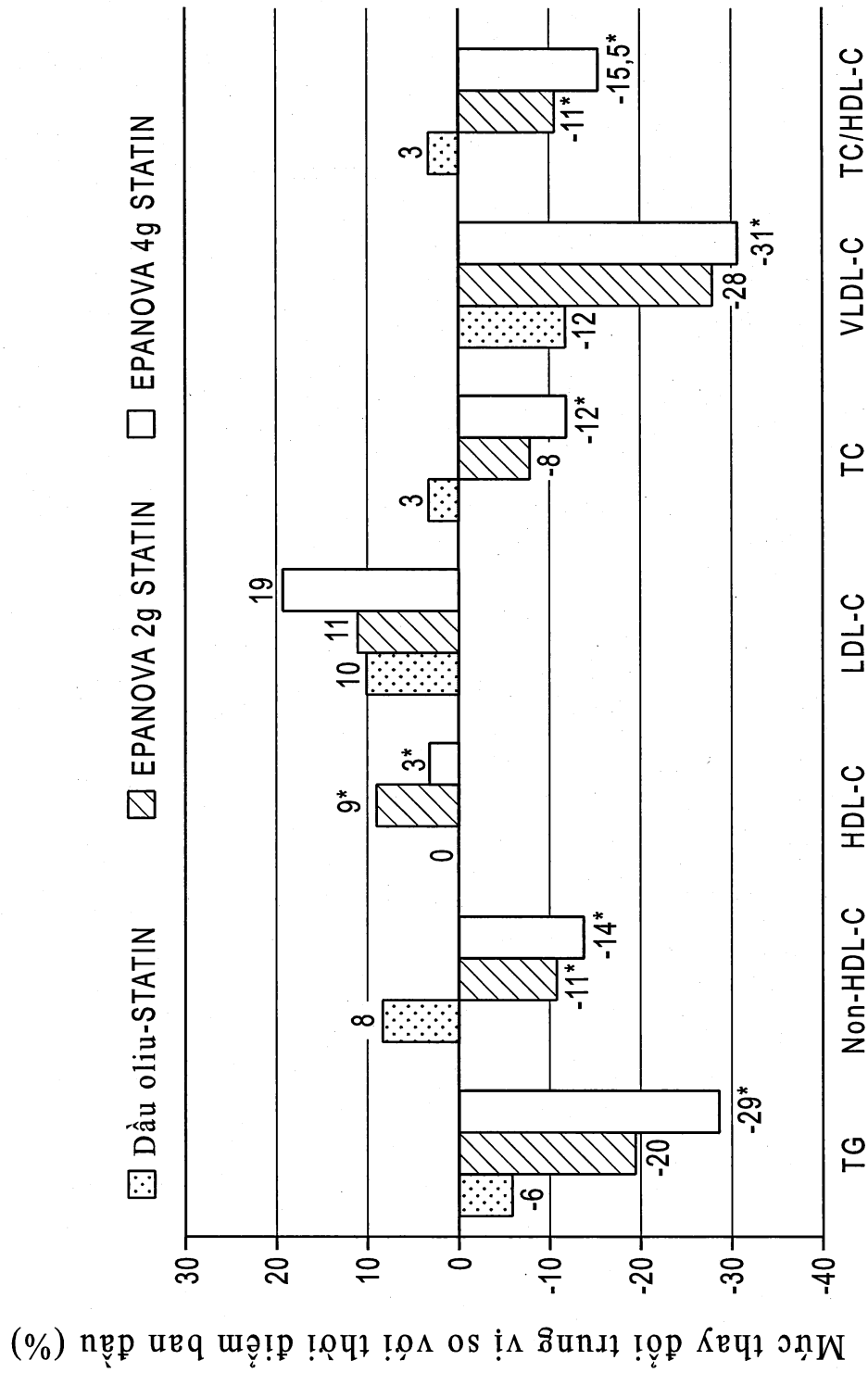


FIG. 39

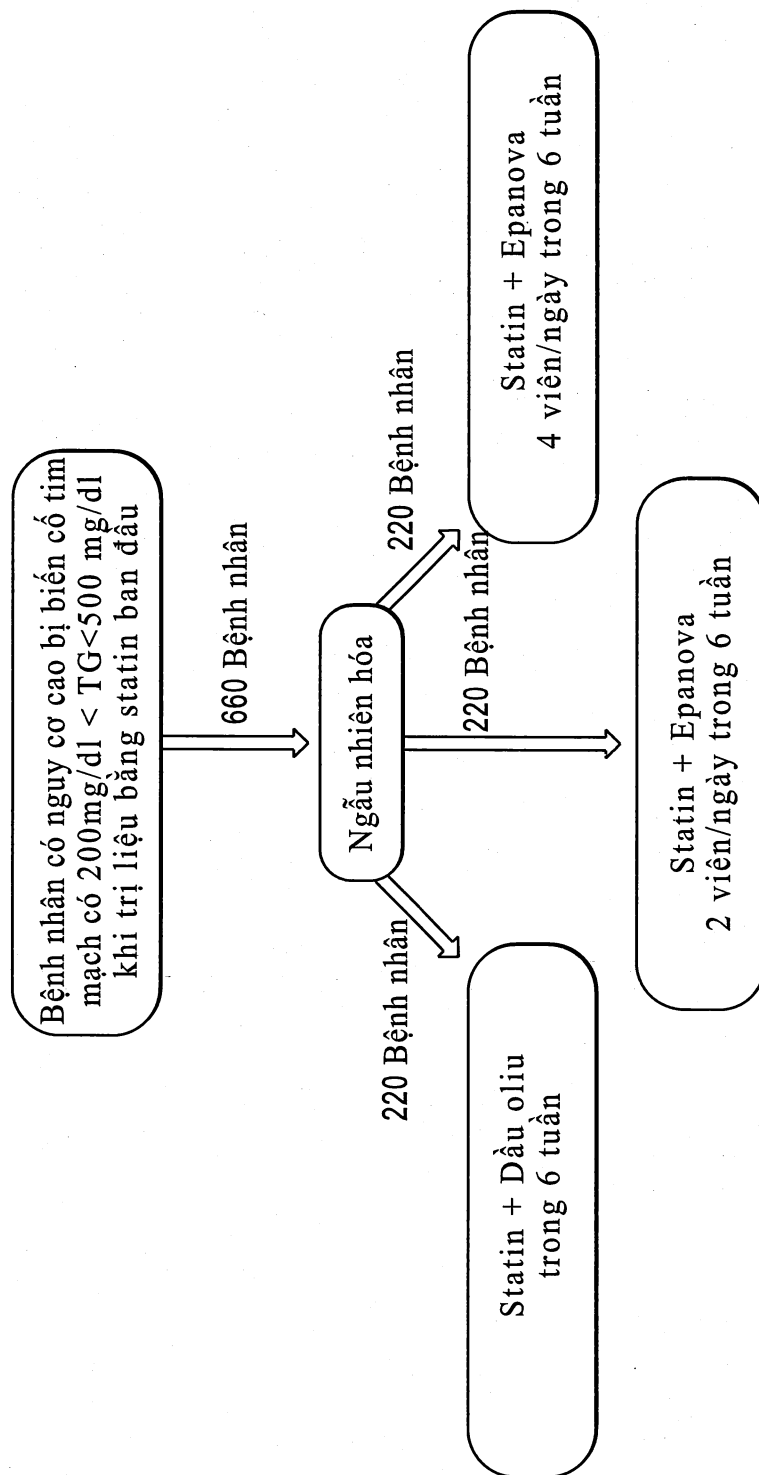


FIG. 40

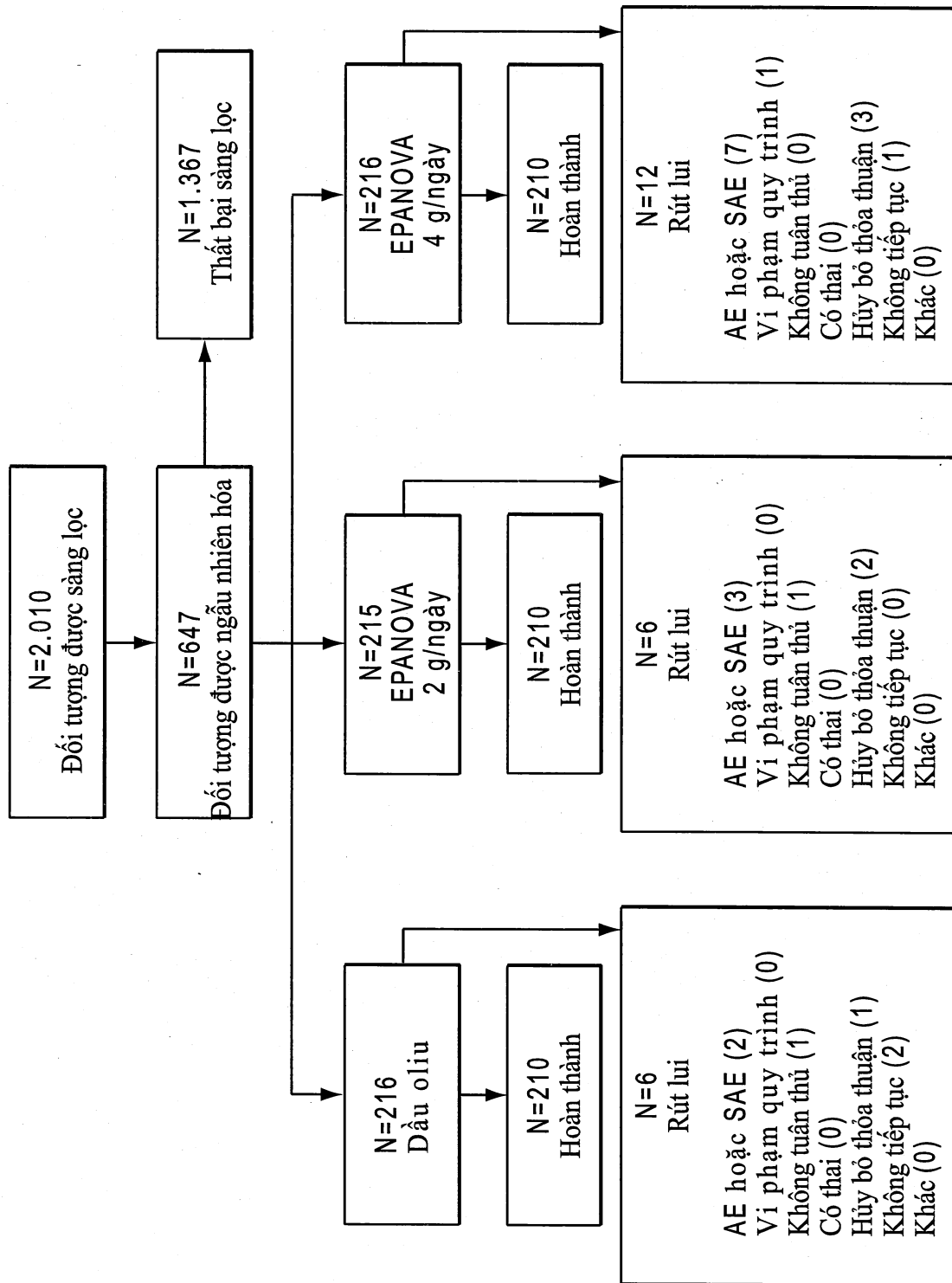


