



(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)



1-0028338

(51)⁷ A61K 31/353; C08B 37/08; C08G
65/331; A61K 47/48

(13) B

(21) 1-2016-04838

(22) 08/05/2015

(86) PCT/SG2015/050104 08/05/2015

(87) WO 2015/171079 A1 12/11/2015

(30) 10201402244S 09/05/2014 SG

(45) 25/05/2021 398

(43) 26/02/2018 359A

(73) AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH (SG)

1 Fusionopolis Way, #20-10 Connexis, 138632 Singapore, Singapore

(72) MOTOICHI, Kurisawa (SG); NUNNARPAS, Yongvongsoontorn (SG); YING, Jackie Y. (SG); CHUNG, Joo Eun (SG); BAE, Ki Hyun (SG); TAN, Min-han (SG); LEE, Esther (SG).

(74) Công ty Luật TNHH LEADCONSULT (LEADCONSULT)

(54) PHỨC HỢP NANO MIXEN VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO THÀNH PHỨC HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phức hợp nano mixen và phương pháp tạo thành phức hợp này. Phức hợp nano mixen chứa mixen và dược chất được bọc trong mixen này, trong đó mixen này chứa chất liên hợp polyme-flavonoit có polyme liên kết với vòng B của flavonoit. Phức hợp nano mixen hữu ích làm hệ thống phân phối thuốc.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này đề cập đến phức hợp nano mixen dùng trong việc phân phối thuốc và phương pháp tạo thành phức hợp này. Sáng chế này còn đề cập đến chất liên hợp polyme-flavonoit chứa polyme liên kết với vòng B của flavonoit và phương pháp tạo thành chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hóa trị là một trong những phương pháp chữa bệnh ung thư phổ biến nhất, phương pháp này sử dụng thuốc hóa học gây độc tế bào đưa vào cơ thể thông qua đường uống và đường tiêm. Thách thức lớn trong các loại thuốc uống chống ung thư thông thường đó là sự phân bố không đồng đều lượng thuốc trong cơ thể, dẫn đến ngộ độc và các tác dụng phụ nghiêm trọng. Ngoài ra, hiệu quả điều trị của các loại thuốc uống bị giới hạn bởi khả năng sinh học thấp vì các loại thuốc này phải đi qua đường tiêu hóa. Trong vài thập kỷ qua, các nhà nghiên cứu đã tập trung vào việc phát triển cơ chế phân phối thuốc để khắc phục những hạn chế của loại thuốc uống thông thường bằng cách cải thiện tính được động học và sự phân bố sinh học của thuốc.

Trong những năm gần đây, chất catechin trong trà xanh đã được nghiên cứu rộng rãi vì lợi ích sức khỏe con người, chất này có thể phòng ngừa các bệnh tim mạch và ung thư. Trong các loại catechin trà xanh thì chất epigallalocatechin-3-galat (EGCG) chiếm nhiều nhất và đây cũng là chất đóng vai trò chính trong các lợi ích của trà xanh. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh, EGCG là chất chống oxy hóa, đái tháo đường, kháng khuẩn, chống viêm và giảm cholesteol. Hơn nữa, chất này đã được chứng minh có hiệu quả trong việc ức chế sự hình thành các gốc tự do trong cơ thể, ngăn cản hình thành các khối u hay tế bào bất thường.

Mặc dù có những khả năng như mong đợi, các ứng dụng lâm sàng của EGCG bị hạn chế do kết cấu không bền vững và tính khả dụng sinh học của đường uống thấp. Ví dụ, EGCG sẽ không bền vững và dễ bị phân hủy trong môi trường sinh lý học. Nghiên cứu cho rằng EGCG có chu kỳ bán rã ngắn dưới 30 phút trong 0.05M dung dịch muối đệm phosphat (PBS) (pH7.4) tại nhiệt độ 37°C. Ngoài ra, EGCG đi vào bằng đường miệng phải trải qua quá trình thủy phân trong dịch dạ dày, làm suy thoái sự trao đổi chất trong đường tiêu hóa. Kết quả là, nồng độ EGCG trong huyết tương không đủ để đạt được hiệu quả điều trị như mong muốn khi sử dụng bằng đường uống. Tài liệu WO201112156 đã bộc lộ hợp chất của chất phân phối chứa một gốc hóa học và ít nhất một flavonoit. Flavonoit tồn tại ở dạng monome hoặc dime trước khi liên kết và vẫn ở dạng monome hoặc dime sau khi liên kết. Tốt nhất là, hợp chất bao gồm hai flavonoit. Chất phân phối được gắn ở vị trí C6 và/ hoặc C8

của vòng A của flavonoid. Một phương tiện phân phối chất chống ung thư bao gồm chất chống ung thư và hợp chất cũng được cung cấp.

Do vậy, phát sinh nhu cầu cung cấp một hệ thống phân phối thuốc có thể cải thiện được tình trạng của những nhược điểm nêu trên. Ngoài ra cần phải đưa ra phương pháp hình thành hệ thống phân phối thuốc đó.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, để đáp ứng các nhu cầu trên, theo khía cạnh đầu tiên, sáng chế đề cập đến phức hợp nano mixen chứa mixen và dược chất bọc trong mixen này. Mixen này chứa chất liên hợp polyme-flavonoid, trong đó polyme được liên kết với vòng B của flavonoid.

Phức hợp nano mixen được sử dụng như một hệ thống phân phối thuốc. Phức hợp nano mixen có kích thước nhỏ nhưng khả năng tải thuốc cao, rất thuận lợi trong việc phân phối thuốc đến các khối u mục tiêu. Một lợi ích khác đó là sự giải phóng liên tục các chất có thể thực hiện bằng cách sử dụng phức hợp này trong điều kiện sinh lý học. Thuận lợi hơn, phức hợp nano mixen có thể là một phương tiện phân phối đầy hứa hẹn cho một loạt các chất chống ung thư không tan trong nước. Hơn nữa, phức hợp nano mixen có thể ức chế sự phát triển của khối u một cách đáng kể cùng với việc giảm độc tính của các chất đi vào bằng đường uống. Thêm vào đó, phức hợp nano mixen có thể được coi là một hệ thống phân phối thuốc độc đáo và hiệu quả với các yếu tố điều trị kết hợp từ cơ chế phân phối thuốc hay chất mang mixen và các dược chất.

Dược chất có thể là doxorubicin (một loại kháng sinh anthacycline trị ung thư). Phức hợp nano mixen bọc doxorubicin duy trì sự giải phóng thuốc. Nguyên nhân giải phóng thuốc liên tục là do sự tương tác mạnh mẽ giữa EGCG và doxorubicin trong phức hợp nano mixen. Thêm vào đó, trong một số phương pháp, chỉ có một trường hợp vỡ biên được kiểm soát ngay tại giai đoạn đầu, cho thấy rằng các phân tử doxorubicin đã được bọc ổn định trong phức hợp nano mixen. Với độ rò rỉ thuốc thấp như vậy là thực sự cần thiết để đảm bảo hiệu quả điều trị tối đa với ít tác dụng phụ nhất, khi các phân tử thuốc được bọc trong phức hợp nano mixen sẽ không bị rò rỉ sớm trong quá trình lưu thông trong máu. Thậm chí, phức hợp nano mixen còn được áp dụng trong việc sử dụng thuốc doxorubicin bằng đường uống trong quá trình điều trị ung thư.

Dược chất có thể là sunitinib (SU) và flavonoid có thể là epigallocatechin-3-galate (EGCG). Các phức hợp nano mixen có thể duy trì sự giải phóng thuốc liên tục của SU. Thêm vào đó, trong một số phương pháp, hầu như không phát hiện bất kỳ sự vỡ biên nào, cho thấy các phân tử SU đã được bọc ổn định trong phức hợp nano mixen.

Trong một phương pháp, flavonoit có thể là một flavonoit monome. Trong phương pháp khác, flavonoit có thể là dạng dime. Phức hợp nano mixen chứa flavonoit monome có thể dẫn nhanh và nhiều sự giải phóng SU hơn so với nano mixen chứa flavonoit dime. Để có hiệu quả thì cần có sự tương tác mạnh mẽ hơn giữa SU và flavonoit dime.

Phức hợp nano mixen có thể làm giảm các tác dụng phụ của thuốc như thuốc SU bằng cách bọc ổn định các chất bên trong chúng và phân phối đến các khu vực mục tiêu. Do đó, phức hợp nano mixen sẽ cung cấp các yếu tố điều phối có lợi giữa SU và EGCG.

Các phức hợp nano mixen chứa SU được tăng cường các yếu tố tác dụng lên khối u trong cơ thể khi so sánh với không sử dụng SU. Phức hợp nano mixen chứa SU ít có tác dụng phụ đối với cơ thể khi so sánh với không sử dụng SU. Liều lượng ít phức hợp nano mixen chứa SU được yêu cầu so sánh với không sử dụng SU để đạt hiệu quả tương tự. Nhân tố ức chế của phức hợp nano mixen chứa SU được duy trì trong một khoảng thời gian đáng kể, ngay cả khi dừng việc điều trị.

Các phức hợp nano mixen chứa SU dẫn đến việc giảm nồng độ trong huyết tương so với khi không sử dụng SU, dẫn đến ít ảnh hưởng bất lợi của SU. Mức giảm này trong nồng độ huyết tương là do sự tương tác giữa các flavonoit và SU, cũng như tăng cường độ thẩm thấu và lưu giữ (EPR) cung cấp bởi các hạt nano mixen.

Theo khía cạnh thứ hai sẽ cung cấp một phương pháp để tạo thành một phức hợp nano mixen gồm một mixen và một chất được bọc trong mixen này, phương pháp này có các bước như sau: (a) thêm chất nêu trên vào một dung môi thích hợp với chất liên hợp polyme-flavonoit, trong đó polyme được liên kết với vòng B của flavonoit; (b) cho phép một mixen tự lắp ráp gồm polyme-flavonoit nêu trên và bọc các chất trong mixen để tạo thành phức hợp nano mixen.

Phức hợp nano tự lắp ráp trong chất liên hợp polyme-flavonoit và các dược chất. Sự tạo thành của phức hợp nano đã đạt được bằng cách sử dụng thuộc tính liên kết giữa các flavonoit với các dược chất.

Theo khía cạnh thứ ba, cung cấp một chất liên hợp polyme-flavonoit có polyme liên kết với vòng B của flavonoit.

Flavonoit được kết hợp với polyme. Trong phương pháp này, polyme có thể là polyetylen glycol (PEG). Các hạt nano polyme tránh độ thanh thải của thận và độ chèn ép bởi hệ võng nội mô (RES), cho phép tích tụ liên tục trong khối u bằng hiệu ứng EPR. PEG ổn định trong mixen đưa ra một plasma với nửa chu kỳ được kéo dài hơn so với các mixen nguyên bản bởi các chuỗi bề mặt PEG ngăn chặn sự nhận dạng và giải phóng bởi hệ võng

nội mô (RES) trong cơ thể. Hơn nữa, PEG có thể được sử dụng để thay đổi bề mặt của mixen polyme và các hạt nano để tạo ra các bề mặt chống bám bẩn.

Theo khía cạnh thứ tư, trong đó cung cấp một phương pháp tạo thành chất liên hợp polyme-flavonoit như đã làm rõ ở trên bao gồm các bước liên kết flavonoit với polyme thông qua phản ứng cộng ái nhân trong các điều kiện cơ bản, trong đó polyme này có nhóm ái nhân tự do.

Các chất liên hợp polyme-flavonoit được tổng hợp qua phản ứng cộng ái nhân với độ pH cơ bản. Quá trình liên kết được thực hiện bằng phản ứng cộng ái nhân của một nhóm ái nhân giống như nhóm thiol, của polyme như PEG ở vị trí C2' trên vòng B của flavonoit trong điều kiện pH được kiểm soát.

Trong một phương pháp, polyme là polyetylen glycol (PEG) và nhóm ái nhân tự do là thiol. Ortho-quinone khuyết electron của flavonoit giống như EGCG có thể phản ứng với nhóm ái nhân như với các nhóm thiol. Các nhóm thiol xuất hiện trong nhiều loại của các phân tử sinh học gồm cystein, glutathione, và các protein. EGCG có thể liên kết cộng hóa trị với cystein kết tủa trong các protein trên màng tế bào hồng cầu của con người và glyceraldehyde-3-phosphat dehydrogenase (GAPDH). Ngoài ra, các sản phẩm của liên kết cộng hóa trị của EGCG hình thành khi bị oxy hóa trong cystein và glutathione. Hơn nữa, kết quả các hợp chất cystein của EGCG có thể biểu hiện các hoạt động của chất oxy hóa cao hơn EGCG, trong khi duy trì sự ức chế tăng trưởng của chúng và các hoạt động chống viêm. Thêm vào đó, N-acetyl cystein-conjugated EGCG có thể tăng cường sự ức chế tăng trưởng và các yếu tố gây chết rụng tế bào của EGCG chống lại các tế bào ung thư phổi ở chuột và con người.

Theo khía cạnh thứ năm, trong đó cung cấp cách sử dụng phức hợp nano mixen bao gồm một mixen và dược chất được bọc trong mixen này như một phương tiện phân phối thuốc, trong đó mixen gồm chất liên hợp polyme-flavonoit, polyme này được liên kết với vòng B của flavonoit.

Có phức hợp nano mixen sẽ có tác dụng chống ung thư cao hơn so với việc chỉ có các dược chất tự do hoạt động. Phức hợp nano mixen làm giảm thiểu các tác dụng phụ của thuốc như thuốc Suhitinib (SU) bằng cách bọc kỹ dược chất lại và phân phối chúng tới khu vực mục tiêu. Hệ thống phân phối này còn cung cấp các hiệu ứng điều phối có lợi.

Theo khía cạnh thứ sáu, trong đó cung cấp phức hợp nano mixen như đã đề cập ở trên cho việc điều trị khối u.

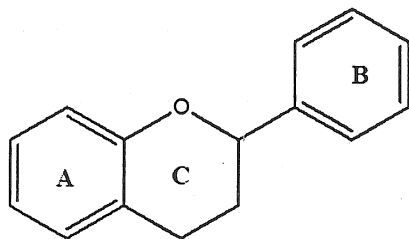
Theo khía cạnh thứ bảy, trong đó sáng chế mô tả việc sử dụng phức hợp nano mixen như đã đề cập ở trên cho việc sản xuất thuốc điều trị khối u.

Giải thích từ ngữ

Những từ và các thuật ngữ sau được sử dụng trong tài liệu này có nghĩa chỉ ra:

“Vòng B” của một flavonoid đề cập đến một phenyl được tùy chọn thay thế được gắn với một cấu trúc vòng kép (cấu trúc vòng kép được cấu tạo từ một vòng benzene (A) sát lại với vòng 6 phân tử (C)). Phenyl tùy chọn thay thế được gắn với 2 vị trí trên vòng C. Để làm rõ vấn đề này, các vòng được ký hiệu như sau:

[Công thức. 1]



Thuật ngữ “epigallocatechin galat” đề cập đến một este của epigallocatechin và gallic axit có thể được sử dụng thay thế cho “epigallocatechin-3-galat” hoặc EGCG.

Cụm từ “các chất liên hợp PEG-EGCG” đề cập đến cả chất liên hợp PEG-mEGCG (EGCG monome) và chất liên hợp PEG-dEGCG (EGCG dime), trừ khi có quy định khác.

Từ “đáng kể” không loại trừ “hoàn toàn” ví dụ một thành phần “tự do đáng kể” từ Y có thể hoàn toàn tự do từ Y. Trong trường hợp cần thiết, từ “đáng kể” có thể được bỏ qua trong mục giải thích từ ngữ trong sáng chế này.

Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ “chứa” và “bao gồm”, và các biến thể ngữ pháp của chúng, được dùng để đại diện cho từ “mở ra” hoặc “bao gồm” như vậy mà chúng gồm các yếu tố giải pháp thuật lại nhưng cũng cho phép bao gồm các thông tin bổ sung, các yếu tố không thuật lại.

Khi sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ “khoảng” trong ngữ cảnh về nồng độ các thành phần trong công thức, thường có nghĩa là +/- 5% giá trị ghi, +/- 4% giá trị ghi, +/- 3% giá trị ghi, +/- 2% giá trị ghi, thậm chí là +/- 1% giá trị ghi, hay hơn nữa là +/- 0.5% giá trị ghi.

Trong phần làm rõ các vấn đề này, các phương pháp được đề cập trong một phạm vi nhất định. Nên hiểu rằng các mô tả trong phạm vi này chỉ đơn thuần giúp thuận tiện và ngắn gọn hơn và không nên hiểu đây là giới hạn của phạm vi sáng chế đề cập đến. Theo đó, các

mô tả theo một phạm vi cần được hiểu là làm rõ một cách chi tiết tất cả những vấn đề nhỏ hơn cũng như từng giá trị số trong vấn đề đó. Ví dụ, mô tả trong phạm vi từ 1-6 nên được hiểu là làm rõ một cách chi tiết các vùng nhỏ hơn như từ 1 đến 3, từ 1 đến 4, từ 1 đến 5, từ 2 đến 4, từ 2 đến 6, từ 3 đến 6, v.v... cũng như từng số trong vùng đó như 1, 2, 3, 4, 5 và 6. Điều này được áp dụng mà không phụ thuộc vào giới hạn của phạm vi.