FIG. 41

52/66

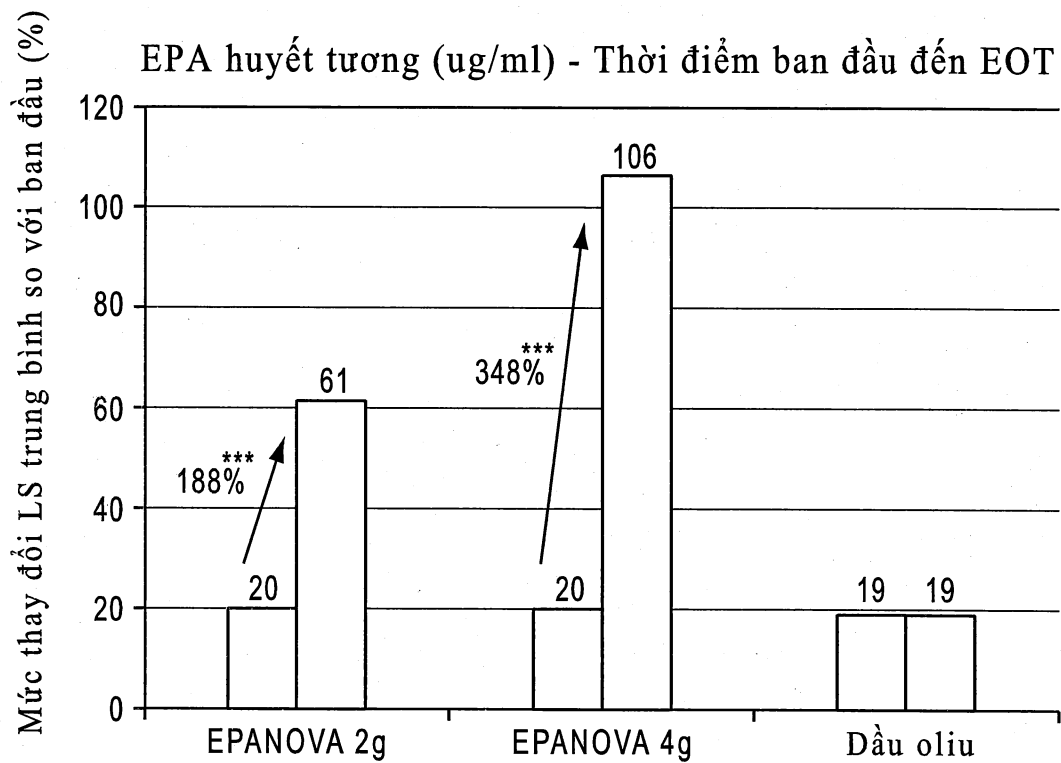


FIG. 42A

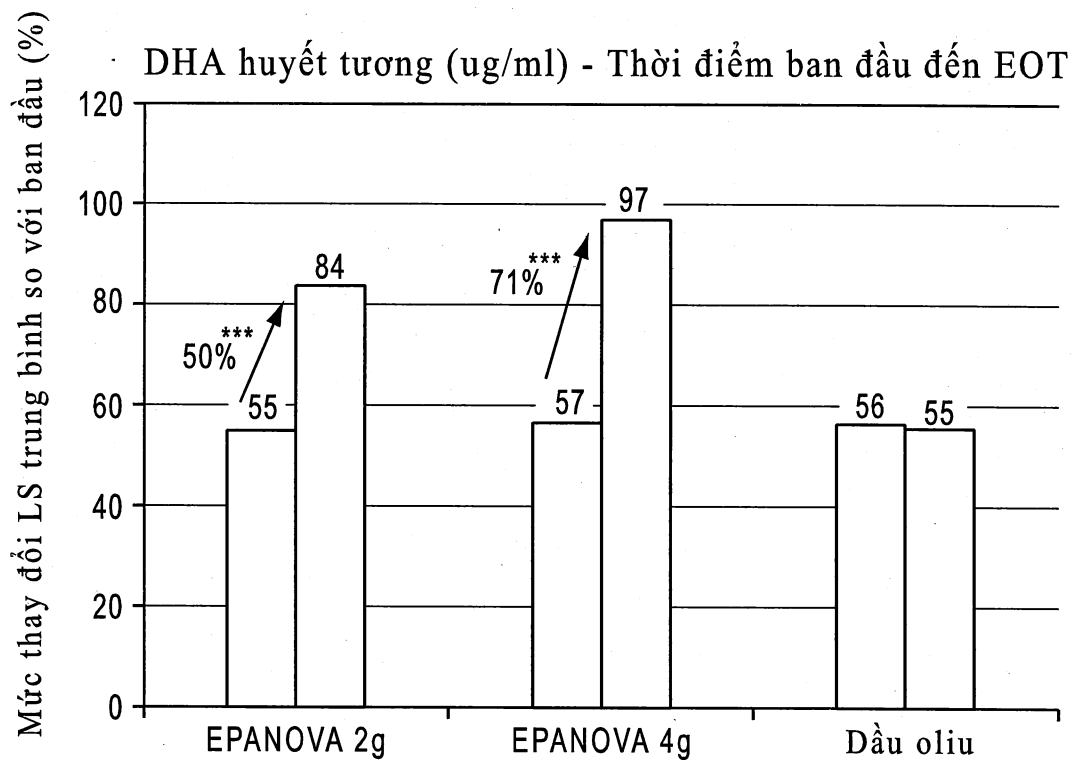


FIG. 42B

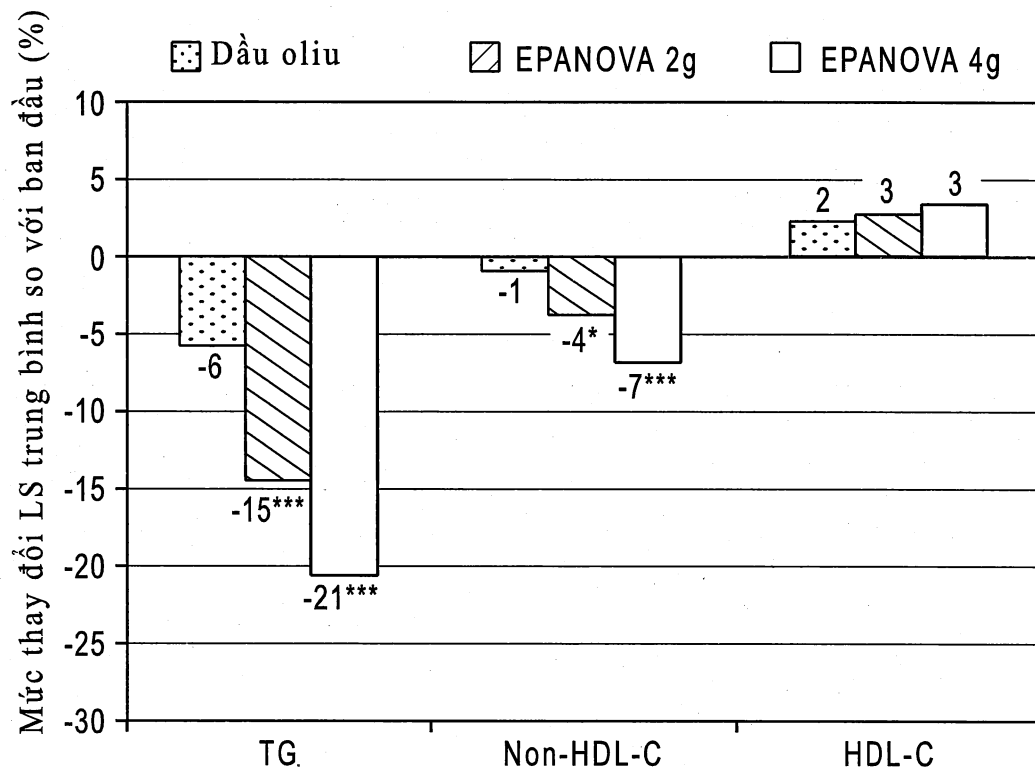


FIG. 43

54/66

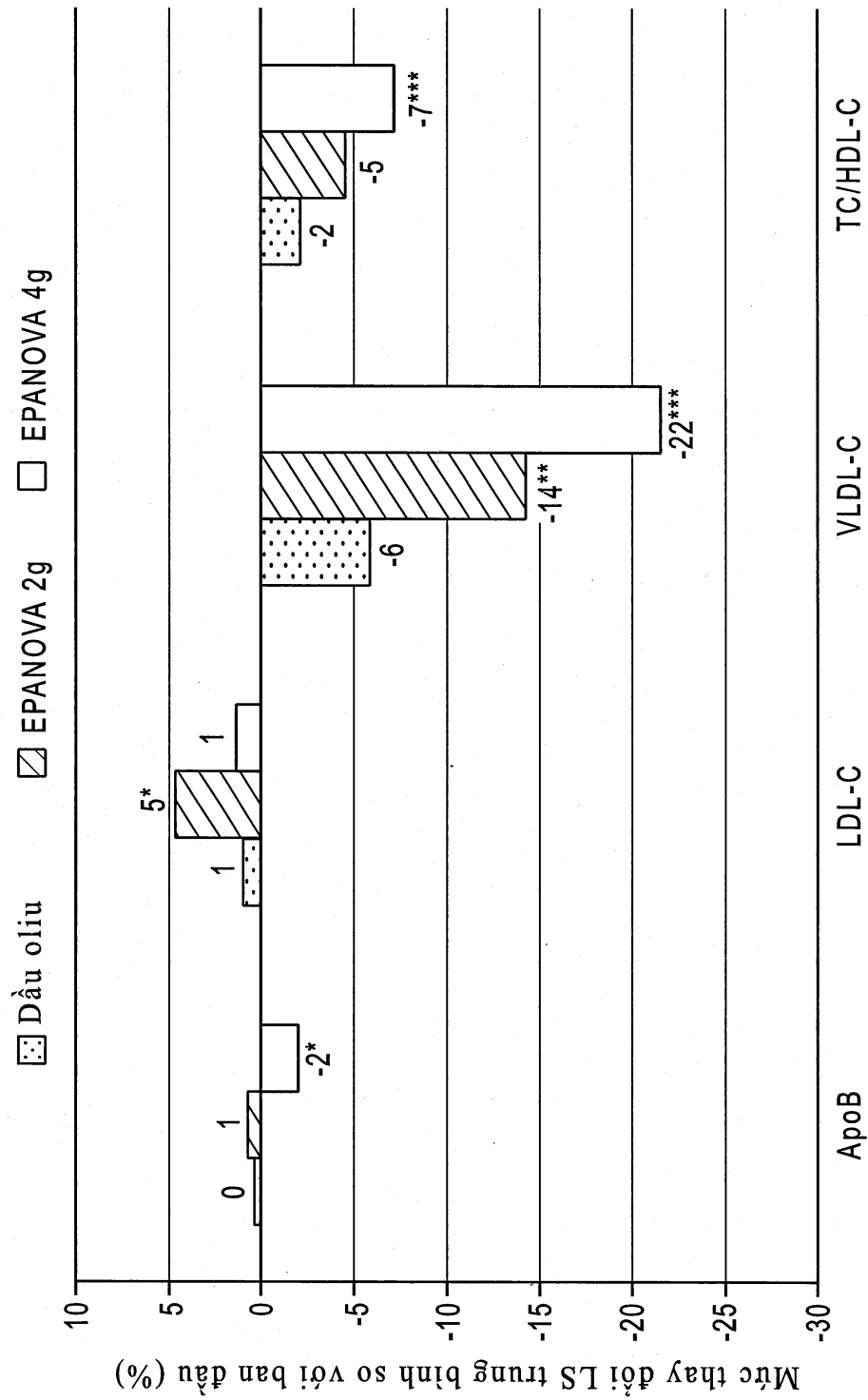


FIG. 44

55/66

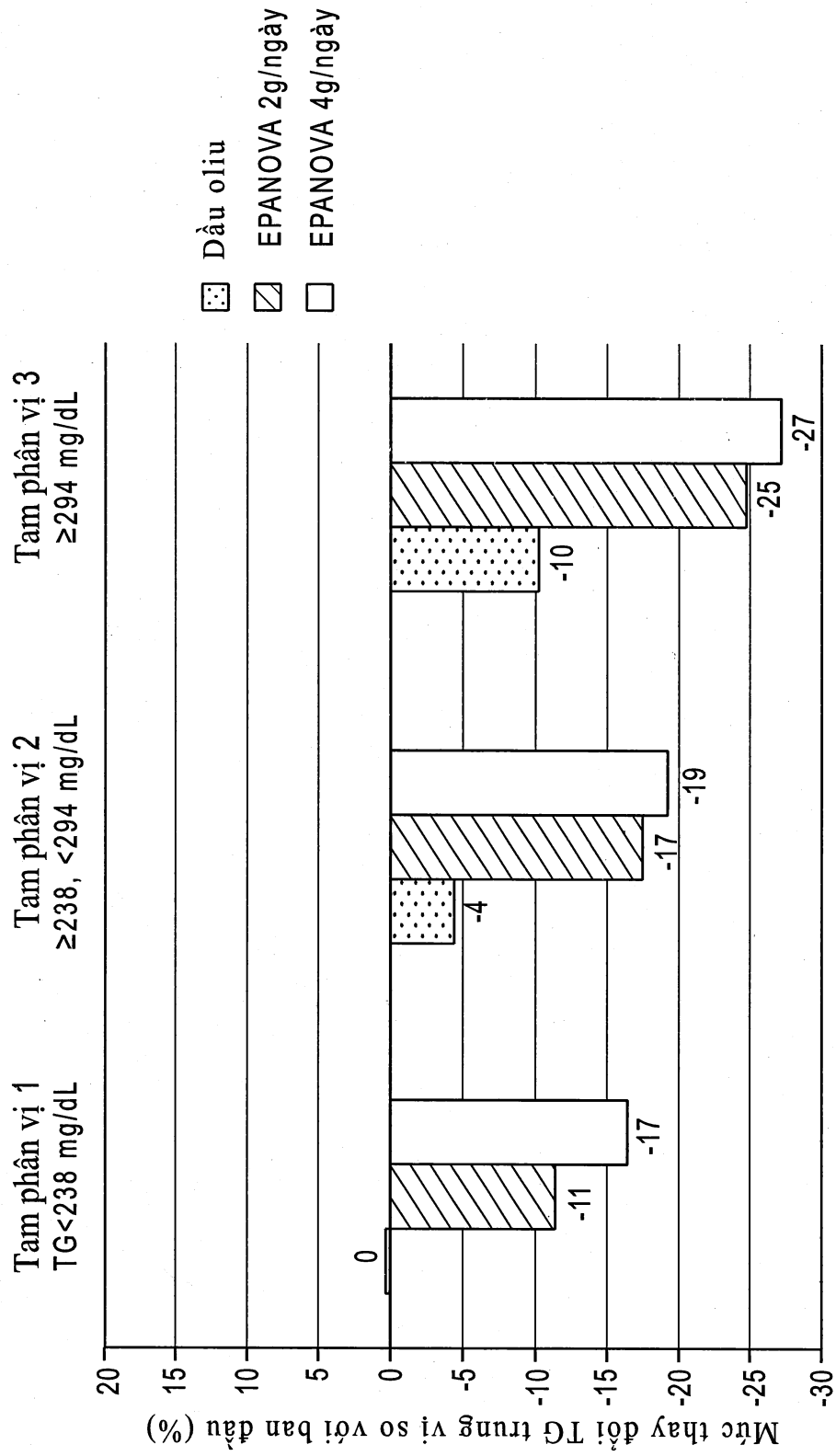