Các phương pháp được đề cập cũng được mô tả một cách chung và khái quát trong tài liệu này. Mỗi phạm trù được thu hẹp và phân nhóm trong một phạm vi chung cũng là một phần của vấn đề được làm rõ. Điều này gồm các mô tả chung của các phương pháp với một quy định hoặc giới hạn tiêu cực loại bỏ bất kỳ vấn đề nào từ cùng một loại, bất kể có hay không các tài liệu bị lược bỏ được thuật lại một cách chi tiết trong tài liệu này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các bản vẽ kèm minh họa làm rõ một phương pháp và cung cấp phần giải thích các yếu tố cơ bản của phương pháp này. Sáng chế này cần được hiểu một cách rõ ràng, tuy nhiên các bản vẽ chỉ được thiết kế cho mục đích minh họa và đó không phải là giới hạn của sáng chế này.

Hình 1 là sơ đồ tổng hợp của chất liên hợp PEG-mEGCG (108). Thiol-functionalized PEG (PEG-SH) (102) được kết hợp với EGCG (104) trong 1:3 (v/v) hỗn hợp DMSO và nước ở độ pH cơ bản (106);

Hình 2 là biểu đồ quang phổ UV-Vis của chất liên hợp PEG-EGCG (202) và PEG (204) hòa tan trong nước khử ion hóa ở nồng độ 0.5mg ml⁻¹.

Hình 3 là biểu đồ sắc ký của HPLC của EGCG (302) và chất liên hợp PEG-mEGCG (304). Các mũi tên chỉ đỉnh cực đại của mẫu thử được giám sát tại 280 nm.

Hình 4 là đồ thị thể hiện mức độ liên hợp của chất liên hợp PEG-mEGCG như một đặc trưng về thời gian phản ứng.

Hình 5 là biểu đồ quang phổ ¹H NMR của chất liên hợp PEG-EGCG hòa tan trong D₂O.

Hình 6 là sơ đồ cho thấy sự tạo thành của phức hợp nano mixen doxorubicin/PEG-mEGCG.

Hình 7 là sơ đồ biểu thị kích thước (sơ đồ A) và tiềm năng zeta của phức hợp nano mixen doxorubicin/PEG-mEGCG (sơ đồ B) được điều chế với tỷ lệ khối lượng PEG-mEGCG:doxorubicin khác nhau. Kích thước và tiềm năng zeta của phức hợp nano đã chuẩn

bị (cột đen, 702) được so sánh với kích thước và tiềm năng zeta của phức hợp nano hoàn nguyên (cột chéo, 704).

Hình 8 là đồ thị cho thấy hiệu quả dẫn thuốc (đồ thị A) và lượng thuốc được nạp (đồ thị B) của phức hợp nano mixen doxorubicin/PEG-mEGCG được điều chế với tỷ lệ khối lượng doxorubicin/PEG-mEGCG khác nhau.

Hình 9 là sơ đồ mô tả sơ lược mức giải phóng thuốc của phức hợp nano mixen doxorubicin/PEG-mEGCG trong PBS (dung dịch muối đệm phosphat) (pH7.3) tại 37°C. Tỷ lệ khối lượng PEG-mEGCG:doxorubicin là 1:1.

Hình 10 là sơ đồ minh họa sự tạo thành của phức hợp nano mixen SU/PEG-EGCG.

Hình 11 là đồ thị biểu hiện thể tích (đồ thị A), PDI (đồ thị B) và tiềm năng zeta (đồ thị C) của phức hợp nano mixen SU/PEG-EGCG với tỷ lệ khối lượng PEG-EGCG:SU khác nhau.

Hình 12 là đồ thị biểu hiện hiệu quả dẫn thuốc (đồ thị A) và lượng thuốc được nạp (đồ thị B) của phức hợp nano mixen SU/PEG-EGCG được điều chế với tỷ lệ khối lượng PEG-EGCG:SU khác nhau.

Hình 13 là đồ thị mô tả sơ lược mức giải phóng thuốc của phức hợp nano mixen SU/PEG-mEGCG (đồ thị A) và phức hợp nano mixen SU/PEG-dEGCG với tỷ lệ khối lượng PEG-EGCG:SU khác nhau trong PBS (pH7.3) tại 37°C (đồ thị B).

Hình 14 là sơ đồ biểu thị trọng lượng cơ thể con chuột được đo hàng tuần khi được cho điều trị uống SU (60mg/kg) hằng ngày so với việc chúng nhận phức hợp nano mixen SU/PEG-EGCG (với tỷ lệ khối lượng PEG-EGCG:SU xác định) và nhóm kiểm soát.

Hình 15 là sơ đồ cho thấy kích thước khối u (đồ thị A) (định lượng bằng tín hiệu phát quang) và (B) là những hình ảnh phát quang của chuột điều trị phức hợp nano mixen SU/PEG-EGCG (với tỷ lệ khối lượng PEG-EGCG:SU xác định), điều trị SU bằng đường uống, và không điều trị.

Hình 16 là biểu đồ trọng lượng cơ thể con chuột được đo khi hằng ngày điều trị SU bằng đường uống (40 và 15mg/kg) so với việc chúng nhận SU/PEG-mEGCG 8:1 phức hợp nano mixen và nhóm kiểm soát.

Hình 17 là đồ thị cho thấy kích thước khối u trong con chuột điều trị SU/PEG-mEGCG 8:1 phức hợp nano mixen, điều trị SU bằng đường uống, và không điều trị.

Mô tả chi tiết các phương án thực hiện sáng chế

Theo ví dụ, các phương pháp không giới hạn của phức hợp nano mixen sẽ được làm rõ sau đây.

Phức hợp nano mixen gồm một mixen và được chất được bọc trong mixen này, mixen gồm chất liên hợp polyme-flavonoit trong đó polyme liên kết với vòng B của flavonoit.

Có ít nhất một flavonoit liên kết với polyme. Có ít nhất hai flavonoit liên kết với một polyme.

Các polyme liên kết với flavonoit thông qua một liên kết. Liên kết này có thể là bất kỳ nhóm hóa chất nào có thể nối các polyme và flavonoit lại với nhau. Liên kết này có thể được chọn từ nhóm gồm thioete, imin, amin, azo và nhóm 1,2,3-triazol. Liên kết này có thể thuộc nhóm Alkan. Liên kết này có thể xuất hiện giữa bất kỳ các phần của polyme và flavonoit, hoặc có thể xuất hiện giữa một gốc của polyme với bất kỳ phần nào của flavonoit.

Các flavonoit được chọn từ nhóm gồm một flavonoit monome hoặc một flavonoit dime. Flavonoit monome bao gồm một phân tử flavonoit. Flavonoit dime bao gồm hai phân tử flavonoit được liên kết lại với nhau bởi một mối liên kết. Một trong các phân tử flavonoit của flavonoit dime có thể được liên kết với polyme. Cả hai phân tử flavonoit trong flavonoit dime có thể được liên kết một cách độc lập với polyme. Khi một flavonoit xuất hiện trong chất liên hợp nêu trên, thì flavonoit này được liên kết với polyme qua vòng B. Khi một flavonoit được liên kết với chất liên hợp trên thì flavonoit được liên kết với polyme qua vòng D.

Khi có nhiều hơn một flavonoit xuất hiện trong chất liên hợp thì có ít nhất một trong các flavonoit được liên kết với polyme thông qua vòng B. Các flavonoit còn lại liên kết với polyme thông qua vòng A. Khi có nhiều hơn một flavonoit xuất hiện trong chất liên hợp thì có ít nhất một trong các flavonoit được liên kết với polyme thông qua vòng B. Các flavonoit còn lại liên kết với polyme thông qua vòng B. Khi có nhiều hơn một flavonoit xuất hiện trong chất liên hợp thì có ít nhất một trong các flavonoit được liên kết với polyme thông qua vòng B. Các flavonoit còn lại liên kết với polyme thông qua vòng D.

Khi có nhiều hơn một flavonoit xuất hiện trong chất liên hợp thì có ít nhất một trong các flavonoit được liên kết với polyme thông qua vòng D. Các flavonoit còn lại liên kết với polyme thông qua vòng A. Khi có nhiều hơn một flavonoit xuất hiện trong chất liên hợp thì có ít nhất một trong các flavonoit được liên kết với polyme thông qua vòng D. Các flavonoit còn lại liên kết với polyme thông qua vòng B. Khi có nhiều hơn một flavonoit xuất hiện trong chất liên hợp thì có ít nhất một trong các flavonoit được liên kết với polyme thông qua vòng D. Các flavonoit còn lại liên kết với polyme thông qua vòng D.

Polyme có thể là polyme ưa nước. Polyme ưa nước này gồm các đơn phân được chọn từ nhóm gồm acrylamit, alkyl, oxazolin, alkenyl, hợp chất chức imin, axit acrylic, metacrylat, diol, oxiran, rượu, amin, các anhydrit, este, lacton, cacbonat, thioete axit, acrylat, hydroxyl, phosphat, terephthalat, amit và ete.

Polyme ưa nước được chọn từ nhóm gồm polyacrylamit, poly (N-isopropylacrylamit), poly (oxazolin), polyetylenimin, poly (axit acrylic), polymetacrylat, poly (etylen glycol), poly (etylen oxit), poly (vinyl alcohol), poly (vinylpyrrolidinon), polyete, poly (allylamin), polyanhydrit, poly (β -amino este), poly (butylen succinat), polycaprolacton, polycacbonat, polydioxanon, poly (glyxerol), axit polyglycolic, poly (axit 3-hydroxypropionic), poly (2-hydroxyetyl metacrylat), poly (N-(2-hydroxypropyl) metacrylamit), axit polylactic, poly (axit lactic-co-glycolic), poly (ortho este), poly (2-oxazolin), poly (axit sebacic), poly (terephthalat-co-phosphat) và copolyme.

Polyme ưa nước có thể là một polysacarit được chọn từ nhóm gồm axit hyaluronic, dextran, pullulan, chitosan, xenluloza, amyloza, tinh bột, gelatin, carrageenan, cyclodextrin, dextran sulfat, ficoll, gellan, gôm guar, pectin, polysucroza, pullulan, scleroglucan, xanthan, xyloglucan và alginat.

Polyme ưa nước có thể là polyetylen glycol (PEG). PEG là một polyme tổng hợp được sử dụng trong các ứng dụng sinh học vì tính ưa nước, linh hoạt và tính tương thích sinh học của nó. Cụ thể là PEG đã được sử dụng để thay đổi bề mặt của các mixen polyme và các hạt nano để tạo ra các bề mặt chống bám bẩn.

Polyetylen glycol (PEG) được chọn khi polyme được liên kết với flavonoid. Quá trình liên kết được thực hiện bằng phản ứng cộng ái nhân nhóm thiol của PEG tại vị trí C2' của vòng B trên flavonoid trong điều kiện kiểm soát độ pH.

Flavonoid được chọn từ nhóm gồm các flavon, isoflavon, flavan, proanthoxyanidin và anthoxyanidin.

Các flavon được chọn từ nhóm gồm apigenin, luteolin, tangeritin, chrysin, 6-hydroxyflavone, baicalein, scutellarein, wogonin, diosmin, flavoxate và 7,8-dihydroxyflavone.

Các isoflavon được chọn từ nhóm gồm genistein, daidzein, glycitein, genistin, daidzin, glycitin, acetyl-genistin, acetyl-daidzin, acetyl-glycitin, malonyl genistin, malonyl-daidzin và malonyl-glycitin.

Các flavan được chọn từ nhóm gồm (-)-epicatechin, (+)-epicatechin, (-)-catechin, (+)-catechin, epicatechin galat, epigallocatechin, epigallocatechin galat, fisetinidol,

gallocatechin, gallocatechin galat, mesquitol and robinetinidol, ellagitannin, gallotannin, oolongtheanin, phlorotannin, tannin, theacitrin, theadibenzotropolone, theaflavin, theanaphthoquinone, thearubigin, theasinensin và hỗn hợp của chúng.

Các anthoxyanidin được chọn từ nhóm gồm aurantinidin, capensinidin, cyaniding, delphinidin, europinidin, hirsutinidin, malvidin, pelargondin, peonidin, petunidin, pulchellidin và rosinidin.

Dược chất là thuốc trị liệu. Thuốc trị liệu là một chất hóa trị liệu được chọn từ nhóm gồm alkylating agent, antraxycline, bộ khung tế bào disruptor, epothilon, chất ức chế histon deacetylaza, chất ức chế topoisomeraza I, chất ức chế topoisomeraza II, chất ức chế kinaza, các kháng thể đơn dòng, các liên hợp kháng thể-thuốc, các chất tương tự nucleotit, các chất tương tự tiền chất, kháng sinh peptide, các chất trị liệu bạch kim, retinoit, vinca alkaloit, cytokine, các chất chống chuyển hóa, và các dẫn xuất vinca alkaloit, và các thuốc hóa học gây độc tế bào khác.

Các chất hóa trị liệu được chọn từ nhóm gồm actinomycin, afatinib, all-trans retinoic axit, axitinib, azacitidine, azathioprine, bevacizumab, bleomycin, bosutinib, bortezomib, carboplatin, capecitabine, cetuximab, cisplatin, chlorambucil, crizotinib, cyclophosphamid, cytarabine, dasatinib, daunorubicin, docetaxel, doxifluridin, doxorubicin, epirubicin, epothilon A ($C_{26}H_{39}NO_6S$), epothilon B ($C_{27}H_{41}NO_6S$), epothilon C ($C_{26}H_{39}NO_5S$), epothilon D ($C_{27}H_{41}NO_5S$), epothilon E ($C_{26}H_{39}NO_7S$), epothilon F ($C_{27}H_{41}NO_7S$), erlotinib, etoposide, fluorouracil, fostamatinib, gefitinib, gemcitabin, hydroxyurea, idarubicin, imatinib, irinotecan, lapatinib, lenvatinib, mechlorethamin, mercaptopurine, methotrexate, mitoxantrone, nilotinib, oxaliplatin, paclitaxel, panitumumab, pazopanib, pegaptanib, pemetrexed, ranibizumab, regorafenib, ruxolitinib, sorafenib, sunitinib, trastuzumab, teniposide, tioguanin, tofacitinib, topotecan, valrubicin, vemurafenib, vinblastin, vincristine, vindesine, vinorelbine.

Các chất hóa trị liệu có thể là doxorubicin.

Các chất hóa trị liệu có thể là Sunitinib (SU). SU là một chất gây ức chế tyrosine kinaza đa mục tiêu và là liệu pháp đầu tiên điều trị tế bào ung thư biểu mô tế bào thận (ccRCC). Cụ thể, SU nhắm vào các thụ thể yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch máu (VEGF) và các yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (PDGF), các yếu tố này đóng vai trò trong việc hình thành mạch máu của khối u và sự phát triển của khối u đó, dẫn đến giảm sự tạo mạch cho đến khi các tế bào ung thư bị chết. Chất này đã được chấp thuận sử dụng trong điều trị ung thư thận (RCC), điều trị các khối u mô đệm đường tiêu hóa (GIST) và các khối u thần kinh nội tiết tuyến tụy (pNET). SU cũng được chứng minh là có tiềm năng chữa ung thư vú di căn, ung thư phi tiểu bào phổi, ung thư biểu mô tế bào gan, các khối u thuộc tuyến

nội tiết thần kinh và bệnh bạch cầu. Tuy nhiên, nó có thể có tác dụng phụ nghiêm trọng như ảnh hưởng đến gan, tim và nhiễm độc đường tiêu hóa, tăng huyết áp, các vấn đề về da và hội chứng tay-chân.

Phức hợp nano mixen có kích thước trong khoảng từ 30 đến 300 nm, 50 đến 300 nm, 100 đến 300 nm, 30 đến 50 nm, 30 đến 100 nm, 30 đến 150 nm, 150 đến 300 nm, 200 đến 300 nm, 250 đến 300 nm, 100 đến 150 nm, 100 đến 200 nm, 100 đến 250 nm, 130 đến 180 nm, hoặc 130 đến 250 nm.

Phức hợp nano mixen có hiệu quả dẫn thuốc điều trị trong mixen là hơn 30%, hơn 35%, hơn 40%, hơn 45%, hơn 50%, hơn 55%, hơn 60%, hơn 65%, hơn 70%, hơn 75%, hoặc 80%.

Phức hợp nano mixen có lượng tải thuốc điều trị trong mixen trog khoảng từ 1 đến 10% trọng lượng, 5 đến 25 % trọng lượng, 20 đến 45 % trọng lượng, 30 đến 50 % trọng lượng, 35 đến 50 % trọng lượng, 40 đến 50 % trọng lượng, 45 đến 50 % trọng lượng, 30 đến 35 % trọng lượng, 30 đến 40 % trọng lượng hoặc 30 đến 45 % trọng lượng.