FIG. 45

56/66

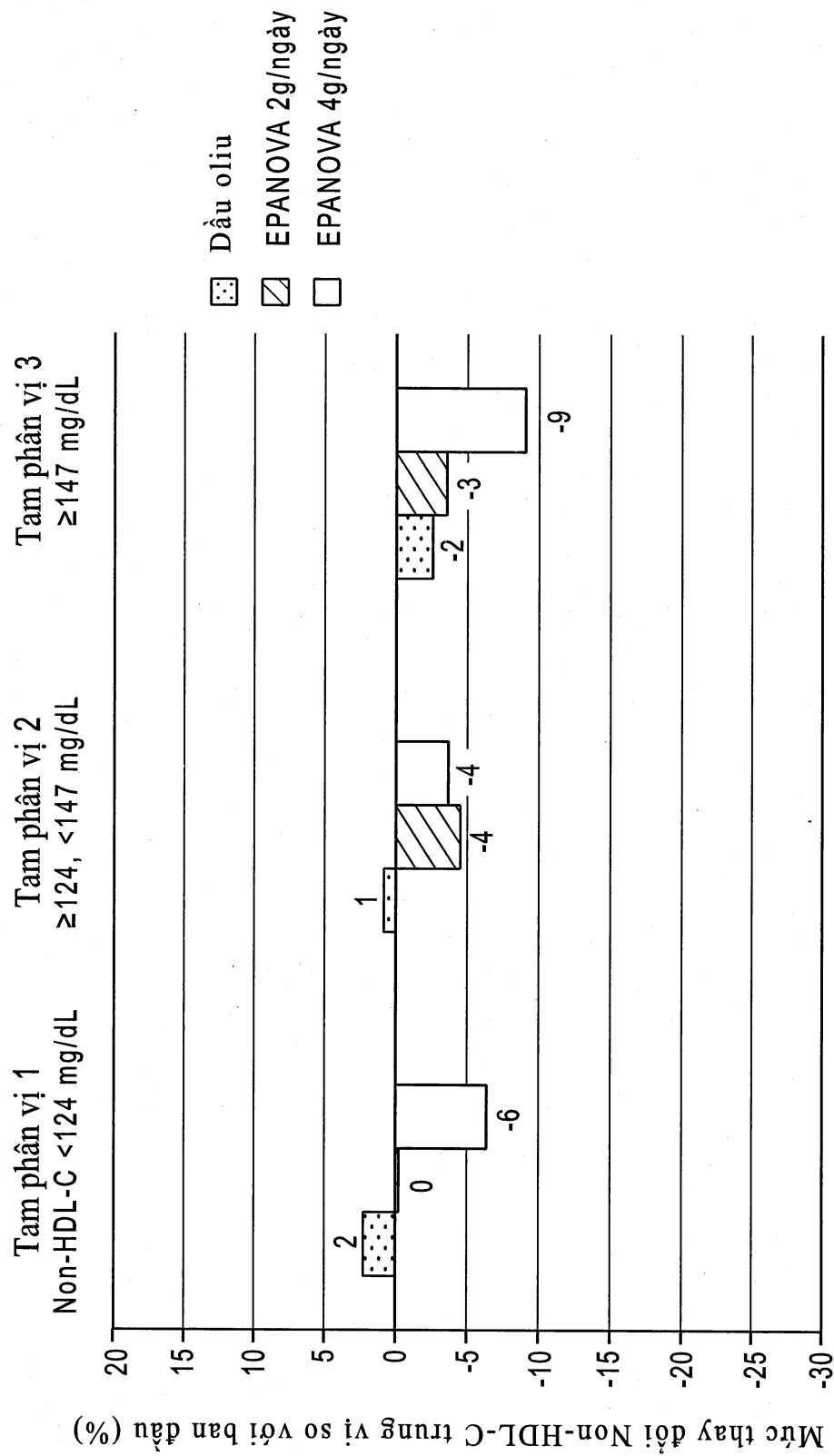


FIG. 46

57/66

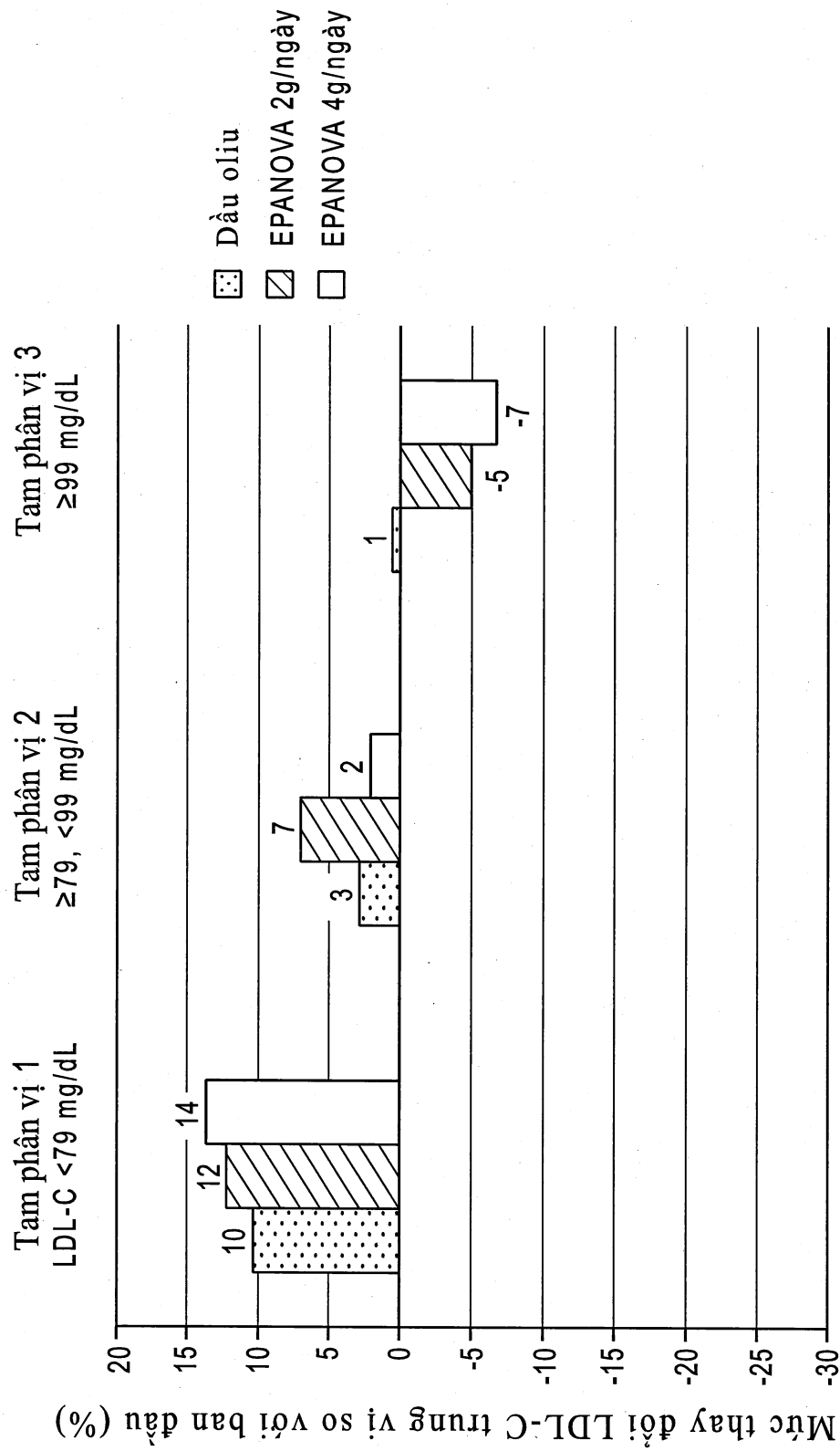


FIG. 47

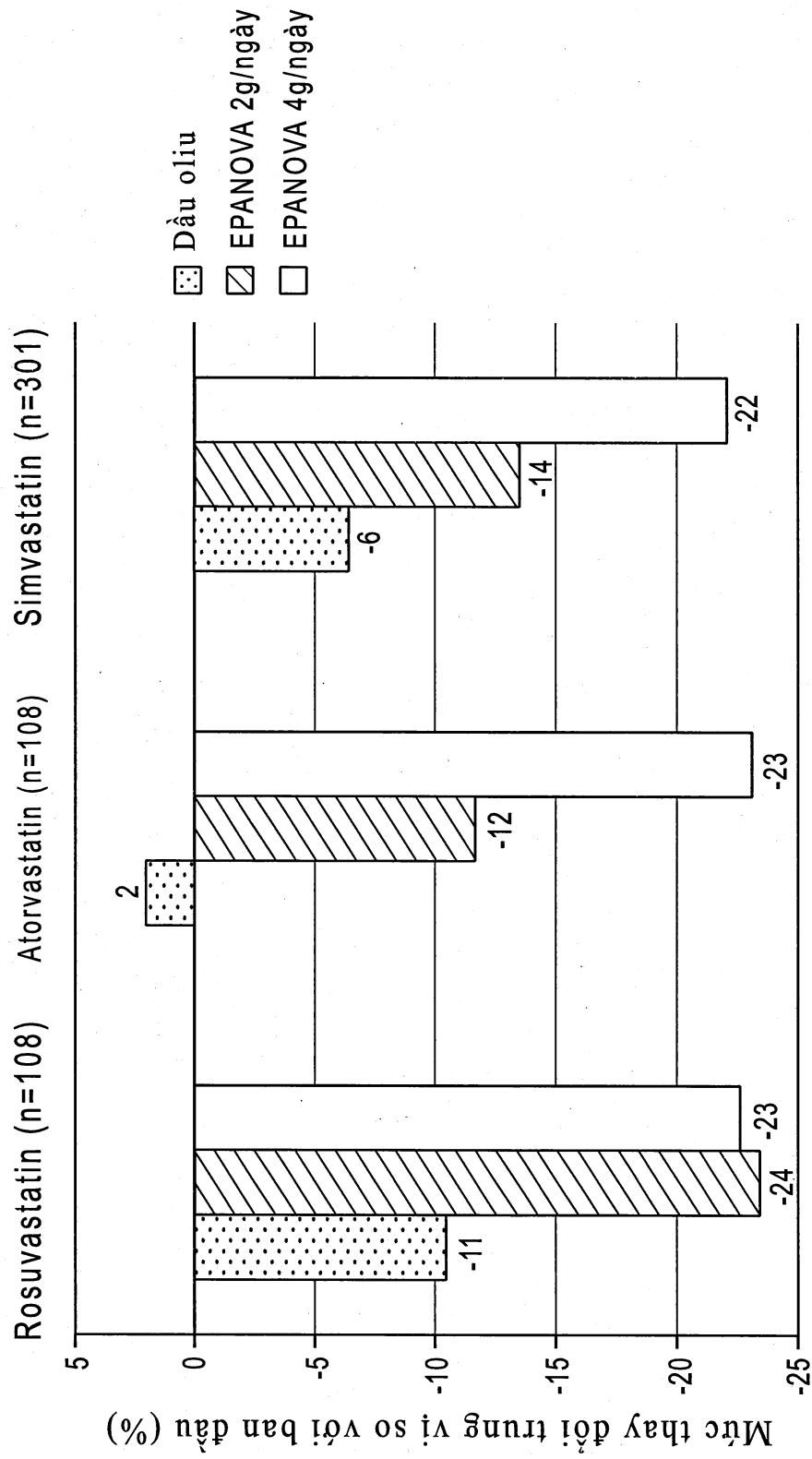


FIG. 48

19630

59/66

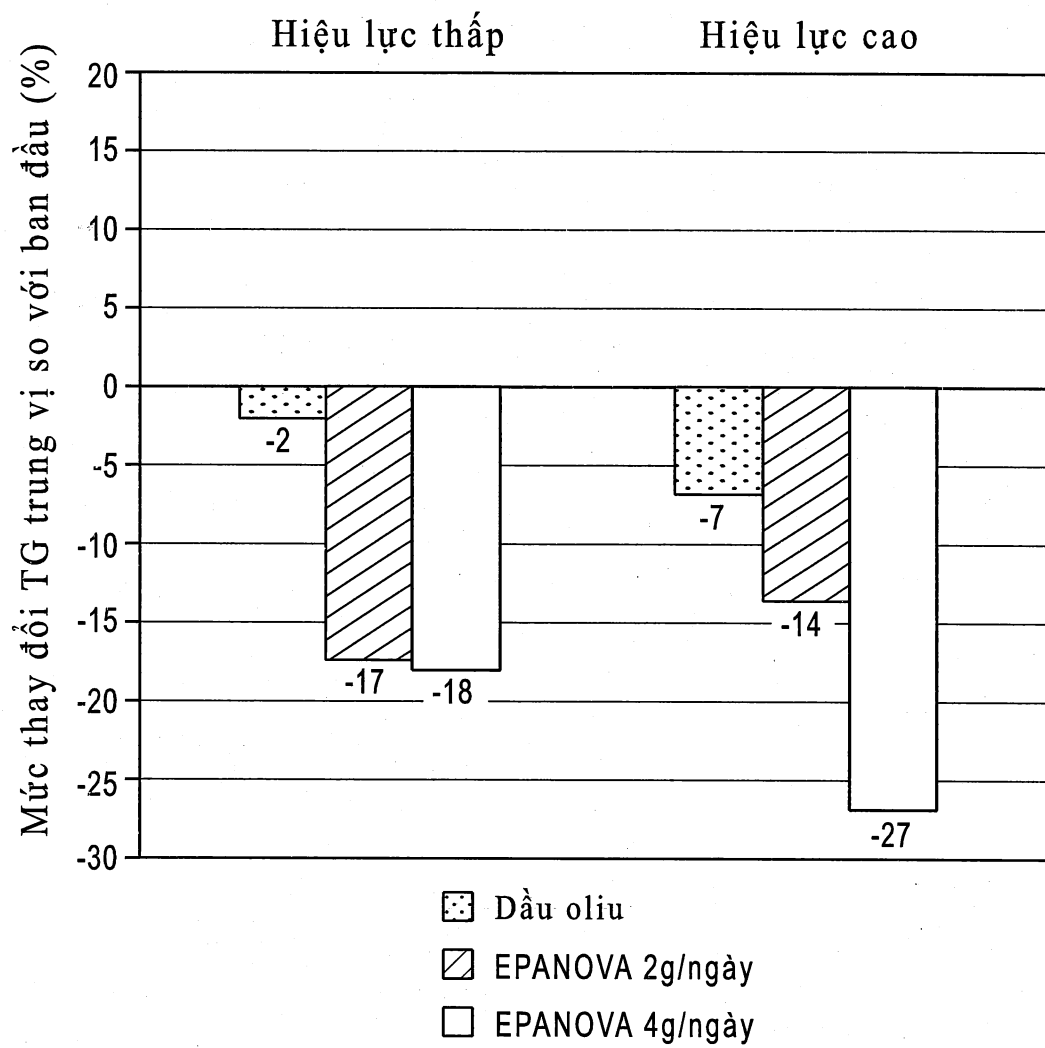


FIG. 49