Phương pháp tạo thành phức hợp nano mixen chứa mixen và dược chất được bọc trong mixen, phương pháp này bao gồm các bước như sau:

a. thêm dược chất nêu trên trong dung môi thích hợp vào chất liên hợp polyme-flavonoit, trong đó polyme này là polyme ưa nước được liên kết với vòng B của flavonoit này; và

b. cho phép quá trình tự ghép nối của mixen chứa chất liên hợp polyme-flavonoit nêu trên và sự bao nang của dược chất này trong mixen để từ đó tạo thành phức hợp nano mixen.

Bước (a) còn gồm các bước sau:

a. loại bỏ dung môi để tạo thành lớp màng khô của dược chất nêu trên và chất liên hợp polyme-flavonoit; và

b. hydrat hóa lớp màng khô trên bằng dung môi chứa nước.

Phương pháp này còn chứa các bước tách phức hợp nano mixen được tạo thành bằng cách lọc hoặc thẩm tách trong dung môi thích hợp.

Chất liên hợp polyme-flavonoitgồm một polyme được liên kết với vòng B của flavonoit.

Polyme của chất liên hợp polyme-flavonoit được chọn từ nhóm gồm polysacarit, polyacrylamit, poly(N-isopropylacrylamit), poly(oxazolin), polyetylenimin, poly(axit

acrylic), polymetacrylat, poly(etylen glycol), poly(etylen oxit), poly(vinyl alcohol), poly(vinylpyrolidinon), polyete, poly(allylamin), polyanhydrit, poly(β -amino este), poly(butylen succinat), polycaprolacton, polycarbonat, polydioxanon, poly(glyxerol), axit polyglycolic, poly(axit 3-hydroxypropionic), poly(2-hydroxyetyl metacrylat), poly(N-(2-hydroxypropyl)metacrylamit), axit polylactic, poly(axit lactic-co-glycolic), poly(ortho este), poly(2-oxazolin), poly(axit sebacic), poly(terephthalat-co-phosphat) và copolyme.

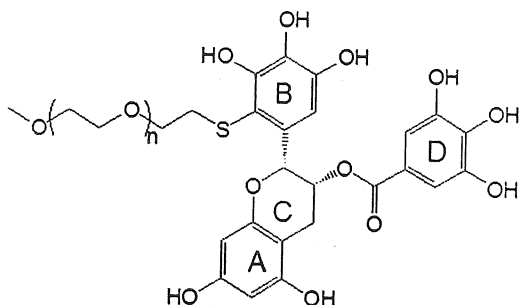
Flavonoit trong chất liên hợp polyme-flavonoit được chọn từ nhóm gồm (-)-epicatechin, (+)-epicatechin, (-)-catechin, (+)-catechin, epicatechin galat, epigallocatechin, epigallocatechin galat, fisetinidol, gallocatechin, gallocatechin galat, mesquitol and robinetinidol, ellagitannin, gallotannin, oolongtheanin, phlorotannin, tannin, theacitrin, theadibenzotropolone, theaflavin, theanaphthoquinone, thearubigin, theasinensin và hỗn hợp của chúng.

Polyme được kết hợp với flavonoit trong hợp chất liên hợp polyme-flavonoit thông qua một liên kết, liên kết này được chọn từ nhóm gồm một thioete, imin, amin, azo và nhóm 1,2,3-triazol. Liên kết này có thể thuộc nhóm alkan, có thể xuất hiện giữa bất kỳ phần nào của polyme và bất kỳ phần nào của flavonoit. Liên kết này có thể xuất hiện giữa một gốc của polyme và bất kỳ phần nào của flavonoit.

Polyme trong chất liên hợp polyme-flavonoit có thể là poly (etylen glycol), flavonoit trong chất liên hợp polyme-flavonoit có thể là epigallocatechin-3-galat và mỗi liên kết nêu trên trong chất liên hợp polyme-flavonoit có thể là thio ete.

Các polyme flavonoit có công thức như sau:

Công thức 2



trong đó n có giá trị từ 20 đến 910.

Phương pháp tạo thành chất liên hợp polyme-flavonoit gồm các bước liên kết flavonoit với polyme qua phản ứng cộng ái nhân môi trường bazơ, trong đó polyme chứa nhóm ái nhân tự do.

Nhóm ái nhân được chọn từ các nhóm gồm sulfhydryl, amin, carbonyl, thioete axit, azide, halogen, ankin và alken. Các nhóm ái nhân được chọn từ các nhóm gồm thiol, amin, diazoalkan và azit.

Nhóm ái nhân có thể thuộc nhóm thiol. EGCG trải qua quá trình oxy hóa với sự có mặt của oxy để tạo thành một ortho-quinone thông qua một cách có liên quan đến các gốc semiquinone và các dược chất oxy hóa. Ortho-quinone khuyết electron trong EGCG phản ứng với nhóm ái nhân thiol có mặt trong phân tử sinh học gồm cystein, glutathione, và các protein. EGCG liên kết đồng hóa trị với dư lượng cystein trong protein trên màng tế bào hồng cầu ở con người và glyceraldehyde-3-phosphat dehydrogenase (GAPDH). Các sản phẩm cộng quá trị của EGCG được hình thành khi bị oxy hóa với sự xuất hiện của cystein và glutathione. Kết quả là các chất liên hợp cystein của EGCG có thể biểu hiện các hoạt động của các chất oxy hóa cao hơn EGCG, trong khi duy trì sự ức chế tăng trưởng của chúng và các hoạt động chống viêm. Thêm vào đó, N-acetyl cystein-conjugated EGCG có thể tăng cường sự ức chế tăng trưởng và các yếu tố gây chết rụng tế bào của EGCG chống lại các tế bào ung thư phổi ở chuột và con người.

Các bước liên kết được thực hiện trong một thời gian phản ứng từ khoảng 1 tiếng đến 24 tiếng, khoảng 1 tiếng đến 2 tiếng, khoảng 1 tiếng đến 4 tiếng, khoảng 1 tiếng đến 8 tiếng, khoảng 1 tiếng đến 12 tiếng, khoảng 2 tiếng đến 4 tiếng, khoảng 2 tiếng đến 12 tiếng, khoảng 2 tiếng đến 12 tiếng, khoảng 2 tiếng đến 24 tiếng, khoảng 4 tiếng đến 8 tiếng, khoảng 4 tiếng đến 12 tiếng, khoảng 4 tiếng đến 24 tiếng, khoảng 8 tiếng đến 12 tiếng, khoảng 8 tiếng đến 24 tiếng, khoảng 12 tiếng đến 24 tiếng.

Phương pháp còn bao gồm các bước tiến hành các bước liên kết trong một dung môi có thể ngăn chặn đáng kể sự kết tụ flavonoit.

Phương pháp còn bao gồm bước thêm chất lọc phần thừa để ngăn chặn quá trình oxy hóa H_2O_2 qua trung gian của nhóm ái nhân để qua đó nâng cao hiệu quả của các bước liên kết.

Môi trường bazơ với độ pH trong khoảng từ hơn 7 đến 10, hơn 8 đến 10, hơn 9 đến 10, hơn 7 đến 11, hơn 8 đến 11, hơn 9 đến 11, hơn 10 đến 11, hơn 7, hơn 8, hơn 9, hơn 10 và hơn 11.

Phức hợp nano mixen trong đó gồm một mixen và dược chất được bọc trong mixen này như một phương tiện phân phối thuốc, trong đó mixen gồm một chất liên hợp polyme-flavonoit, trong đó polyme được liên kết với vòng B của flavonoit.

Phức hợp nano mixen có thể sử dụng ngoài đường tiêu hóa, bằng cách phun hít vào, dùng tại chỗ, qua trực tràng, qua mũi, má, âm đạo, thông qua một ống chứa được cấy ghép,

bằng đường tiêm, dùng dưới da, màng bụng, qua niêm mạc, bằng đường uống hoặc trong chế phẩm nhả khoa.

Các phương pháp sử dụng thuốc ngoài đường tiêu hóa gồm tiêm dưới da, đắp thuốc dưới da, tiêm vào tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm vào khớp, tiêm vào bao hoạt dịch khớp, tiêm vào trong tủy cột sống, dùng thuốc tại chỗ và tiêm hoặc truyền thuốc vào hộp sọ.

Dược chất trong phức hợp nano mixen có thể được dùng với liều lượng khoảng 1 đến khoảng 80 mg/kg mỗi ngày, khoảng 1 đến 2 mg/kg mỗi ngày, khoảng 1 đến 5 mg/kg mỗi ngày, khoảng 1 đến khoảng 10 mg/kg mỗi ngày, khoảng 1 đến 20 mg/kg mỗi ngày, khoảng 1 đến 50 mg/kg mỗi ngày, khoảng 2 đến 5 mg/kg mỗi ngày, khoảng 2 đến 10 mg/kg mỗi ngày, khoảng 2 đến khoảng 20 mg/kg mỗi ngày, khoảng 2 đến khoảng 50 mg/kg mỗi ngày, khoảng 2 đến khoảng 80 mg/kg mỗi ngày, khoảng 5 đến 10 mg/kg mỗi ngày, khoảng 5 đến khoảng 20 mg/kg mỗi ngày, khoảng 5 đến 50 mg/kg mỗi ngày, khoảng 5 đến 80 mg/kg mỗi ngày, có khoảng 10 đến 20 mg/kg mỗi ngày, có khoảng 10 đến 50 mg/kg mỗi ngày, khoảng 10 đến 80 mg/kg mỗi ngày, có khoảng 20 đến 50 mg/kg mỗi ngày, có khoảng 20 đến 80 mg/kg mỗi ngày hoặc khoảng 50 đến 80 mg/kg mỗi ngày.

Bệnh nhân ung thư được lựa chọn từ các nhóm bệnh ung thư như ung thư biểu mô thận, u lympho có liên quan đến AIDS, ung thư hậu môn, ung thư ruột thừa, u bào hình sao cấp I, u bào hình sao cấp II, u bào hình sao cấp III, u bào hình sao cấp IV, khối u ác/dạng que của hệ thống thần kinh trung ương, ung thư biểu mô tế bào đáy, ung thư bàng quang, ung thư phế quản, ung thư biểu mô vách phế nang, ung thư hạch Burkitt, ung thư cổ tử cung, ung thư kết trực tràng, ung thư đại trực tràng, u sọ hầu, u lympho tế bào T trên da, ung thư nội mạc tử cung, ung thư tử cung, u nguyên bào màng não thất, u màng não thất, ung thư thực quản, u nguyên bào thần kinh khứu giác, ung thư mô liên kết Ewing, khối u tế bào mầm ngoài sọ, khối u tế bào mầm extragonadal, ung thư ống dẫn mật ngoài gan, u xơ ác tính, ung thư túi mật, ung thư dạ dày, khối u hạch đường tiêu hóa, u mô đệm đường tiêu hóa, u nguyên bào nuôi do thai nghén, u thần kinh đệm, ung thư đầu và cổ, ung thư tim, ung thư tế bào gan, ung thư đường mật, u lympho Hodgkin, ung thư biểu mô hypopharyngeal (trung tự ung thư thanh quản), ung thư tế bào sắc tố đen của mắt, ung thư tế bào đảo tụy, ung thư Kaposi, hội chứng mô bào Langerhans, ung thư thanh quản, ung thư môi, ung thư hạch, bệnh tăng globulin đại phân tử, u mô bào xơ ác tính, u nguyên bào tủy, một dạng ung thư mắt medulloepithelioma, ung thư tế bào hắc tố, ung thư biểu mô tế bào Merkel, u trung biểu mô, ung thư tuyến nội tiết, đa u tủy xương, u sùi dạng nấm, hội chứng rối loạn sinh tủy, hội chứng tăng sinh tủy ác tính, bệnh cường huyết cầu do rối loạn tủy xương, ung thư khoang mũi, ung thư vòm họng, u nguyên bào thần kinh, u lympho không Hodgkin, ung thư vòm miệng, ung thư vòm họng, ung thư xương, ung thư tế bào sáng trong buồng trứng, ung thư biểu mô buồng trứng, u tế bào mầm trong buồng trứng, u nhú thanh quản, ung thư các xoang

gần khoang mũi, ung thư tuyến cận giáp, ung thư dương vật, ung thư thanh quản, u nhu mô tuyến tủy, u nguyên bào tuyến tủy, u tuyến yên, ung thư tương bào, u nguyên bào phổi, u nguyên bào hệ thần kinh trung ương, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư trực tràng, ung thư tế bào thận, ung thư đường hô hấp với sự thay đổi của nhiễm sắc thể 15, u nguyên bào võng mạc, ung thư mô liên kết, ung thư tuyến nước bọt, hội chứng Sezary, ung thư ruột non, ung thư phần mềm, ung thư biểu mô tế bào vảy, ung thư tế bào vảy trên cổ, u bướu máu trên lều thần kinh ngoại bì nguyên thủy, ung thư tinh hoàn, ung thư cuống họng, ung thư tuyến ức, u tuyến ức, ung thư tuyến giáp, ung thư xương chậu, ung thư bề thận, ung thư niệu đạo, ung thư tử cung, ung thư âm đạo, bệnh tăng globulin đại phân tử và khối u Wilms.

Bệnh nhân khối u được lựa chọn từ các nhóm bệnh như ung thư biểu mô thận, ung thư hậu môn, ung thư ruột thừa, u bào hình sao cấp I, u bào hình sao cấp II, u bào hình sao cấp III, u bào hình sao cấp IV, khối u ác/dạng que của hệ thống thần kinh trung ương, ung thư biểu mô tế bào đáy, ung thư bàng quang, ung thư phế quản, ung thư biểu mô vách phế nang, ung thư cổ tử cung, ung thư kết trực tràng, ung thư đại trực tràng, u sọ hầu, ung thư nội mạc tử cung, ung thư tử cung, u nguyên bào màng não thất, u màng não thất, ung thư thực quản, u nguyên bào thần kinh khứu giác, ung thư mô liên kết Ewing, khối u tế bào mầm ngoài sọ, khối u tế bào mầm extragonadal, ung thư ống dẫn mật ngoài gan, u xơ ác tính, ung thư túi mật, ung thư dạ dày, khối u hạch đường tiêu hóa, u mô đệm đường tiêu hóa, u nguyên bào nuôi do thai nghén, u thần kinh đệm, ung thư đầu và cổ, ung thư tim, ung thư tế bào gan, ung thư đường mật, ung thư biểu mô hypopharyngeal (trung tự ung thư thanh quản), ung thư tế bào sắc tố đen của mắt, ung thư tế bào đảo tụy, ung thư Kaposi, hội chứng mô bào Langerhans, ung thư thanh quản, ung thư môi, bệnh tăng globulin đại phân tử, u mô bào xơ ác tính, u nguyên bào tủy, một dạng ung thư mắt medulloepithelioma, ung thư tế bào hắc tố, ung thư biểu mô tế bào Merkel, u trung biểu mô, ung thư tuyến nội tiết, đa u tủy xương, u sùi dạng nấm, hội chứng rối loạn sinh tủy, hội chứng tăng sinh tủy ác tính, bệnh cường huyết cầu do rối loạn tủy xương, ung thư khoang mũi, ung thư vòm họng, u nguyên bào thần kinh, ung thư vòm miệng, ung thư vòm họng, ung thư xương, ung thư tế bào sáng trong buồng trứng, ung thư biểu mô buồng trứng, u tế bào mầm trong buồng trứng, u nhú thanh quản, ung thư các xoang gần khoang mũi, ung thư tuyến cận giáp, ung thư dương vật, ung thư thanh quản, u nhu mô tuyến tủy, u nguyên bào tuyến tủy, u tuyến yên, ung thư tương bào, u nguyên bào phổi, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư trực tràng, ung thư tế bào thận, ung thư đường hô hấp với sự thay đổi của nhiễm sắc thể 15, u nguyên bào võng mạc, ung thư mô liên kết, ung thư tuyến nước bọt, hội chứng Sezary, ung thư ruột non, ung thư phần mềm, ung thư biểu mô tế bào vảy, ung thư tế bào vảy trên cổ, u bướu máu trên lều thần kinh ngoại bì nguyên thủy, ung thư tinh hoàn, ung thư cuống họng, ung thư tuyến ức, u tuyến ức, ung thư tuyến giáp, ung thư xương chậu, ung thư bề thận, ung thư niệu đạo, ung thư tử cung, ung thư âm đạo, bệnh tăng globulin đại phân tử và khối u Wilms.

Phức hợp nano mixen có thể dùng để điều trị ung thư và điều trị khối u.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ không hạn chế của sáng chế này và một ví dụ để so sánh sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng cách tham khảo các ví dụ cụ thể, không nên hiểu theo bất kỳ cách nào đây là hạn chế của phạm vi sáng chế.

Ví dụ 1: Các chất và sự nuôi cấy tế bào

Các chất

Methoxy-polyetylen glycol với gốc cuối thiol (PEG-SH, $M_w = 5000$ Da) lấy từ Công nghệ JenKem (Trung Quốc). Methoxy-polyetylen glycol với gốc cuối aldehyde (PEG-CHO, $M_w = 5000$ Da) lấy từ Công ty NOF, Nhật Bản. (-)-Epigallocatechin-3-galat (EGCG, độ tinh khiết >95%) lấy từ Khu công nghiệp Kurita Water (Tokyo, Nhật Bản). Dung dịch natri pyruvat (100 nM) mua từ Invitrogen (Singapore). Dung dịch muối PBS không chứa Ca^{2+} và Mg^{2+} (150 nM, pH 7.3) được cung cấp bởi bộ phận chuẩn bị phương tiện truyền thông tại Biopolis, Singapore. DMSO và triethylamin (TEA) được mua từ Sigma-Aldrich (Singapore). Doxorubicin hydrochlorit (DOX•HCl) được mua từ Boryung Pharm. Inc. (Korea). SU (ở thể nguyên bản) mua từ BioVision (Mỹ). Các hóa chất khác dùng để phân tích.

Sự nuôi cấy tế bào

Tế bào ung thư biểu mô trong thận người A498 lấy từ American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), và được nuôi cấy tại Dulbecco's Modified Eagle's Medium được bổ sung 10% huyết thanh phôi của bò, 1% penicillin-streptomycin, 2 mM of glutamin và 0.1 mM các axit amin không thiết yếu. Tế bào vô tính A498 thể hiện gen luciferase (A498-luc) được tạo ra như đã được mô tả. Tóm lại, các tế bào A498 được nuôi cấy trong một khay nuôi cấy tế bào 6 giếng với mật độ là 5×10^5 tế bào/giếng và chuyển nạp với hợp bào pRC-CMV2-luc sử dụng Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Sau 1 ngày, các tế bào chuyển nạp được chuyển sang đĩa nuôi cấy tế bào 100-nm và 1 mg ml^{-1} geneticin được thêm vào môi trường để chọn ra các tế bào mang kháng thể. Một tuần sau khi chọn lọc, các tế bào mang kháng thể này được nuôi cấy trong khay nuôi cấy tế bào 96 giếng với mật độ 1 tế bào/giếng để hình thành cụm khuẩn. Tổng cộng có 10 cụm được lựa chọn và mở rộng, hoạt động của luciferase được đo bằng bộ Kit Promega (Madison, WI, USA) trong máy Single tube luminometer (Berthold Lumat LB 9507, Bad Wildbad, Đức). Một bản sao với mức hoạt động của luciferase cao nhất được lựa chọn và duy trì bằng 500 mg ml^{-1} geneticin.

Ví dụ 2: Hợp chất PEG-EGCG

Trong nghiên cứu này, hai loại chất liên hợp PEG-EGCG được sử dụng để tạo phức hợp nano mixen là PEG-mEGCG và PEG-dEGCG trong đó có một và hai gốc EGCG nằm ở một đầu PEG tương ứng.

Tổng hợp chất liên hợp PEG-mEGCG

Chất liên hợp PEG-mEGCG được tổng hợp bởi sự kết hợp EGCG với PEG chứa gốc cuối thiol. Thông thường, EGCG (18.3 mg, 40 μmol) được hòa tan trong 20 mL hỗn hợp PBS và DMSO tỷ lệ 1:1. PEG-SH ($M_w = 5000$ Da, JenKem Technology, Trung Quốc) (100 mg, 20 μmol) được hòa tan riêng trong 20 mL PBS. Dung dịch PEG-SH được thêm nhỏ giọt vào dung dịch khuấy EGCG. Là một thí nghiệm kiểm tra, dung dịch PEG nguyên bản được thêm vào dung dịch khuấy EGCG với cùng nồng độ. Hỗn hợp thu được có pH 8.4. Hỗn hợp được khuấy trong 7 tiếng ở 25°C. Với dung dịch này, 1.6 mL trong 10% axit axetic được cho vào để điều chỉnh độ pH lên 4 để ngưng phản ứng. Dung dịch thu được được chuyển qua các ống thẩm tách với khối lượng phân tử cắt là 1000 Da. Các ống được thẩm tách chống nước khử ion. Dung dịch tinh khiết được cấp đông khô để thu được chất liên hợp PEG-mEGCG. Cấu trúc chất liên hợp PEG-mEGCG được xác nhận bởi quang phổ học ^1H NMR. Chất liên hợp khô PEG-mEGCG được hòa tan trong D_2O ở nồng độ 20 mg mL^{-1} và sau đó được phân tích bằng máy đo quang phổ Bruker AV-400 NMR hoạt động ở 400 MHz. Năng suất: 89%. ^1H NMR (D_2O) : δ 2.9 (t, H- α từ PEG), 3.4 (s, H- γ từ PEG), 3.5-3.8 (m, các proton trong PEG), 5.5 (s, H-2 của vòng C), 5.85 (s, H-3 của vòng C), 6.15 (d, H-6 và H-8 của vòng A), 6.9 (s, H-6' của vòng B), 7.05 (s, H-2'' và H-6'' của vòng D).

Hình 1 minh họa sơ đồ tổng hợp chất liên hợp PEG-mEGCG (108). Thiol-functionalized PEG (PEG-SH) (102) được ủ cùng hơn 2 lần mol EGCG (PEG-SH: EGCG = 1:2) (104) trong 1:3 (v/v) DMSO và nước hỗn hợp ở độ pH (106) cơ bản. Theo ghi nhận thì độ pH thực sự ảnh hưởng đến quá trình tự oxy hóa của EGCG. Trong khoảng pH cơ bản từ 7-9.5, phân nửa gallyl trên vòng B dễ bị tự oxy hóa hơn nửa galat trên vòng D. Kết quả là chỉ có phân nửa gallyl trên vòng B hình thành nên ortho-quinone. Trong điều kiện kiềm mạnh (pH>10), một nửa galat trên vòng D cũng có thể bị tự oxy hóa để hình thành ortho-quinone. Trong nghiên cứu này, phản ứng được thực hiện ở độ pH 8.4 cho phép chỉ hình thành một ortho-quinone trên vòng B của EGCG. Phản ứng cộng ái nhân tiếp theo của PEG-SH để ortho-quinone sản sinh chất liên hợp PEG-mEGCG liên kết thông qua một liên kết cộng hóa trị thio ete.

Đáng chú ý các phản ứng kết hợp tiến hành với sự có mặt của dimethyl sulfoxit (DMSO). Trong quá trình EGCG hợp thể hóa khi tiếp xúc với PEG trong dung dịch nước thì cần tránh việc kết hợp chất liên hợp EGCG với PEG-SH. Người ta nhận thấy rằng DMSO có hiệu quả ngăn chặn sự kết hợp. Dựa trên phát hiện này, các phản ứng kết hợp được thực hiện

trong hỗn hợp của DMSO và nước. Ngoài ra, sodium pyruvat được sử dụng như một chất lọc phần thừa cho H_2O_2 tạo ra trong quá trình tự oxy hóa EGCG. Trong quá trình sodium pyruvat bảo vệ các nhóm thiol tự do chống lại quá trình oxy hóa trung gian H_2O_2 , việc này có thể làm tăng số lượng của các phân tử PEG-SH có sẵn cho một phản ứng liên hợp với EGCG. Chất liên hợp PEG-mEGCG thu được đã được tinh chế bằng cách thẩm tách dưới môi trường khí ni tơ và sau đó cấp đông khô sẽ thu được một lượng bột màu trắng.

Đặc tính UV-Vis của chất liên hợp PEG-mEGCG

Các chất liên hợp PEG-mEGCG được mô tả đặc điểm bằng quang phổ tia cực tím có thể nhìn thấy (UV-Vis) (Hình 2). Quang phổ UV-Vis của chất liên hợp PEG-mEGCG được đo bằng máy đo quang phổ Hitachi U-2810 (Nhật Bản). Với quang phổ UV-Vis, chất liên hợp PEG-mEGCG khô và PEG được hòa tan trong nước khử ion ở nồng độ 0.5 mg mL^{-1} . Không như PEG nguyên bản (204), chất liên hợp PEG-mEGCG (202) được chứng minh là có một đỉnh hấp thụ tia cực tím cường độ cao tại 280 nm, đây là biểu hiện của sự kết hợp thành công trong EGCG. Hơn nữa, các dải hấp thụ UV tại 425 nm tương ứng với EGCG nhị trùng và các sản phẩm oxy hóa khác không được quan sát.

Đặc tính HPLC của chất liên hợp PEG-mEGCG

Chất liên hợp PEG-mEGCG cũng được đánh giá bằng cách đảo pha phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Phương pháp đảo pha này được thực hiện bằng cách sử dụng Waters 2695 separations module được trang bị với Spirit™ C18 organic column ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 250 \text{ mm i.d.}$, AAPPTEC). EGCG, hỗn hợp PEG/EGCG, và chất liên hợp PEG-mEGCG được hòa tan trong nước khử ion ở nồng độ 1 mg mL^{-1} . Các mẫu được tách rửa bằng hỗn hợp dung môi của 1% axit axetic trong acetonitrile và 1% axit axetic trong nước với tốc độ dòng chảy là 1 mL/phút ở 25°C . Đối với giai đoạn biến đổi nhanh, tỷ lệ acetonitrile : khối lượng nước tăng dần từ 3:7 ở 0 phút đến 4:6 ở 10 phút. Các mẫu đã tách rửa được theo dõi ở 280 nm. Mức chất liên hợp EGCG được xác định bằng cách so sánh vùng đỉnh hợp nhất với kết quả thu được từ một loạt các dung dịch tiêu chuẩn của EGCG với các nồng độ khác nhau. Như mô tả trong Hình 3, EGCG (302) đã được tách rửa với thời gian duy trì là 4.8 phút, trong khi chất liên hợp PEG-mEGG (304) được tách rửa trong 8 phút. Sự thay đổi mạnh mẽ này trong thời gian duy trì có thể được giải thích bởi sự gắn kết chuỗi PEG ưa nước với EGCG. Ngoài ra, không có đỉnh EGCG nào được quan sát thấy trong biểu đồ sắc ký HPLC của chất liên hợp PEG-mEGCG, cho thấy các phân tử EGCG hoàn toàn bị loại bỏ trong quá trình thẩm tách. Mức chất liên hợp EGCG tăng từ 63 đến 98% khi thời gian phản ứng tăng từ 6 đến 7 tiếng (Hình 4). Tuy nhiên, khi thời gian phản ứng là 8 tiếng, mức chất liên hợp sẽ giảm nhẹ, có thể do các chất nhị trùng EGCG và các sản phẩm oxy hóa khác bắt đầu hình thành. Do đó, thời gian phản ứng tối ưu là 7 tiếng.

Đặc tính ^1H NMR của chất liên hợp PEG-mEGCG

Cấu trúc của các chất liên hợp Peg-mEGCG được xác định bằng quang phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) ^1H . Như mô tả trong Hình 5, các chất liên hợp PEG-mEGCG hiển thị tín hiệu proton cho vòng A (H-6 và H-8 tại $\delta = 6.15$), vòng C (H-2 tại $\delta = 5.5$ và H-3 tại $\delta = 5.85$), và vòng D (H-2'' và H-6'' tại $\delta = 7.1$). Các tín hiệu proton phát sinh từ các vòng A, C, D tương tự như EGCG nguyên bản của chúng, điều đó cho thấy phân nửa chúng được duy trì không đổi trong phản ứng kết hợp. Ngược lại, các tín hiệu proton cho vòng B được chuyển từ 6.5 đến 6.9 ppm sau khi phản ứng kết hợp diễn ra. Quá trình chuyển đổi quan trọng này trong các tín hiệu proton có khả năng do liên kết của PEG-SH tới vị trí C2' của vòng B. Ngoài ra, đỉnh NMR của vòng B được chứng minh là có một nửa khu vực phía dưới đỉnh đối với vòng D, điều này cho thấy một proton trên vòng B biến mất sau phản ứng kết hợp. Hiện tượng quan sát được phù hợp với báo cáo trước đây, theo đó sự hình thành của 2'-cysteinyl EGCG dẫn đến sự biến mất của nguyên tử H-2' từ vòng B. Kết quả trên cho thấy chỉ có một phân tử PEG có thể được kết hợp một cách đặc biệt với vị trí C2' trên vòng B trong EGCG.

Quá trình tổng hợp chất liên hợp PEG-dEGCG

Chất liên hợp PEG-dEGCG được tổng hợp bởi sự kết hợp EGCG với PEG cùng một nhóm gốc aldehyde (PEG-CHO). PEG-CHO ($M_w = 5000$ Da, NOF Co., Japan) (1.75 g) và EGCG (3.25 g, 7.09 mmol) được hòa tan riêng biệt trong hỗn hợp axit axetic, nước và DMSO. Phản ứng được bắt đầu với việc bổ sung từng giọt dung dịch PEG-CHO và được tiến hành ở nhiệt độ 20°C trong 72 tiếng. Các dung dịch thu được được thẩm tách (MWCO = 3500 Da) chống nước khử ion. Các dung dịch tinh khiết được cấp đông khô để thu được hợp chất PEG-dEGCG.

Ví dụ 3: Chất liên hợp Doxorubicin/PEG-mEGCG

Với các ứng dụng điều trị ung thư, chất liên hợp PEG-mEGCG được thiết kế để tạo thành phức hợp nano mixen có khả năng mang theo một lượng lớn các loại thuốc chống ung thư. Trong nghiên cứu này, phức hợp nano mixen PEG-mEGCG đã được sử dụng như một phương tiện phân phối doxorubicin. Doxorubicin là một trong những thuốc trị liệu hóa học được sử dụng rộng rãi nhất và hoạt động gây độc tế bào mạnh mẽ chống lại các căn bệnh ung thư, ví dụ như bệnh bạch cầu, ung thư vú, ung thư buồng trứng và ung thư phổi. Tuy nhiên, nó ảnh hưởng nặng đến tim và làm tăng nguy cơ xung huyết suy tim, loạn nhịp tim, hạ huyết áp và các tác dụng phụ khác. Phức hợp nano mixen PEG-mEGCG có thể giảm thiểu các tác dụng phụ bất lợi đó bằng cách bao nang ổn định các phân tử thuốc bên trong nó và phân phối chúng một cách liên tục.

Sự tạo thành phức hợp nano mixen Doxorubicin/PEG-mEGCG

Phức hợp nano mixen Doxorubicin/PEG-mEGCG được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp thẩm tách. Cụ thể, 5 mg DOX•HCl được hòa tan trong 4.5mL dimetyl formamit. Với dung dịch này, TEA được thêm vào với tỷ lệ TEA:DOX•HCl là 5:1. Hỗn hợp này được khuấy trong 30 phút để hình thành deprotonated doxorubicin (DOX). Dung dịch DOX thu được sẽ được trộn với chất liên hợp PEG-mEGCG hòa tan trong 0.5 ml dimetyl formamit với tỷ lệ khối lượng PEG-mEGCG/DOX khác nhau. Hỗn hợp này được khuấy trong 90 phút, sau đó chuyển sang ống thẩm tách với MWCO = 2000 Da. Các ống được thẩm tách chống nước khử ion trong 24h để thu được phức hợp nano mixen Doxorubicin/PEG-mEGCG.

Đặc tính của phức hợp nano mixen Doxorubicin/PEG-mEGCG

Đường kính thủy động lực học, chỉ số polydispersity, và tiềm năng zeta của phức hợp nano mixen doxorubicin/PEG-mEGCG được đánh giá bởi sự tán xạ ánh sáng động (Zetasizer Nano ZS, Malvern, Vương quốc Anh). Các phép đo được thực hiện ba lần trong nước ở 25°C. Để đo lượng tải của doxorubicin, 20 μ L của phức hợp nano phân tán trong nước được trộn với 980 ml dimetyl formamit để trích xuất doxorubicin. Độ hấp thụ của doxorubicin ở 480 nm được đo bằng một máy quang phổ Hitachi U-2810 (Nhật Bản). Hiệu quả dẫn thuốc và lượng thuốc được tải được xác định bằng cách so sánh giá trị hấp thụ với những phần thu được từ một loạt các dung dịch doxorubicin tiêu chuẩn với nồng độ khác nhau.

Hình 6 mô tả sự tạo thành của phức hợp nano mixen doxorubicin / PEG-mEGCG. Chất liên hợp PEG-mEGCG (602) và doxorubicin (604) đã được hòa tan trong dimetyl formamid (606). Hỗn hợp này được thẩm tách với nước cất (608). Khi dung môi hữu cơ được loại bỏ khỏi các ống thẩm tách, một nửa EGCG kỵ nước trong các chất liên hợp bắt đầu tự lắp ghép để tạo thành một lõi mixen được bao quanh bởi một lớp vỏ của chuỗi PEG ưa nước (610). Đồng thời, các phân tử doxorubicin cũng được phân chia thành các lõi mixen kỵ nước. Báo cáo cho thấy rằng các phân tử doxorubicin đã dễ dàng xếp chồng lên nhau trong dung dịch nước vì tương tác π - π giữa các vòng hai chiều antracycline. Kể từ khi EGCG có cấu trúc polyphenol có khả năng tương tác với doxorubicin qua liên kết π - π , nó được dự đoán rằng lượng EGCG sẽ càng dồi dào trong lõi của phức hợp nano mixen, và có thể cung cấp một môi trường thuận lợi cho các lỗ hổng của doxorubicin bên trong. Hơn nữa, các chuỗi bề mặt tiếp xúc PEG có thể tạo thành một lớp vỏ bảo vệ xung quanh phức hợp nano mixen để tránh sự cản phá hệ thống lưới nội mô, do đó cho phép lưu thông lâu dài trong máu.