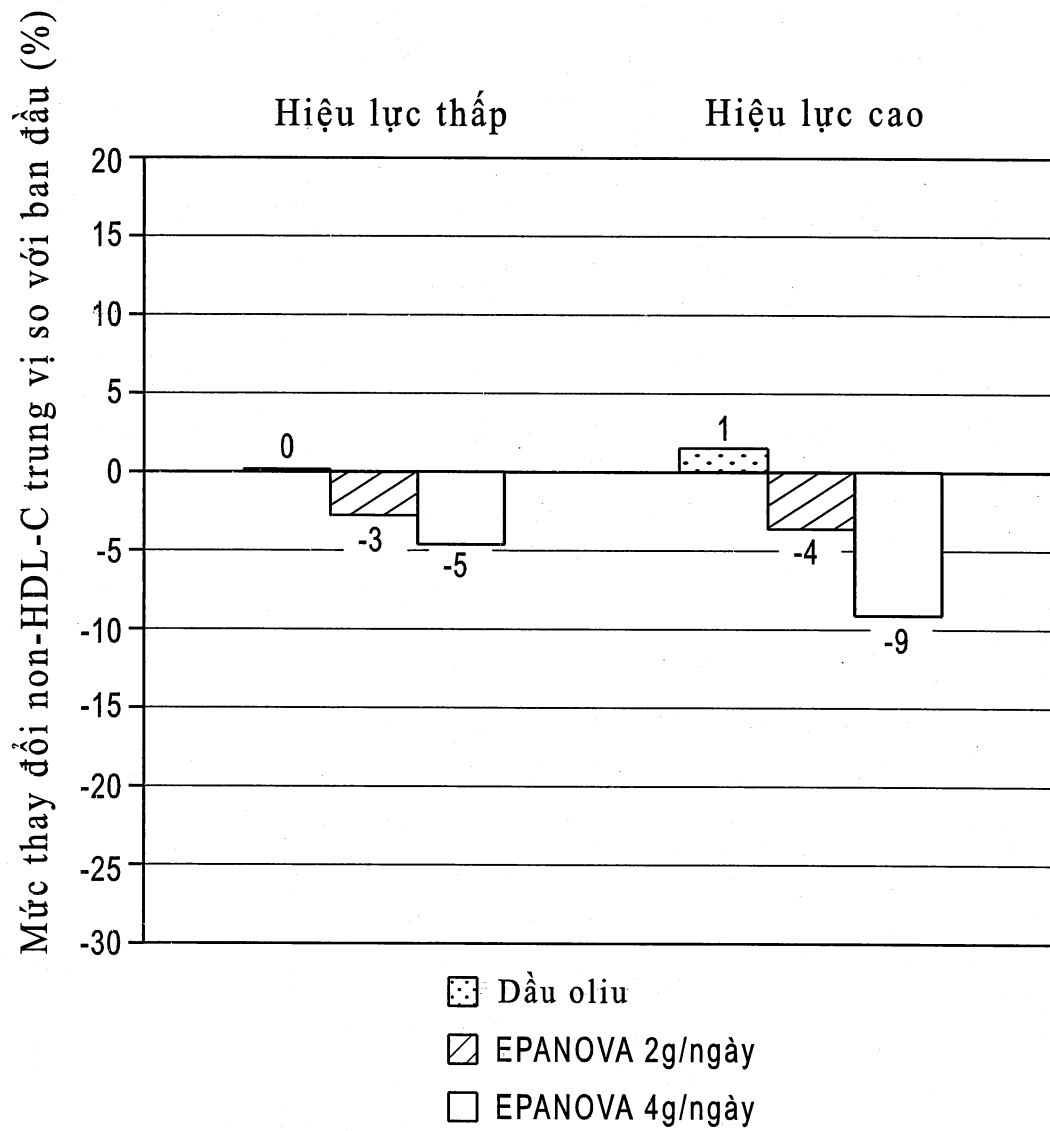


FIG. 50

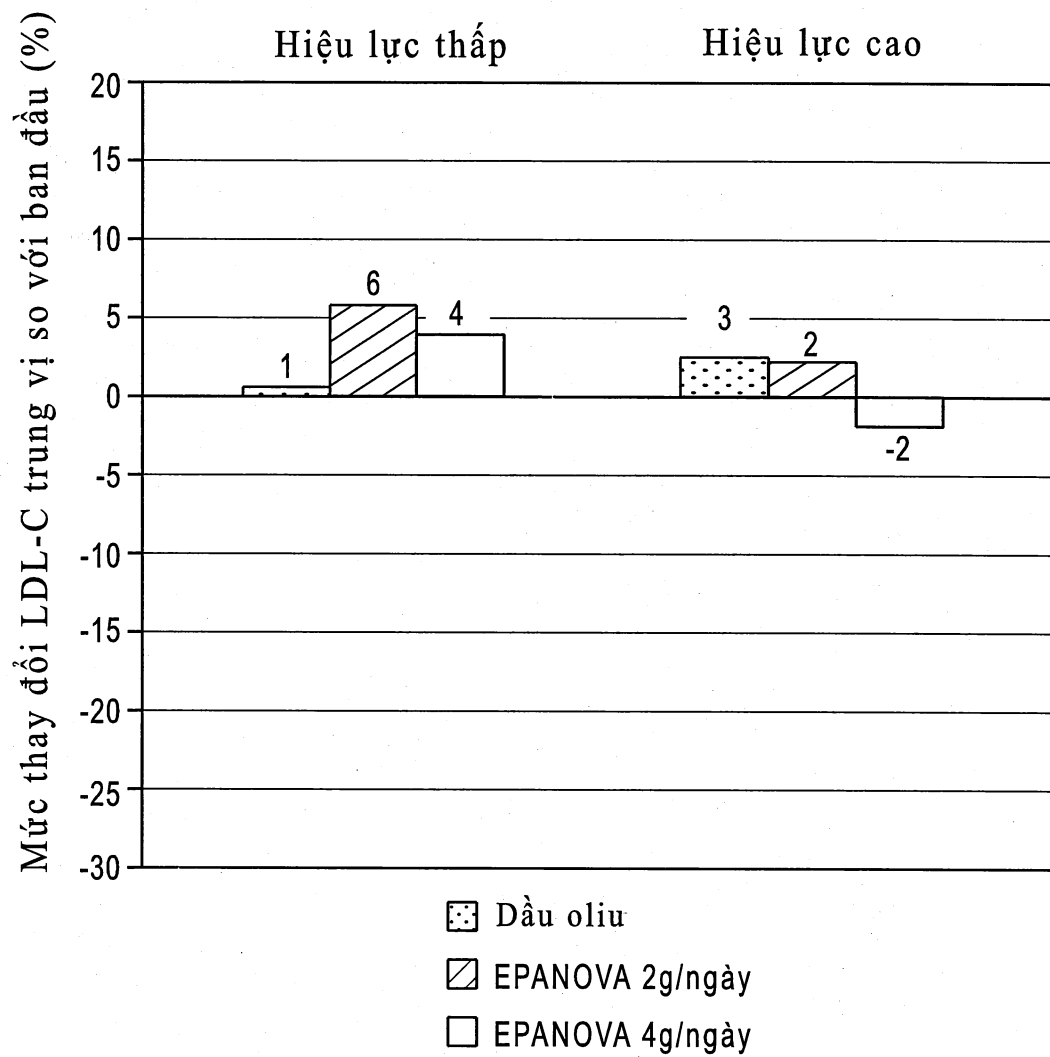


FIG. 51

62/66

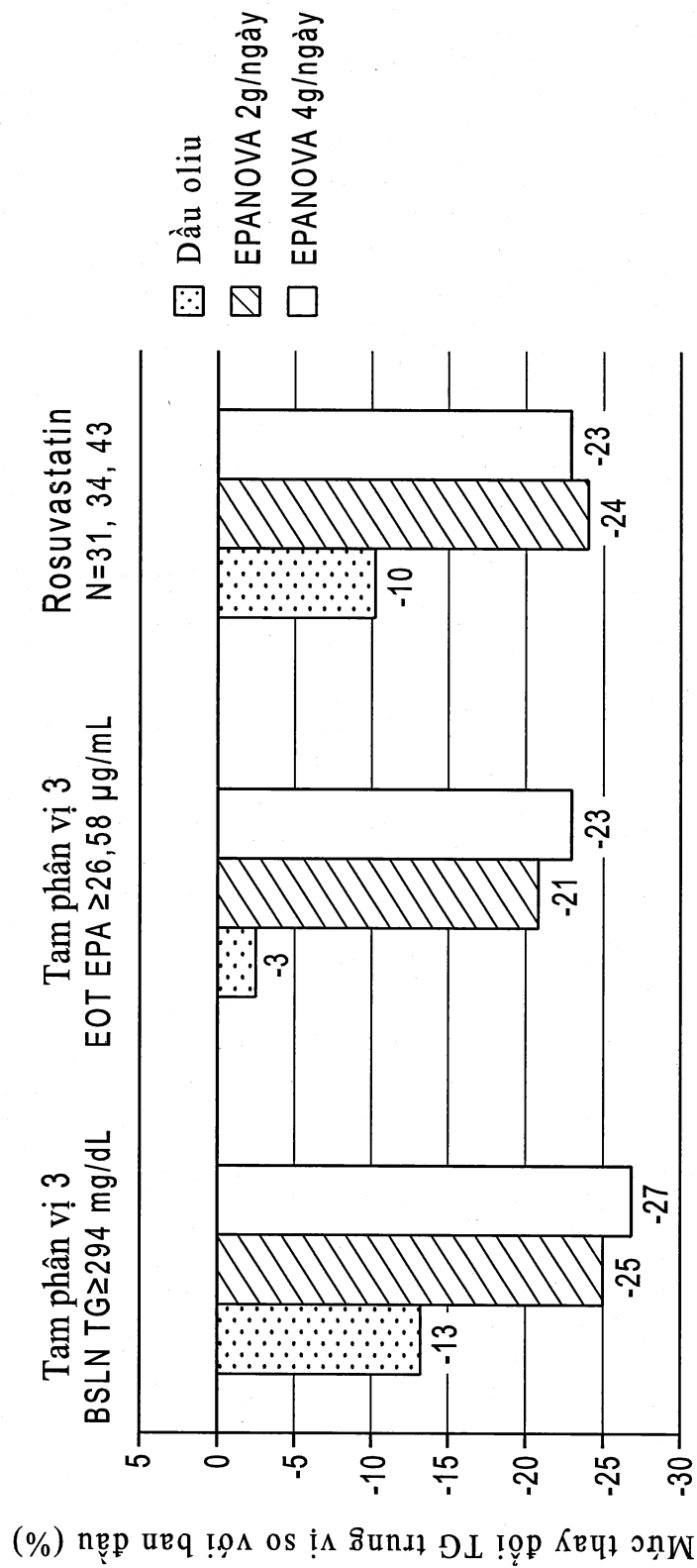


FIG. 52

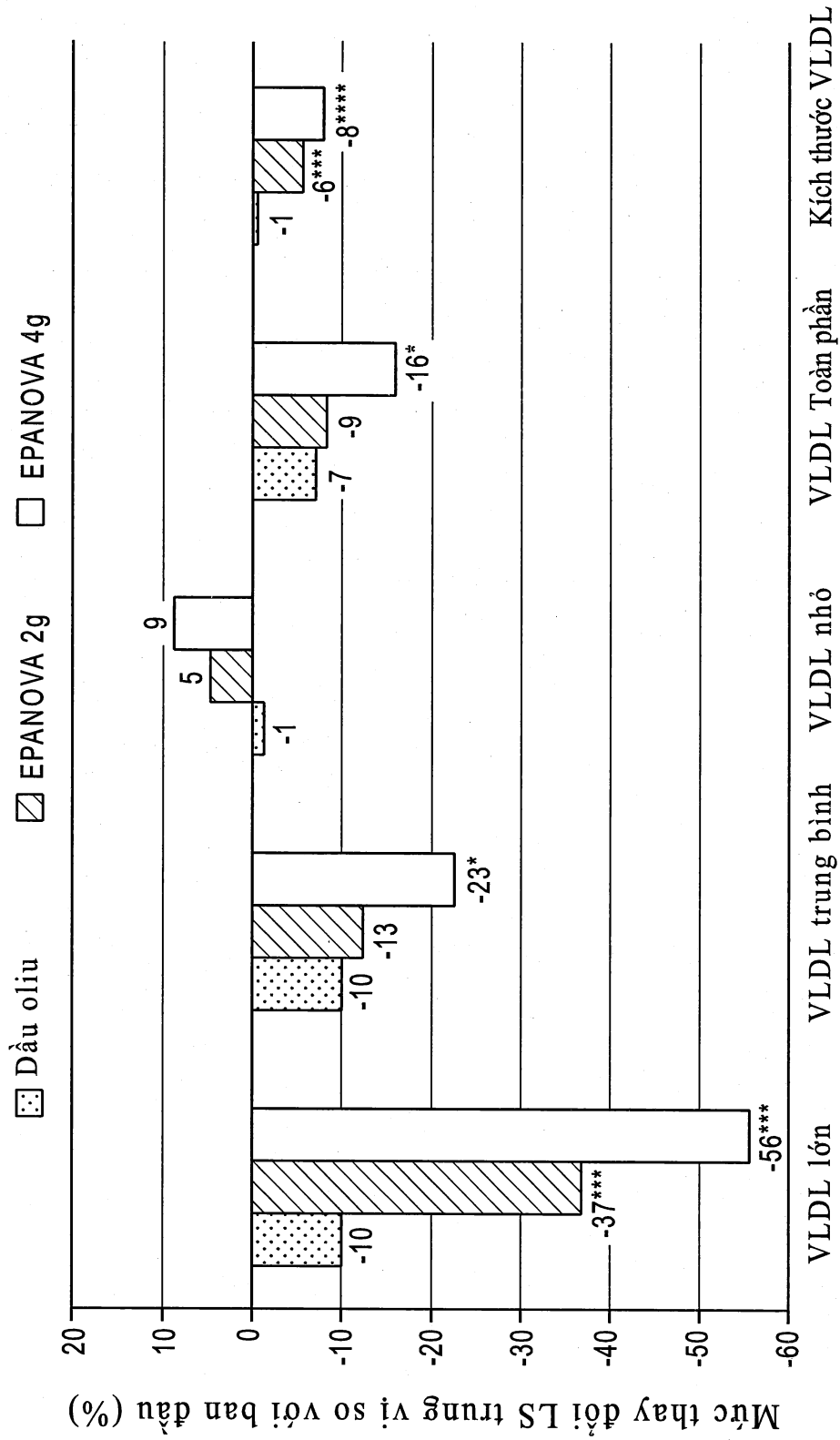


FIG. 53

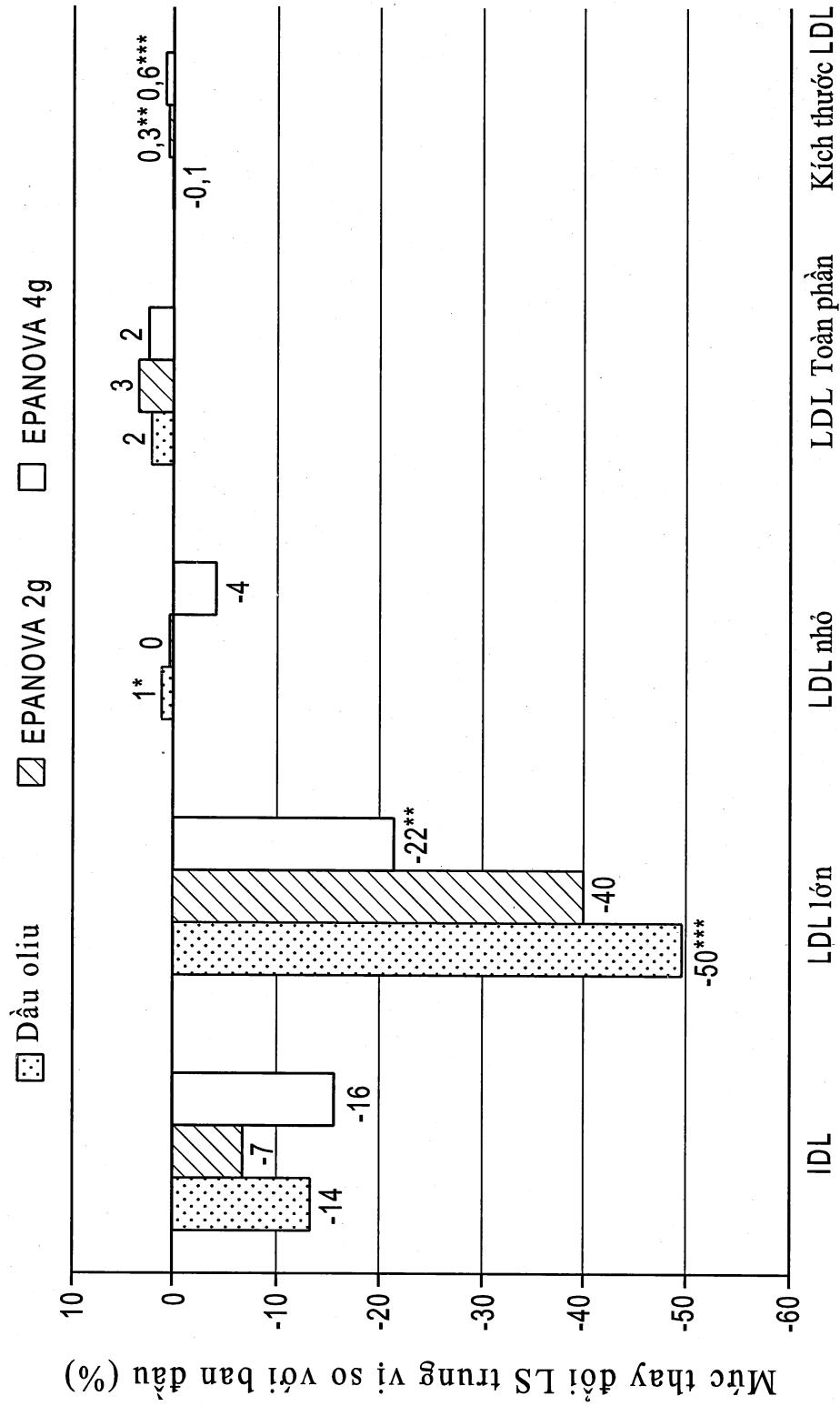


FIG. 54