Kích thước và bề mặt phức hợp nano mixen mang doxorubicin/PEG-mEGCG được mô tả rõ bởi máy phân tích tán xạ ánh sáng động (DLS). Hình 7 đề cập đến sơ đồ biểu thị kích thước (sơ đồ A) và tiềm năng zeta của phức hợp nano mixen doxorubicin/PEG-mEGCG (sơ đồ B).

Hình 7A cho thấy đường kính thủy động lực học của phức hợp nano mixen được điều chế ở nhiều tỷ lệ khối lượng PEG-mEGCG với doxorubicin khác nhau. Đáng chú ý, phức hợp nano được sản xuất với kích thước trong phạm vi 130-180 nm. Với kích thước nhỏ như vậy rất thuận lợi trong việc lưu thông kéo dài trong máu và nhắm vào các khối u mục tiêu thông qua tính thẩm thấu nhanh và khả năng duy trì (EPR). Phức hợp nano mixen được tạo thành ở tỷ lệ khối lượng PEG-mEGCG:doxorubicin là 0,5:1 có đường kính lớn hơn so với tỷ lệ 1:1. Với khả năng kết hợp trong lượng lớn doxorubicin có thể tạo thành lượng phức hợp nano mixen lớn hơn. Phức hợp nano có khả năng chứa lượng lớn các hạt cùng kích cỡ, được thể hiện rõ rệt từ giá trị nhỏ của chỉ số polydispersity (PDI) thuộc phạm vi từ 0,1-0,2.

Như được thể hiện trong Hình 7B, phức hợp nano mixen có tiềm năng zeta tích cực trong khoảng +15 – 25 mV. Bề mặt điện tích ion dương hình thành từ việc kết bọc các phân tử tích điện dương doxorubicin trong phức hợp nano. Chúng tôi cũng đã ước lượng liệu phức hợp nano mixen có thể duy trì toàn vẹn cấu trúc trong suốt quá trình cấp đông khô hay không. Cấp đông khô là một trong những công nghệ phổ biến sử dụng để lưu trữ lâu dài các hạt nano đã kết dính với nhau. Phức hợp nano được cấp đông khô và sau đó lại phân tán trong nước khử ion ở cùng nồng độ. Phức hợp nano hoàn nguyên được tìm thấy để duy trì kích thước hạt và điện tích bề mặt như ban đầu thậm chí không cần dùng bất kỳ tá dược ổn định nào. Với độ kết dính ổn định cao sẽ có lợi thế hơn trong việc chuyển đổi lâm sàng và thương mại hóa các phức hợp nano mixen.

Hình 8 cho thấy hiệu quả dẫn thuốc và lượng thuốc được hấp thụ của phức hợp nano mixen doxorubicin/PEG-mEGCG. Hiệu quả dẫn thuốc cao hơn 75%, cho thấy doxorubicin đã được kết hợp một cách hiệu quả trong phức hợp nano PEG-mEGCG. Khi tỉ lệ khối lượng PEG-mEGCG:doxorubicin giảm, hai chỉ số hiệu quả dẫn thuốc và lượng thuốc được hấp thụ đều tăng. Quan sát lượng thuốc được hấp thụ (30-50% trọng lượng) ta thấy cao hơn đáng kể so với lượng thuốc được hấp thụ khi sử dụng hệ thống polyme khác. Các liên kết π - π và/hoặc các tương tác kỵ nước giữa EGCG với doxorubicin đã đóng vai trò quan trọng trong việc làm tăng lượng thuốc được hấp thụ của phức hợp nano mixen PEG-mEGCG.

Nghiên cứu về quá trình giải phóng doxorubicin

Trong các thí nghiệm về quá trình giải phóng thuốc, 0,5 mL phức hợp nano chứa doxorubicin (2mg mL^{-1}) được đặt trong các ống thẩm tách với MWCO là 2000 Da. Các ống nghiệm được ngâm trong 25ml PBS trong một máy áp rung lắc tại nhiệt độ 37°C . Đến một

thời điểm nhất định, thu được 1 mL dung môi, sau đó được thay thế bằng một khối lượng PBS mới tương đương. Lượng doxorubicin được đưa vào dung môi được xác định bằng cách đo bức xạ của doxorubicin trong máy quang phổ Hitachi U-2810 (Nhật Bản).

Quá trình giải phóng thuốc phức hợp nano mixen chứa doxorubicin/PEG-mEGCG cũng được nghiên cứu ở nhiệt độ sinh lý và độ pH. Như thể hiện trong Hình 9, phức hợp nano mixen được thể hiện như một sự giải phóng liên tục của doxorubicin trong PBS. Khoảng 11% lượng doxorubicin hấp thụ được giải phóng trong 7 ngày. Tỷ lệ giải phóng thuốc quan sát được thấp hơn đáng kể so với các hệ thống hấp thụ doxorubicin khác đã được báo cáo trước đây. Việc giải phóng thuốc liên tục này là do sự tương tác mạnh mẽ giữa EGCG và doxorubicin trong phức hợp nano mixen. Ngoài ra, chỉ có một sự giải phóng bị vỡ được quan sát thấy tại giai đoạn đầu, cho thấy rằng các phân tử doxorubicin đã được bọc ổn định trong phức hợp nano mixen. Sự rò rỉ thuốc thấp sẽ rất cần thiết để đảm bảo hiệu quả điều trị tối đa với ít tác dụng phụ, khi các phân tử thuốc được bọc trong các phức hợp nano sẽ không bị rò rỉ sớm trong quá trình lưu thông trong máu. Tóm lại, các kết quả đã chứng minh rằng phức hợp nano mixen PEG-mEGCG có thể được áp dụng vào hệ thống phân phối thuốc doxorubicin trong điều trị ung thư.

Ví dụ 4: Các chất liên hợp SU/PEG-EGCG

Sự tạo thành phức hợp nano mixen SU/PEG-EGCG

Hình 10 minh họa sự hình thành các chất liên hợp SU/PEG-EGCG sử dụng phương pháp phân tán chất rắn. Tóm lại, 2 mg SU (1006) được hòa tan trong 1 mL chloroform. Sau đó dung dịch SU được thêm vào chất liên hợp PEG-EGCG (hoặc PEG-mEGCG (1002) hoặc PEG-dEGCG (1004)) trong lọ thủy tinh với tỷ lệ khối lượng PEG-EGCG:SU khác nhau (1008) và khuấy đều. Sau đó chloroform của dung dịch được cho bốc hơi ở áp suất thấp (1010). Kết quả là các màng mỏng của hỗn hợp PEG-EGCG và SU (1012) được ngâm nước bằng cách thêm 2 mL nước vào bề mặt (1014), và ủ ở nhiệt độ thường trong 24h. Kết quả là sau khi tấm màng rắn được ngâm nước, PEG-EGCG tự kết hợp lại để tạo thành phức hợp nano mixen do sự cô lập SU và các gốc EGCG từ các chuỗi PEG ngâm nước. Dung dịch phức hợp nano mixen SU/PEG-EGCG sau đó được lọc (1016) qua máy lọc 0,8- μm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Đức) để loại bỏ thuốc dư thừa và thu được dung dịch phức hợp nano mixen SU/PEG-EGCG trong suốt (1018). Đối với các nghiên cứu trong cơ thể, dung dịch phức hợp nano mixen SU/PEG-EGCG tiếp tục được lọc qua máy lọc 0.2- μm filter (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Đức).

Cần lưu ý rằng chất liên hợp PEG-EGCG có thể sử dụng cả PEG-mEGCG và PEG-dEGCG trừ khi được xác định chính xác.

Từ khi EGCG có cấu trúc polyphenol có khả năng tương tác với SU qua tương tác kỵ nước và liên kết π - π , chúng được dự đoán rằng lượng EGCG dồi dào trong lõi của phức hợp nano mixen sẽ cung cấp một môi trường thuận lợi cho phương pháp bẫy SU. Ngoài ra, bề mặt tiếp xúc của các chuỗi PEG sẽ tạo thành một lớp vỏ có tính ngậm nước cao xung quanh phức hợp nano mixen để tránh bị RES xóa bỏ, do đó cho phép lưu thông kéo dài trong máu và giảm tác dụng phụ.

Đặc tính của phức hợp nano mixen SU/PEG-mEGCG

Đường kính thủy động lực học, sự phân bố kích thước và điện tích bề mặt của phức hợp nano mixen SU/PEG-mEGCG được đo bởi máy phân tích tán xạ ánh sáng động (DLS) (Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK). Các phép đo được tiến hành trên 3 mẫu giống nhau trong nước ở nhiệt độ 25°C. Hình 11A cho thấy đường kính thủy động lực học của phức hợp nano mixen được điều chế ở tỷ lệ khối lượng PEG-EGCG:SU khác nhau. Đáng chú ý, phức hợp nano mixen được tạo ra có kích thước trong khoảng từ 130-250 nm. Kích thước nanomet sẽ thuận lợi trong việc kéo dài tuần hoàn và trong các khối u mục tiêu thông qua hiệu ứng EPR. Các đặc tính của phức hợp nano mixen được kiểm soát bằng cách thay đổi tỷ lệ khối lượng PEG-EGCG:SU. Hình 11B cho thấy phức hợp nano mixen được tạo thành ở tỷ lệ khối lượng PEG-EGCG:SU là 8 và 16 là các hạt có cùng kích cỡ. Phức hợp nano mixen giảm dần điện tích dương khi tỷ lệ khối lượng PEG-EGCG:SU tăng (Hình 11C). Điện tích dương trên bề mặt của chúng hình thành là do quá trình bao nang các phân tử điện tích dương SU.

Để đo lường hiệu quả dẫn thuốc và lượng thuốc được hấp thụ, cứ 10 μ L phức hợp nano mixen trong nước được hòa tan trong 990 μ L DMF, và độ hấp thụ của SU được đo ở 431 nm sử dụng máy Hitachi U-2810 đo quang phổ tia cực tím có thể nhìn thấy (UV-Vis) (Nhật Bản). Đồ thị điều chỉnh thu được cùng với dung dịch SU tiêu chuẩn được sử dụng để xác định hiệu quả dẫn thuốc và lượng thuốc được hấp thụ.

Hình 12 cho thấy hiệu quả dẫn thuốc và lượng thuốc được hấp thụ của phức hợp nano mixen SU/PEG-EGCG. Khi tỉ lệ khối lượng PEG-EGCG:SU tăng từ 1 đến 16, hiệu quả dẫn thuốc cũng tăng từ ~30% đến ~80%. Hiệu quả dẫn thuốc của phức hợp nano mixen SU/PEG-dEGCG cao hơn phức hợp nano mixen SU/PEG-mEGCG, cho thấy sự tương tác của SU với PEG-dEGCG lớn hơn so với PEG-mEGCG. Nó cũng chỉ ra rằng hiệu quả dẫn thuốc của phức hợp nano mixen có liên quan đến lượng SU bị kết tủa trước khi lọc. Khi tỉ lệ khối lượng PEG-EGCG:SU tăng lên 8, SU không bị kết tủa. Theo dự kiến, lượng phức hợp nano mixen được hấp thụ giảm khi tỉ lệ khối lượng PEG-EGCG:SU tăng do hàm lượng PEG-EGCG trong phức hợp nano mixen cao.

Nghiên cứu quá trình giải phóng SU

Quá trình giải phóng thuốc của phức hợp nano mixen SU/PEG-EGCG cũng được nghiên cứu dưới điều kiện sinh lý (dung dịch muối đệm phosphat (PBS), độ pH 7,3 ở nhiệt độ 37°C). Trong các thí nghiệm giải phóng SU, 0,5 mL phức hợp nano mixen SU/PEG-EGCG (0,4 mg mL⁻¹) được đặt trong ống thẩm tách (MWCO = 2000 Da). Các ống nghiệm được ngâm trong 25 mL dung dịch PBS trong máy ủ rung lắc ở 37°C. Tại thời điểm nhất định, 1 mL dung môi tạo ra được thu lại và sau đó thay thế bằng một khối lượng PBS mới tương đương. Lượng SU được giải phóng trong dung môi được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở 431 nm sử dụng máy quang phổ Hitachi U-2810.

Như thể hiện trong Hình 13, phức hợp nano mixen thể hiện một lượng SU được giải phóng liên tục trong dung dịch PBS, nguyên nhân có thể là do sự tương tác mạnh mẽ giữa EGCG với SU trong phức hợp nano mixen. Ngoài ra, hầu như không có bất kỳ sự giải phóng nào bị vỡ, cho thấy các phân tử SU đã được bọc ổn định trong phức hợp nano mixen. Phức hợp nano mixen SU/PEG-mEGCG cho thấy sự giải phóng SU nhanh và nhiều hơn so với phức hợp nano mixen SU/PEG-dEGCG do sự tương tác yếu giữa SU với các gốc mEGCG. Tỷ lệ giải phóng và lượng giải phóng cũng phụ thuộc vào tỷ lệ khối lượng PEG-EGCG:SU. Đối với phức hợp nano mixen SU/PEGCG-mEGCG, cả tỷ lệ giải phóng và lượng giải phóng đều giảm khi tỷ lệ khối lượng PEG-EGCG:SU tăng. Tỷ lệ khối lượng PEG-EGCG:SU ảnh hưởng không đáng kể đến tỷ lệ giải phóng và lượng giải phóng trong phức hợp nano mixen SU/PEG-dEGCG, ngoại trừ quá trình giải phóng chậm hơn và thấp hơn được kết hợp với một tỷ lệ PEG-EGCG:SU là 8.

Nghiên cứu trị liệu trong cơ thể

Để nghiên cứu độc tính và tác dụng trị liệu, các nghiên cứu trong cơ thể được tiến hành trên phức hợp nano mixen. Một mô hình ung thư biểu mô tế bào thận dưới da được thiết lập. Tuyến giáp chuột bạch cái trưởng thành, khả năng miễn dịch trên da chuột không lông (trọng lượng trung bình = 19g, tuổi = 6-8 tuần) được sử dụng.

Để nghiên cứu hiệu quả điều trị của phức hợp nano mixen SU/PEG-EGCG bằng đường tiêm vào tĩnh mạch, một mô hình khối u cấy ghép được thiết lập bằng cách cấy tế bào 6x106 A498-luc dưới da vào gốc đuôi trái của chuột. Vào ngày thứ 6 sau khi cấy khối u, sẽ chia thành 4 nhóm chuột thí nghiệm để tiêm tĩnh mạch đuôi với lượng khác nhau (n = 8 mỗi nhóm) 2 lần mỗi tuần trong 5 tuần liên tục, trong khi một nhóm nhận lượng SU hằng ngày thông qua đường ống dạ dày là 60mg/kg. Đối với tiêm tĩnh mạch đuôi thì sử dụng 200 µl dung dịch mẫu.

Để theo dõi các tín hiệu phát quang sinh học từ các tế bào A498-luc, khí gây mê đường hô hấp isoflurane được tiêm vào màng bụng cùng với 200 µl D-luciferin (5 mg mL⁻¹, Promega) trong dung dịch PBS, và đặt trên một bề ấm (30°C) bên trong hộp máy ảnh với hệ

thống hình ảnh IVIS (Xenogen, Alameda, CA, Mỹ) cùng với máy ảnh CCD. Hình ảnh huỳnh quang được chụp 20 phút sau khi tiêm luciferin khi đạt 30-s. Ánh sáng phát ra từ các tế bào A498-luc đã được số hóa và hiển thị điện tử như một lớp phủ pseudocolor lên hình ảnh màu xám của con vật. Các hình ảnh và quá trình đo các tín hiệu phát quang đã được thu thập và phân tích trên phần mềm hình ảnh Xenogen v3.2 và được lượng tử hóa như photon/s. Kích thước khối u và trọng lượng cơ thể được đo vào mỗi tuần. Tất cả việc xử lý và chăm sóc chuột thí nghiệm được thực hiện theo hướng dẫn về chăm sóc và sử dụng động vật cho mục đích khoa học của Ủy ban tư vấn về nghiên cứu thí nghiệm trên động vật quốc gia, Singapore.

Tất cả các dữ liệu được biểu thị dưới dạng sai số chuẩn (SEM). Ý nghĩa thống kê về sự khác biệt giữa giá trị trung bình được xác định bằng phương pháp kiểm định t (phương pháp t-student). Phương pháp so sánh nhiều nhóm được đánh giá bằng ANOVA (phân tích phương sai) cùng với phân tích hậu kiểm Bonferroni sử dụng SigmaStat 3.5. Một giá trị $p < 0,05$ có ý nghĩa thống kê.

Phức hợp nano mixen SU/PEG-mEGCG (với tỷ lệ khối lượng PEG-EGCG:SU là 8 và 16) và phức hợp nano mixen SU/PEG-dEGCG (với tỷ lệ khối lượng PEG-EGCG:SU là 8) được lựa chọn để nghiên cứu trong cơ thể trên cơ sở kích thước phức hợp nano mixen, sự phân bố kích thước và diện tích bề mặt. Phức hợp nano mixen SU/PEG-mEGCG tiêm vào tĩnh mạch 2 lần một tuần trong 5 tuần liên tục, và có một nhóm nhận một lượng 60 mg/kg SU hằng ngày thông qua đường ống dạ dày. Thuốc sử dụng bằng đường uống với liều lượng 60 mg/kg mỗi ngày được lựa chọn dựa trên các báo cáo trước đó chứng minh rằng liều lượng SU tiền lâm sàng tối ưu cho hiệu quả kháng khối u ở chuột là 40-80 mg/kg mỗi ngày. Với nghiên cứu của chúng tôi, liều dùng 60 mg/kg mỗi ngày được lựa chọn là một liều kháng u hiệu quả, như các nghiên cứu khác cho rằng một liều < 40 mg/kg mỗi ngày cho hiệu quả ít hơn, và liều dùng 120 mg/kg mỗi ngày sẽ kiểm tra những tác động của hệ thống phân phối thuốc rõ ràng hơn.

Hình 14 cho thấy số cân nặng giảm đáng kể trong nhóm nhận thuốc SU đơn thuần qua đường uống hằng ngày trong 1 tuần sau khi bắt đầu điều trị. Điều này không được quan sát ở các nhóm điều trị khác nhận phức hợp nano mixen SU/PEG-EGCG. Tác dụng chống ung thư được nâng cao khi phức hợp nano mixen SU/PEG-EGCG được tiêm hai lần một tuần, so với việc điều trị SU bằng đường uống (Hình 15). Tác dụng chống ung thư với phức hợp nano mixen SU/PEG-EGCG đã đạt gần 1 phần 10 so với nồng độ của liều uống. Hiệu quả ức chế của phức hợp nano mixen SU/PEG-EGCG được duy trì trong một khoảng thời gian đáng kể, ngay cả khi việc điều trị đã dừng lại sau 5 tuần. Tỷ lệ tái phát triển khối u ở các nhóm điều trị bằng phức hợp nano mixen đã nhanh hơn nhóm điều trị bằng đường uống.

Để điều tra hiệu quả điều trị của phức hợp nano mixen SU/PEG-mEGCG thông qua đường uống, mô hình khối u phế nang được tạo ra bằng cách tiêm 4×10^6 tế bào ACHN vào 100 μ l PBS và 100 μ l Matrigel (BD Bioscience - màng nền từ khối u) dưới da vào gốc đuôi phải của chuột thí nghiệm. Khi các khối u đạt đến khối lượng 200 mm³, chuột thí nghiệm được chia thành 4 nhóm để cho uống các dung dịch khác nhau (n=8 mỗi nhóm) hằng ngày trong 5 tuần: kiểm soát (dung dịch đệm citric pH5), SU/PEG-mEGCG 8:1 (lượng SU là 15mg/kg), lượng SU là 15 và 40mg/kg. Các khối u được đo 2 lần một tuần bằng thước cặp kỹ thuật số, và các khối lượng của khối u (mm³) được tính theo công thức sau: khối lượng = (chiều dài x chiều rộng²)/2 (Hình 16 và 17).

Như đã nêu, liều uống SU 60 mg/kg/ngày là quá độc, liều uống SU đã giảm xuống còn 40 mg/kg/ngày. Liều uống 40 mg/kg/ngày là liều cho hiệu quả tối ưu chống lại ung ở chuột (40-80 mg/kg/ngày) dựa trên các báo cáo trước đó. Hình 16 cho thấy sự giảm cân đáng kể trong nhóm nhận SU ở liều 40 mg/kg/ngày trong quá trình điều trị. Điều này không xảy ra ở nhóm nhận phức hợp nano mixen SU.PEG-mEGCG 8:1 và SU với liều 15 mg/kg. Với cùng liều SU tương tự ở mức 15 mg/kg, phức hợp nano mixen SU/PEG-mEGCG cho thấy hiệu quả điều trị cao hơn đáng kể so với việc chỉ sử dụng mình chất SU (Hình 17). Hiệu quả chống khối u với phức hợp nano mixen SU/PEG-mEGCG đạt được tối thiểu hơn một nửa nồng độ liều uống SU 40 mg/kg. Tác dụng ức chế của phức hợp nano mixen SU/PEG-mEGCG được duy trì trong một khoảng thời gian đáng kể, ngay cả khi ngừng điều trị sau 5 tuần.

Tác động EPR xem xét giải phẫu bệnh lý của u mạch máu làm đơn giản hóa sự vận chuyển của các đại phân tử >40 kDa có chọn lọc thoát ra từ các khối u và tích tụ trong mô khối u. Hầu hết các khối u rắn có kết cấu mạch máu bị lỗi, thường dẫn đến lượng thẩm thấu mạch rất lớn. Điều này không xảy ra trong các mô bình thường. Sáng chế này nêu rõ việc sử dụng phức hợp nano mixen SU/PEG-mEGCG trong cả tiêm tĩnh mạch và đường uống như một liệu pháp khả quan cho ccRCC trong thời gian đầu. Nghiên cứu cho thấy EGCG tương tác với SU, và các nghiên cứu được động học ở chuột cho thấy dùng EGCG sẽ làm giảm nồng độ SU trong huyết tương. Báo cáo về sự tương tác của trà xanh với SU và tác động EPR của phức hợp nano mixen đối với các khối u khác nhau cho thấy khả năng sử dụng PEG-EGCG như một hạt mang hạt nano để cung cấp SU. Trong u não, khối u có khả năng tạo mạch cao, liệu pháp chống quá trình tạo mạch máu cho thấy hiệu quả cao nhưng chỉ trong thời gian rất ngắn. Như vậy, khối u sẽ kích thích sự hình thành các mạch máu mới thông qua các quá trình chủ yếu do VEGF (quá trình tăng sinh mạch máu), nhưng mạch máu tạo ra có cấu trúc và chức năng bất thường. Việc sử dụng phức hợp nano mixen SU/PEG-EGCG có thể có khả năng tăng cường hoạt động chống tăng sinh mạch máu trong những trường hợp đó.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Phức hợp nano mixen có thể được áp dụng để sử dụng trong quản lý hệ thống doxorubicin trong điều trị ung thư.

Phức hợp nano mixen được sử dụng như một phương tiện mang hạt nano cho quá trình phân phối SU. Trong bệnh u nguyên bào thần kinh đệm, một khối u trong máu, việc điều trị chống tạo mạch đã cho thấy hiệu quả tương đối cao nhưng hiệu quả chỉ trong thời gian ngắn. Khối u kích thích sự hình thành các mạch máu mới thông qua các quá trình mà chủ yếu là do VEGF, nhưng các mạch dẫn mới có cấu trúc và chức năng dị thường. Việc sử dụng phức hợp nano mixen chứa SU sẽ có khả năng tăng cường hoạt động chống tạo mạch trong trường hợp này.

Phức hợp nano mixen được sử dụng để duy trì phát hành các chất điều trị khi dùng hệ thống phân phối thuốc, hay như một hệ thống phân phối các chất điều trị đến vùng mục tiêu.

Phức hợp nano mixen được sử dụng để bọc các chất điều trị với nhiều loại khác nhau phục vụ cho việc điều trị ung thư.

Phức hợp nano mixen được sử dụng để bọc các chất điều trị khác nhau cho mục đích điều trị các bệnh không phải ung thư, bao gồm các phân tử kháng sinh nhỏ và các ứng dụng y tế khác.

Sẽ có nhiều thay đổi và điều chỉnh trong sáng chế sẽ xuất hiện với những người có kiến thức trong lĩnh vực này sau khi đọc những vấn đề nêu trên mà không dựa vào cốt lõi và phạm vi của sáng chế, những thay đổi và điều chỉnh sẽ xuất hiện cùng với phạm vi của các yêu cầu bảo hộ dưới đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phức hợp nano mixen chứa mixen và dược chất được bọc trong mixen này, mixen này chứa chất liên hợp polyme-flavonoit, trong đó polyme này là polyme ưa nước được liên kết với vòng B của flavonoit.

2. Phức hợp nano mixen theo điểm 1, trong đó polyme này được gắn vào flavonoit qua một liên kết, trong đó liên kết này được lựa chọn từ nhóm bao gồm thioete, imin, amin, azo và nhóm 1,2,3-triazol.

3. Phức hợp nano mixen theo điểm 1 hoặc 2, trong đó flavonoit này là một flavonoit monome hoặc flavonoit dime.

4. Phức hợp nano mixen theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó polyme ưa nước này chứa các monome được lựa chọn từ nhóm bao gồm acrylamit, alkyl, oxazolin, alkenyl, imin, axit acrylic, metacrylat, diol, oxiran, rượu, amin, anhydrit, este, lacton, cacbonat, axit carboxylic, acrylat, hydroxyl, phosphat, terephthalat, amit và ete.

5. Phức hợp nano mixen theo điểm 4, trong đó polyme ưa nước được chọn từ nhóm gồm polyacrylamit, poly(N-isopropylacrylamit), poly(oxazolin), polyetylenimin, poly(axit acrylic), polymetacrylat, poly(etylen glycol), poly(etylen oxit), poly(vinyl alcohol), poly(vinylpyrrolidinon), polyete, poly(allylamin), polyanhydrit, poly(β -amino este), poly(butylen succinat), polycaprolacton, polycacbonat, polydioxanon, poly(glyxerol), axit polyglycolic, poly(axit 3-hydroxypropionic), poly(2-hydroxyetyl metacrylat), poly(N- (2-hydroxypropyl)metacrylamit), axit polylactic, poly(axit lactic-co-glycolic), poly(ortho este), poly(2-oxazolin), poly(axit sebacic), poly(terephthalat-co-phosphat) polysacarit và copolyme của chúng.

6. Phức hợp nano mixen theo điểm 5, trong đó polyme ưa nước này là polysacarit được chọn từ nhóm bao gồm axit hyaluronic, dextran, pullulan, chitosan, xenluloza, amyloza, tinh bột, gelatin, carrageenan, cyclodextrin, dextran sulfat, ficoll, gellan, gồm guar, pectin, polysucroza, scleroglucan, xanthan, xyloglucan và alginat.

7. Phức hợp nano mixen theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó flavonoit này được chọn từ nhóm bao gồm flavon, isoflavon, flavan, proanthoxyanidin và anthoxyanidin.

8. Phức hợp nano mixen theo điểm 7, trong đó flavan được chọn từ nhóm bao gồm (-) - epicatechin, (+) - epicatechin, (-) - catechin, (+) - catechin, epicatechin galat, epigallocatechin, epigallocatechin galat, fisetinidol, gallocatechin, gallocatechin galat, mesquitol và robinetinidol, ellagitannin, gallotannin, oolongtheanin, phlorotannin, tannin,

theacitrin, theadibenzotropolon, theaflavin, theanaphthoquinon, thearubigin, theasinensin và hỗn hợp của chúng.

9. Phức hợp nano mixen theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó được chất này là chất dùng để trị liệu.

10. Phức hợp nano mixen theo điểm 9, trong đó chất dùng để trị liệu là tác nhân hóa trị liệu được chọn từ nhóm bao gồm các chất alkyl hóa, antraxyclin, chất phá vỡ bộ khung tế bào, epothilon, chất ức chế histon deacetylaza, chất ức chế topoisomeraza I, chất ức chế topoisomeraza II, chất ức chế kinaza, kháng thể đơn dòng, thể liên hợp kháng thể thuốc, các chất tương tự nucleotit, các chất tương tự tiền chất, chất kháng sinh peptit, các chất trên cơ sở bạch kim, retinoit, vinca alkaloit, cytokin, các chất chống chuyển hóa, các chất dẫn xuất của vinca alkaloit, và các chất gây độc tế bào khác.

11. Phức hợp nano mixen theo điểm 10, trong đó tác nhân hóa trị liệu được chọn từ nhóm bao gồm actinomycin, afatinib, axit all-trans retinoic, axitinib, azacitidin, azathioprin, bevacizumab, bleomycin, bosutinib, bortezomib, carboplatin, capecitabin, cetuximab, cisplatin, chlorambucil, crizotinib, cyclophosphamid, cytarabin, dasatinib, daunorubicin, docetaxel, doxorubicin, epirubicin, epothilon A ($C_{26}H_{39}NO_6S$), epothilon B ($C_{27}H_{41}NO_6S$), epothilon C ($C_{26}H_{39}NO_5S$), epothilon D ($C_{27}H_{41}NO_5S$), epothilon E ($C_{26}H_{39}NO_7S$), epothilon F ($C_{27}H_{41}NO_7S$), erlotinib, etoposid, fluorouracil, fostamatinib, gefitinib, gemcitabin, hydroxyurea, idarubicin, imatinib, irinotecan, lapatinib, lenvatinib, mechlorethamin, mercaptopurin, methotrexat, mitoxantron, nilotinib, oxaliplatin, paclitaxel, panitumumab, pazopanib, pegaptanib, pemetrexed, ranibizumab, regorafenib, ruxolitinib, sorafenib, sunitinib, trastuzumab, teniposid, tioguanin, tofacitinib, topotecan, valrubicin, vemurafenib, vinblastin, vincristin, vindesin, vinorelbin.

12. Phức hợp nano mixen theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phức hợp nano mixen này có kích thước khoảng từ 30 đến 300nm, 50 đến 300 nm, 100 đến 300 nm, 30-50 nm, 30-100 nm, 30 đến 150 nm, 150 đến 300 nm, 200 đến 300 nm, 250 đến 300 nm, 100 nm đến 150, 100 đến 200 nm, 100 đến 250 nm, 130-180 nm, hoặc 130-250 nm được đo bằng máy phân tích tán xạ ánh sáng động (DLS).

13. Phức hợp nano mixen theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó tải lượng của dược chất nêu trên trong mixen trên nằm trong khoảng từ 1 đến 10% trọng lượng, 5 đến 25 % trọng lượng, 20 đến 45 % trọng lượng, 30 đến 50 % trọng lượng, 35 đến 50 % trọng lượng, 40 đến 50 % trọng lượng, 45 đến 50 % trọng lượng, 30 đến 35 % trọng lượng, 30 đến 40 % trọng lượng hoặc 30 đến 45 % trọng lượng dựa trên tổng trọng lượng của phức hợp nano mixen.

14. Phức hợp nano mixen theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phức hợp nano mixen này chứa mixen và dược chất được bọc trong mixen như một phương tiện phân phối thuốc, trong đó mixen này chứa chất liên hợp polyme-flavonoit, và trong đó polyme này là polyme ưa nước được liên kết với vòng B của flavonoit nêu trên.

15. Phương pháp tạo thành phức hợp nano mixen chứa mixen và dược chất được bọc trong mixen, phương pháp này bao gồm các bước như sau:

a. thêm dược chất nêu trên trong dung môi thích hợp vào chất liên hợp polyme-flavonoit, trong đó polyme này là polyme ưa nước được liên kết với vòng B của flavonoit này; và

b. cho phép quá trình tự ghép nối của mixen chứa chất liên hợp polyme-flavonoit nêu trên và sự bao nang của dược chất này trong mixen để từ đó tạo thành phức hợp nano mixen.

16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó bước (a) còn bao gồm các bước sau:

a. loại bỏ dung môi để tạo thành lớp màng khô của dược chất nêu trên và chất liên hợp polyme-flavonoit; và

b. hydrat hóa lớp màng khô trên bằng dung môi chứa nước.

17. Chất liên hợp polyme-flavonoit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, trong đó chất liên hợp này chứa polyme gắn với vòng B của flavonoit, trong đó polyme này là polyme ưa nước.

18. Chất liên hợp polyme-flavonoit theo điểm 17, trong đó polyme được lựa chọn từ nhóm bao gồm polysacarit, polyacrylamit, poly(N-isopropylacrylamit), poly(oxazolin), polyetylenimin, poly(axit acrylic), polymetacrylat, poly(etylen glycol), poly(etylen oxit), poly(vinyl alcohol), poly(vinylpyrrolidinon), polyete, poly(allylamin), polyanhydrit, poly(β -amino este), poly(butylen succinat), polycaprolacton, polycarbonat, polydioxanon, poly(glyxerol), axit polyglycolic, poly(axit 3-hydroxypropionic), poly(2-hydroxyetyl metacrylat), poly(N-(2-hydroxypropyl) metacrylamit), axit polylactic, poly(axit lactic-co-glycolic), poly(ortho este), poly(2-oxazolin), poly(axit sebacic), poly(terephthalat-co-phosphat) và copolyme của chúng.

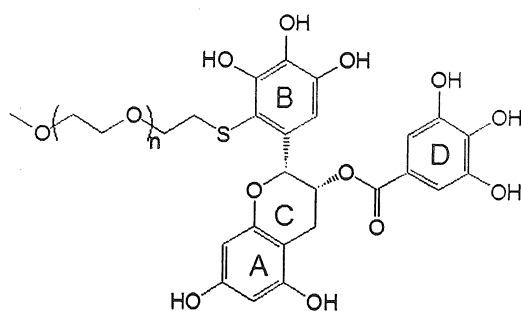
19. Chất liên hợp polyme-flavonoit theo điểm bất kỳ điểm trong số các điểm 17 hoặc 18, trong đó flavonoit được lựa chọn từ nhóm bao gồm (-)-epicatechin, (+)-epicatechin, (-)-catechin, (+)-catechin, epicatechin galat, epigallocatechin, epigallocatechin galat, epigallocatechin-3-galat, fisetinidol, gallocatechin, gallocatechin galat, mesquitol and robinetinidol, ellagitannin, gallotannin, oolongtheanin, phlorotannin, tannin, theacitrin,

theadibenzotropolon, theaflavin, theanaphthoquinon, thearubigin, theasinensin và hỗn hợp của chúng.