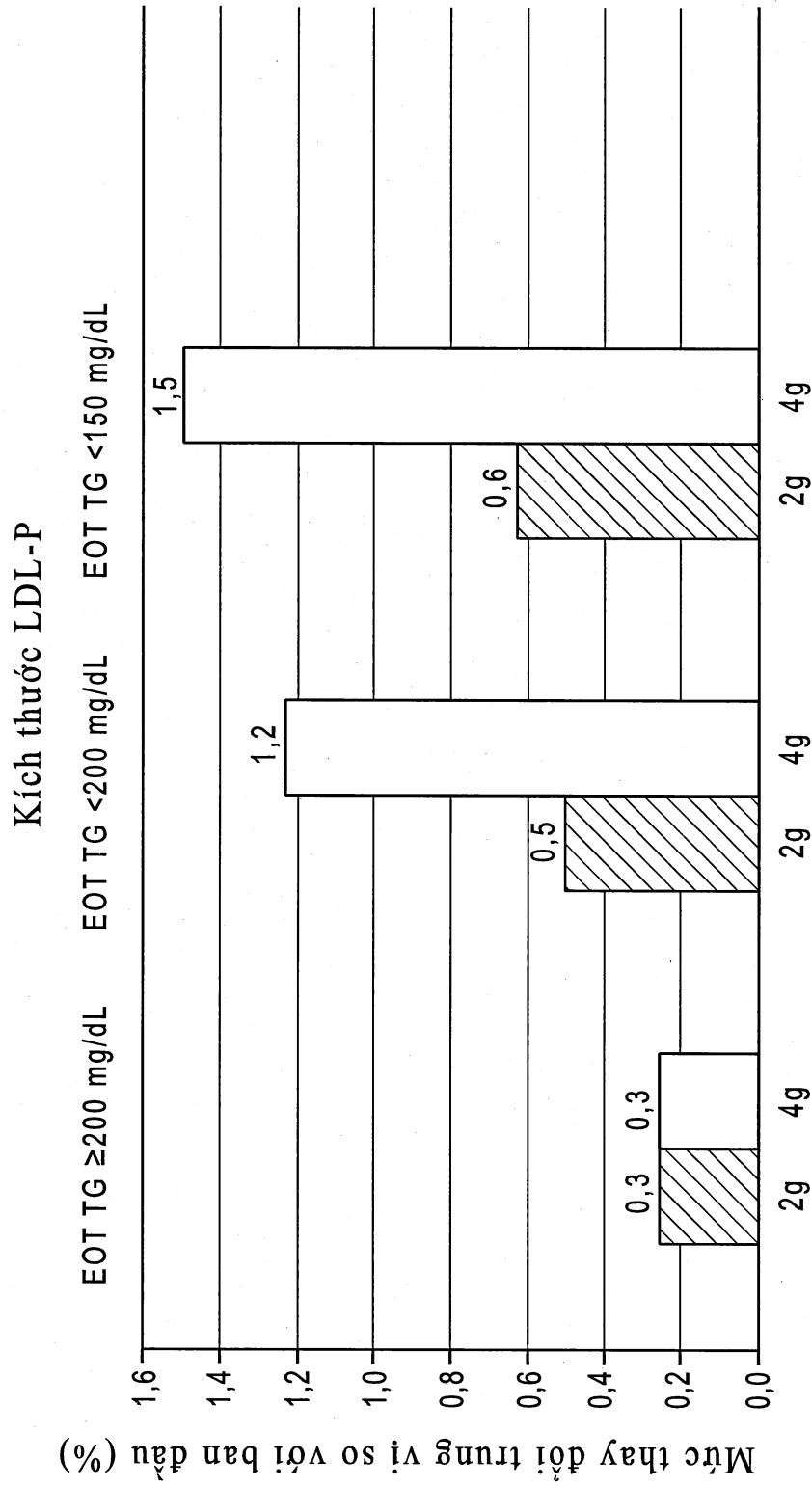
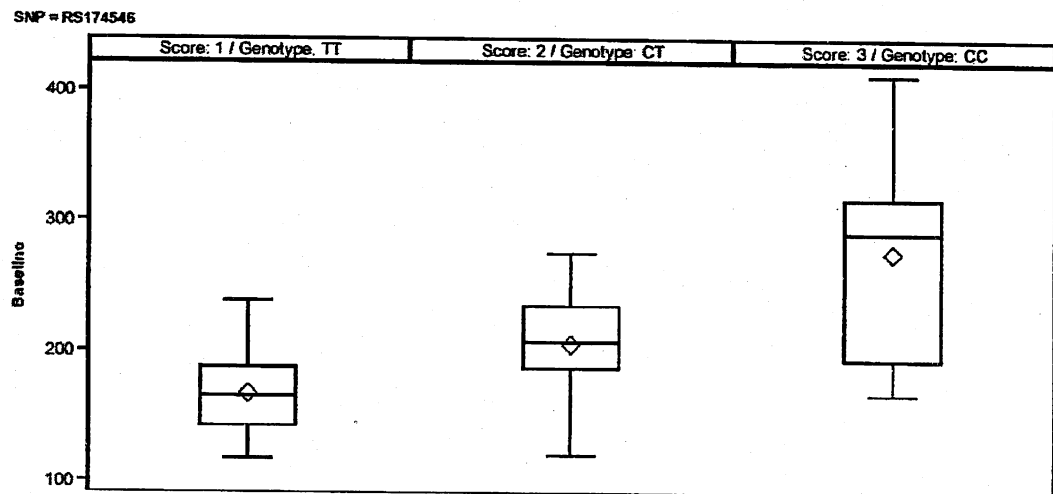


FIG. 55

A



B

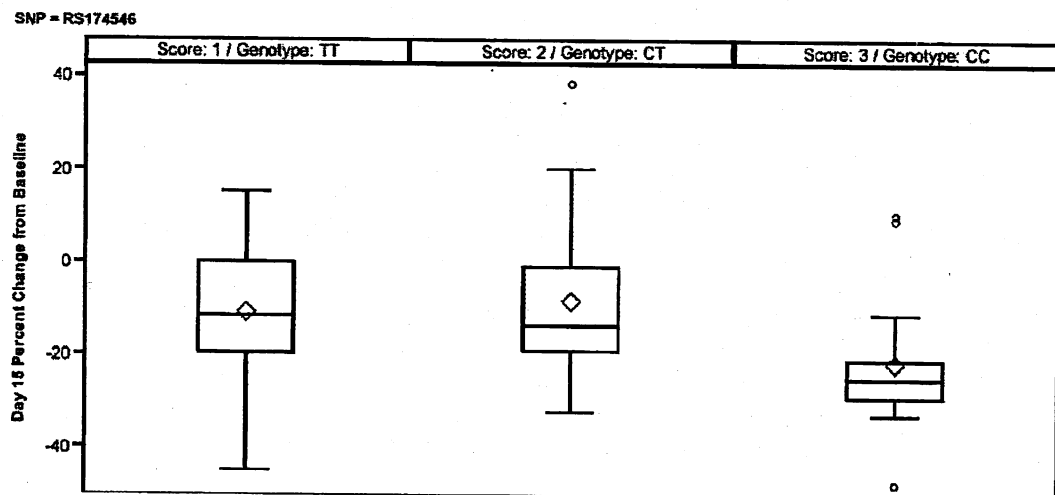


FIG. 56