20. Chất liên hợp polyme-flavonoit theo điểm bất kỳ trong số các điểm 17 đến 19, trong đó polyme liên hợp với flavonoit thông qua một liên kết được lựa chọn từ nhóm bao gồm thioete, imin, amin, azo và nhóm 1,2,3-triazol.

21. Chất liên hợp polyme-flavonoit theo điểm 17, trong đó chất này có công thức như sau:

công thức 2

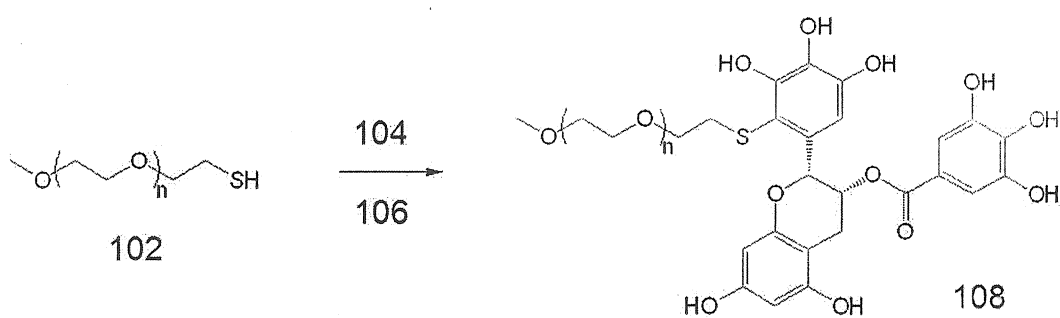


trong đó n nằm trong khoảng từ 20 đến 910.

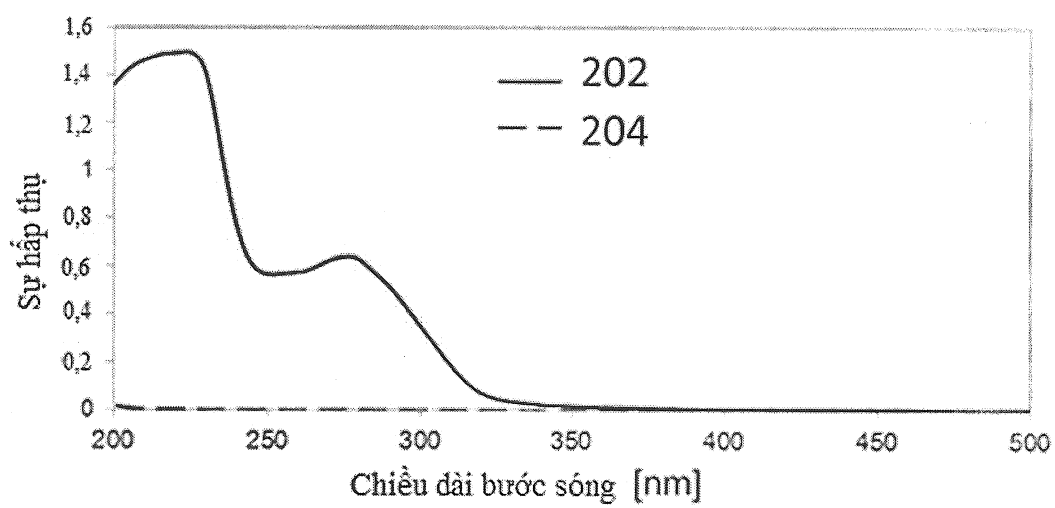
22. Phương pháp tạo thành chất liên hợp polyme-flavonoit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 21 bao gồm bước liên kết flavonoit với polyme nêu trên thông qua phản ứng cộng ái nhân trong môi trường bazơ, trong đó polyme có một nhóm ái nhân tự do.

23. Phương pháp theo điểm 22, trong đó nhóm ái nhân được chọn từ nhóm bao gồm thiol, amin, diazoalkan và azit.

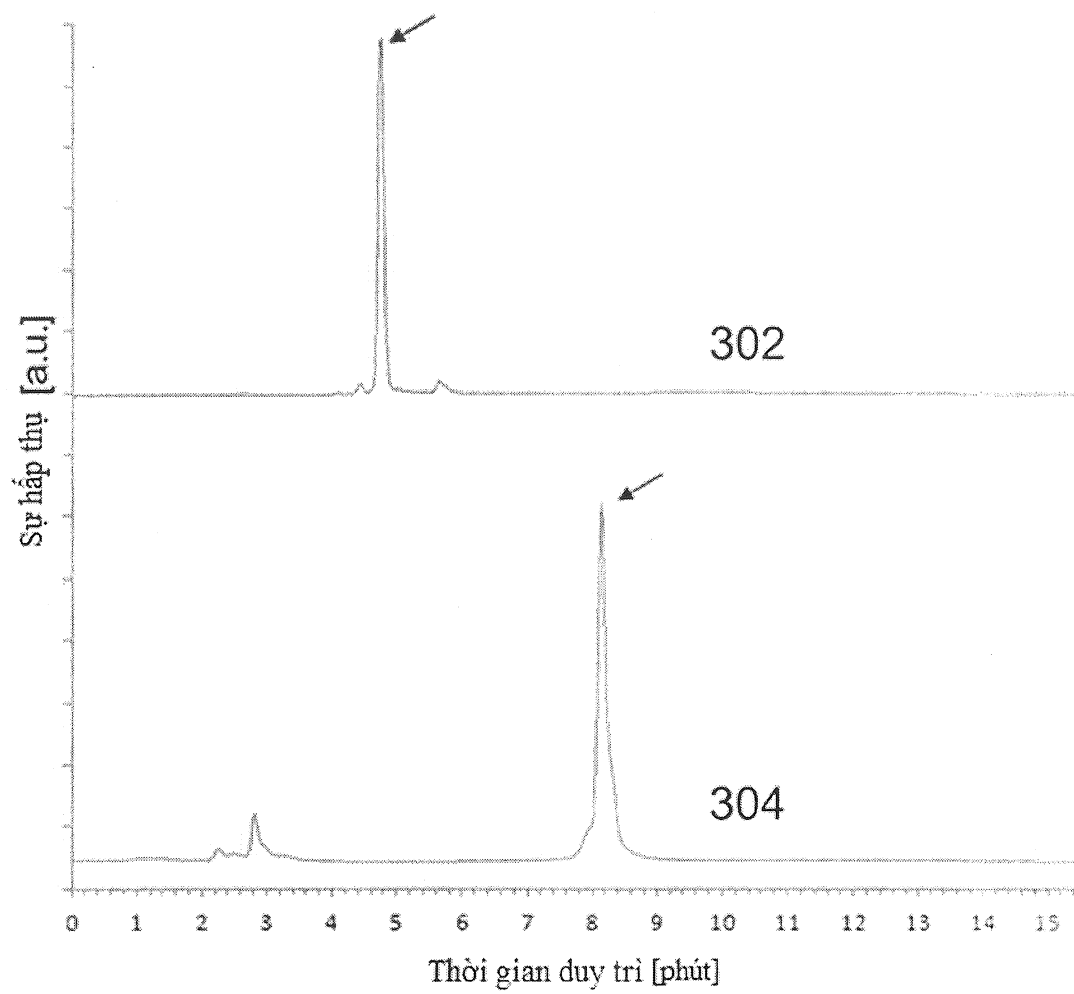
Hình 1



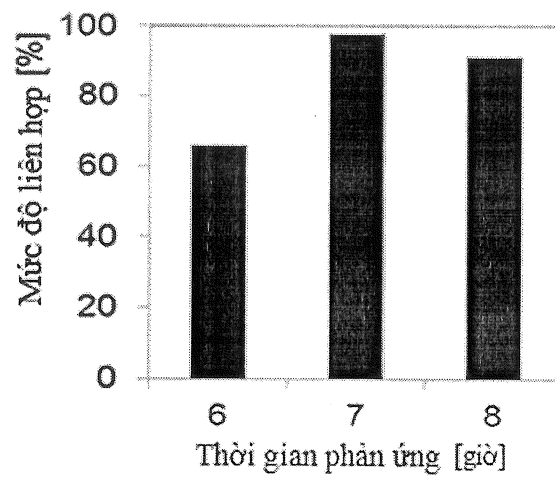
Hình 2



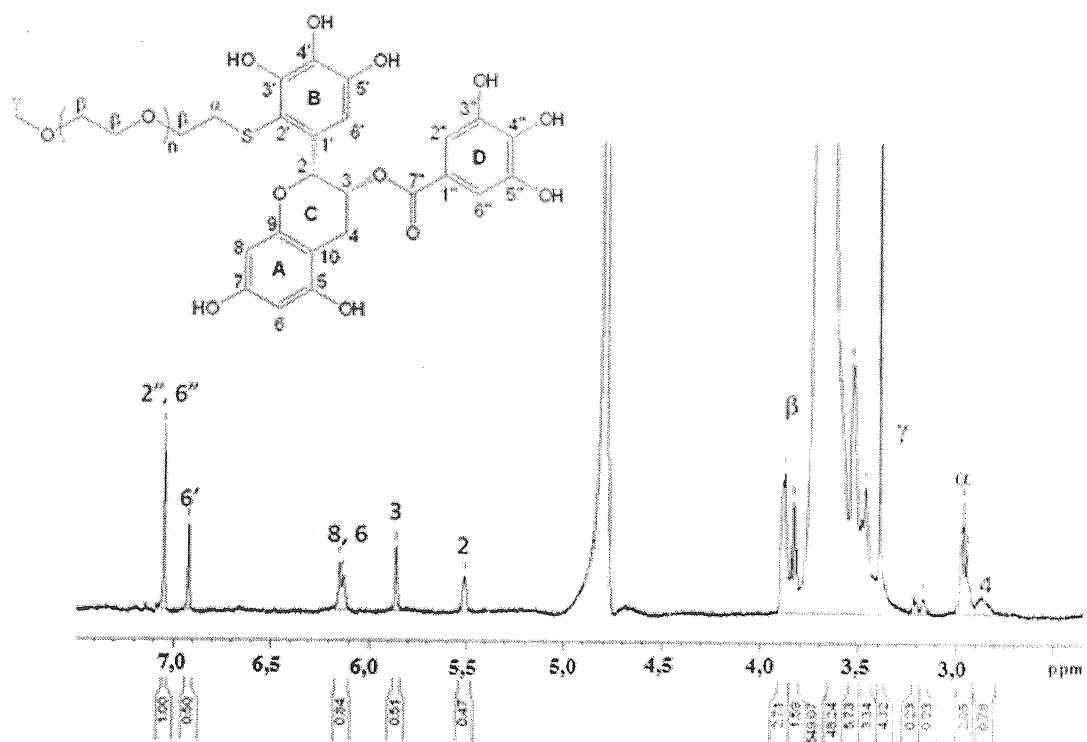
Hình 3



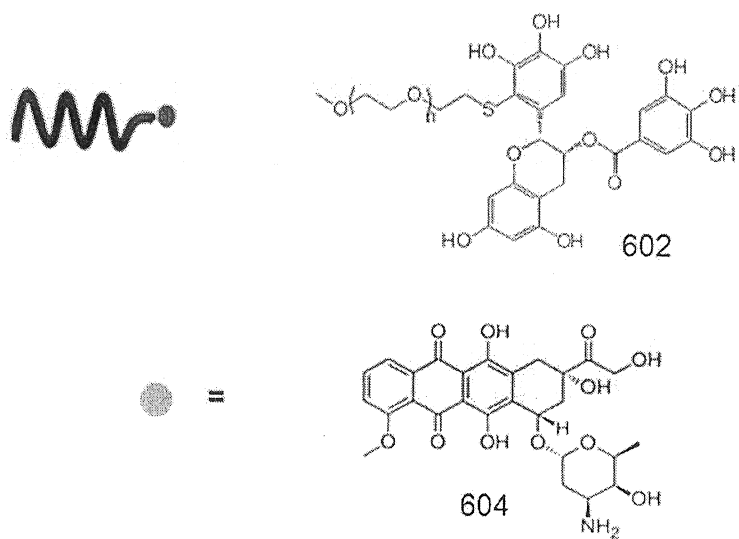
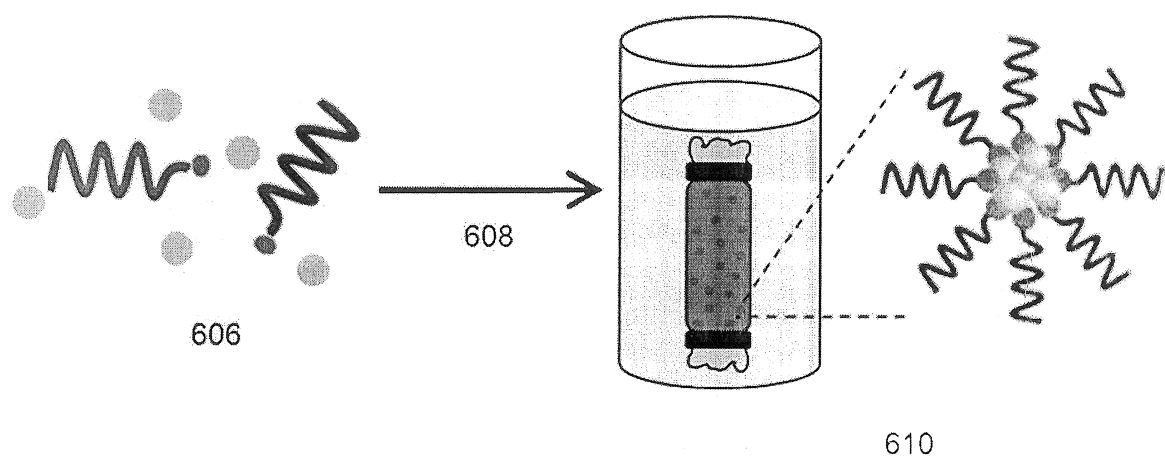
Hình 4



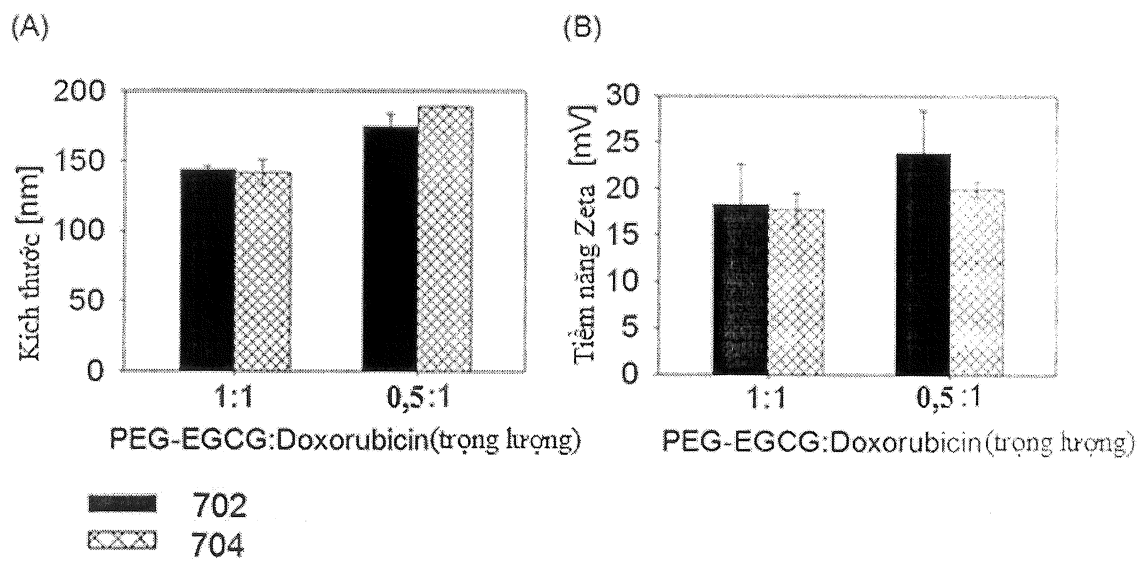
Hình 5



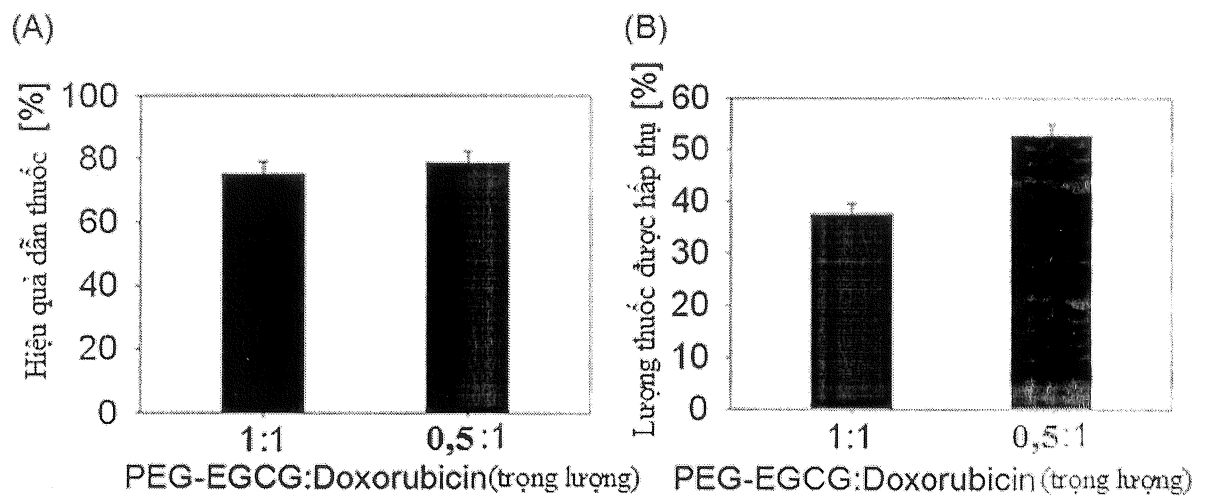
Hình 6



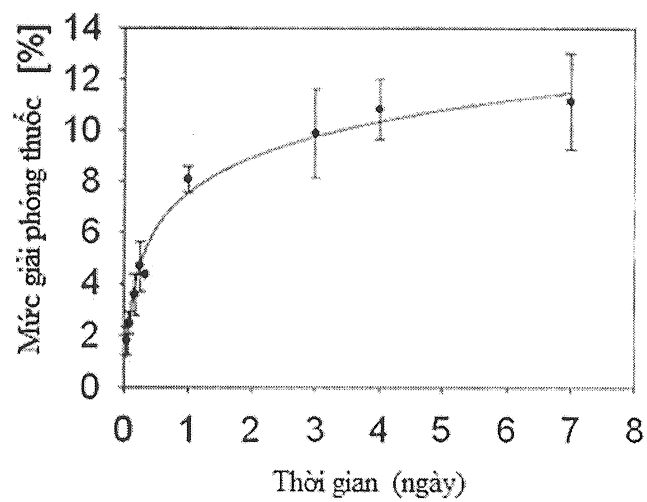
Hình 7



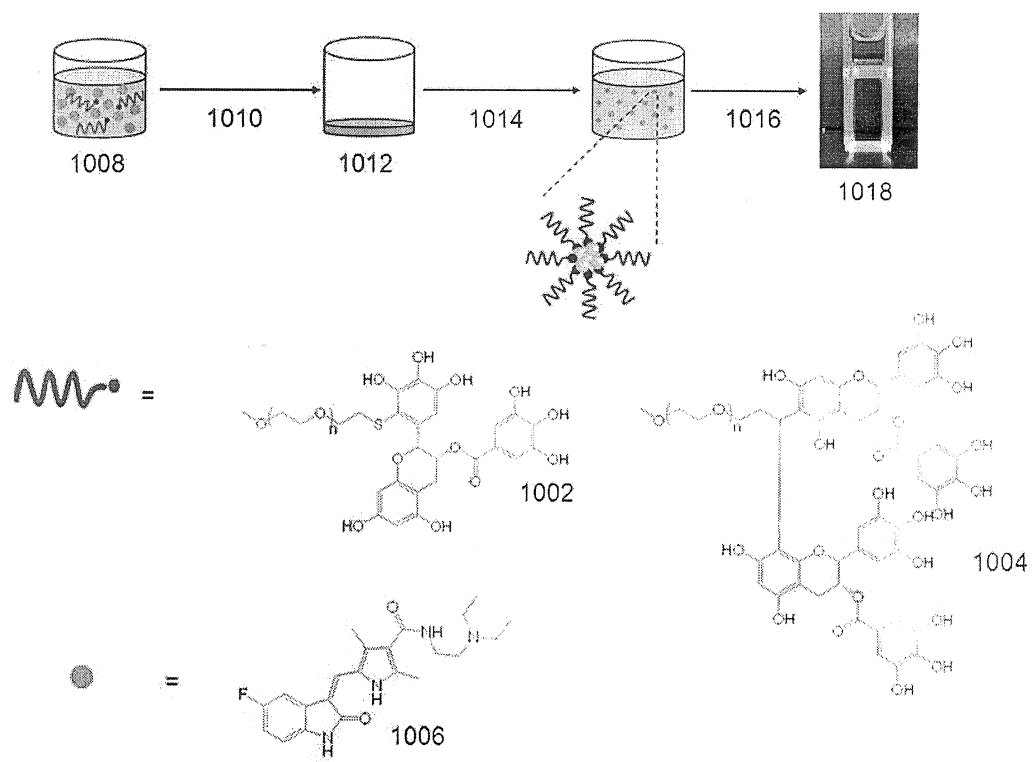
Hình 8



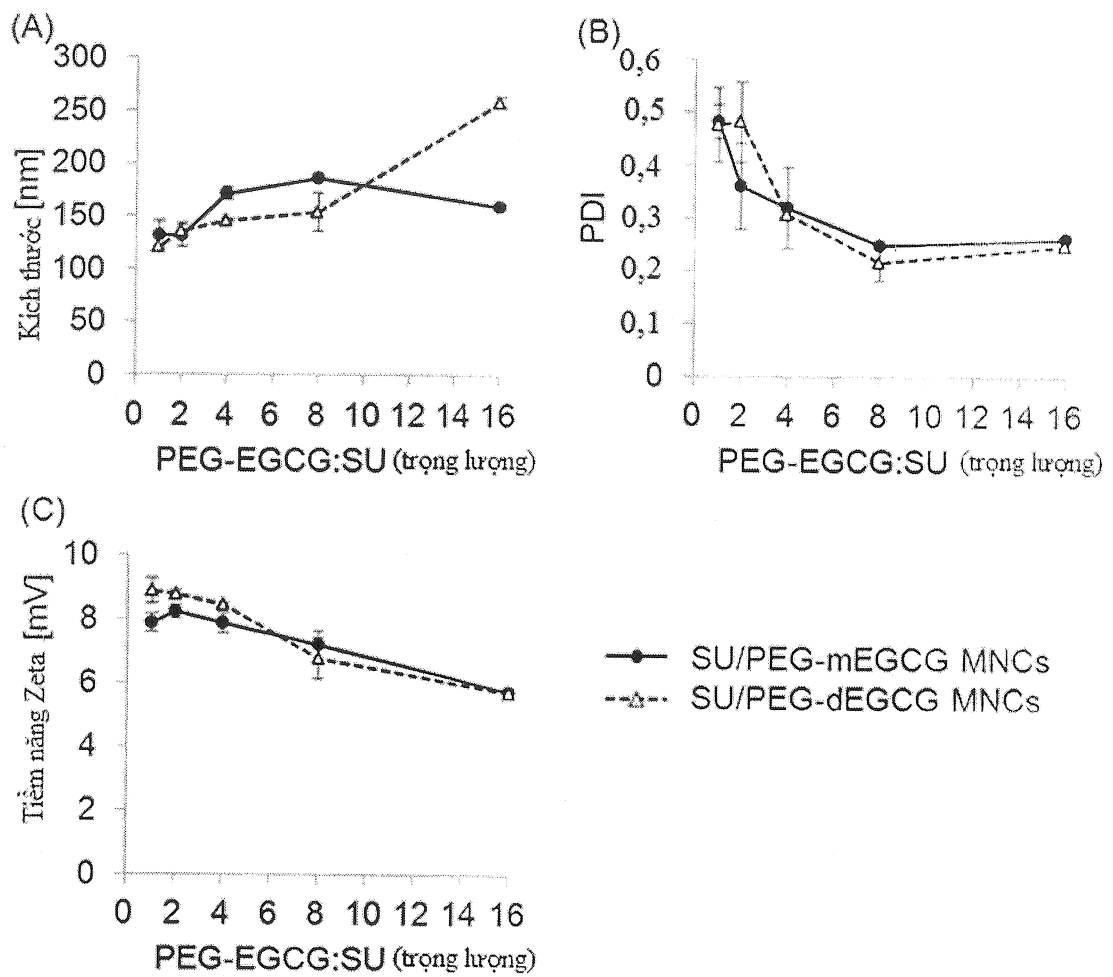
Hình 9



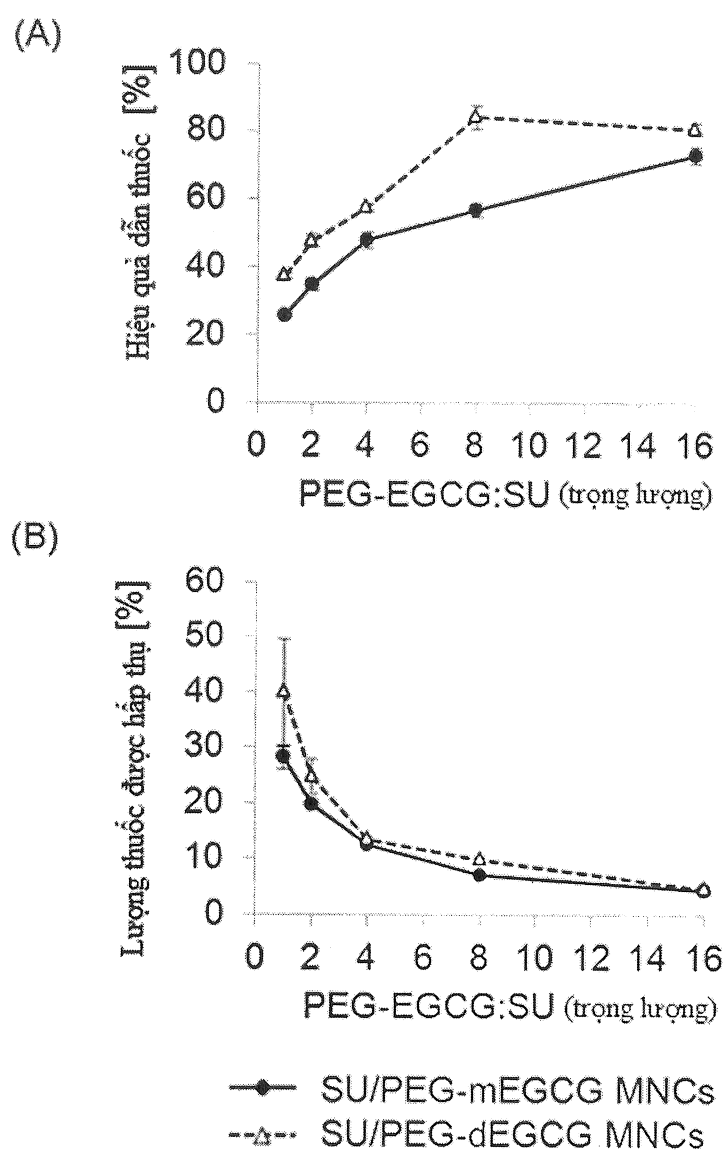
Hình 10



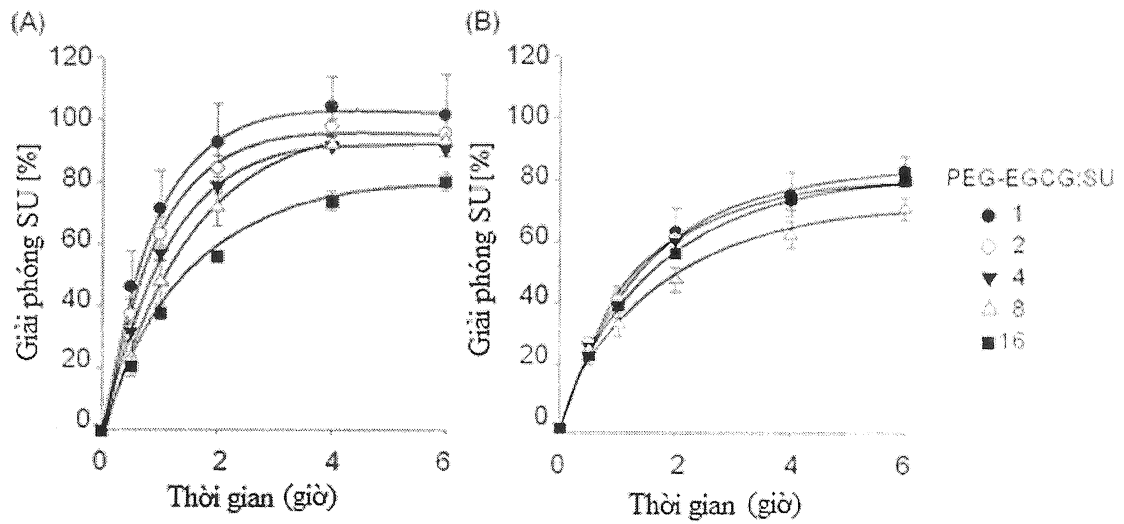
Hình 11



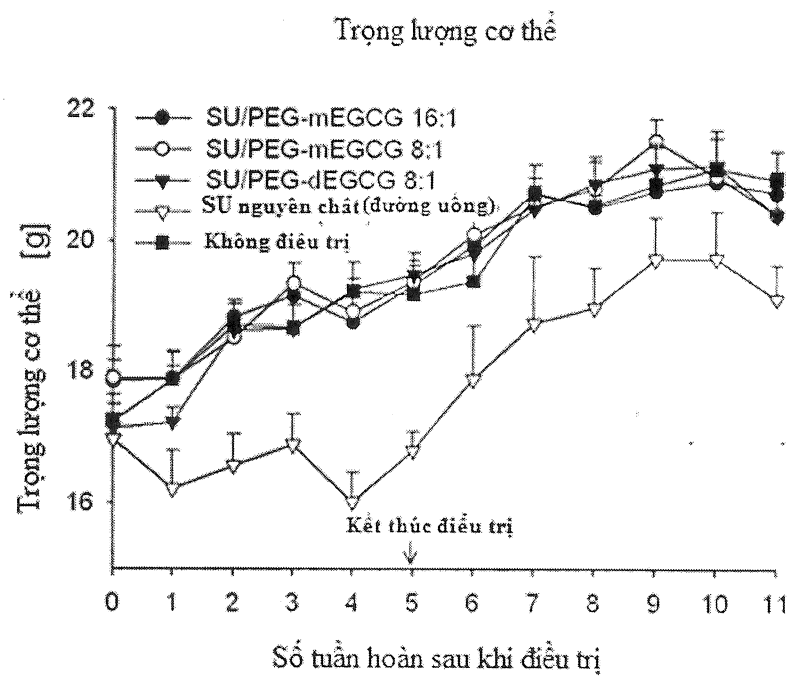
Hình 12



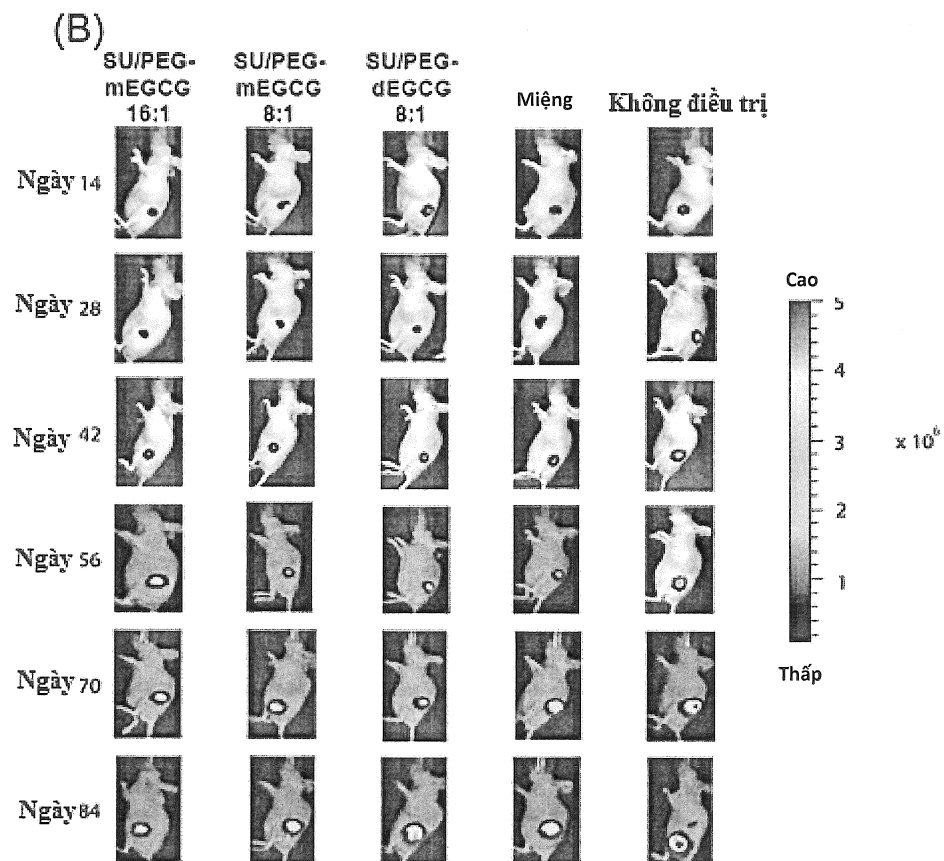
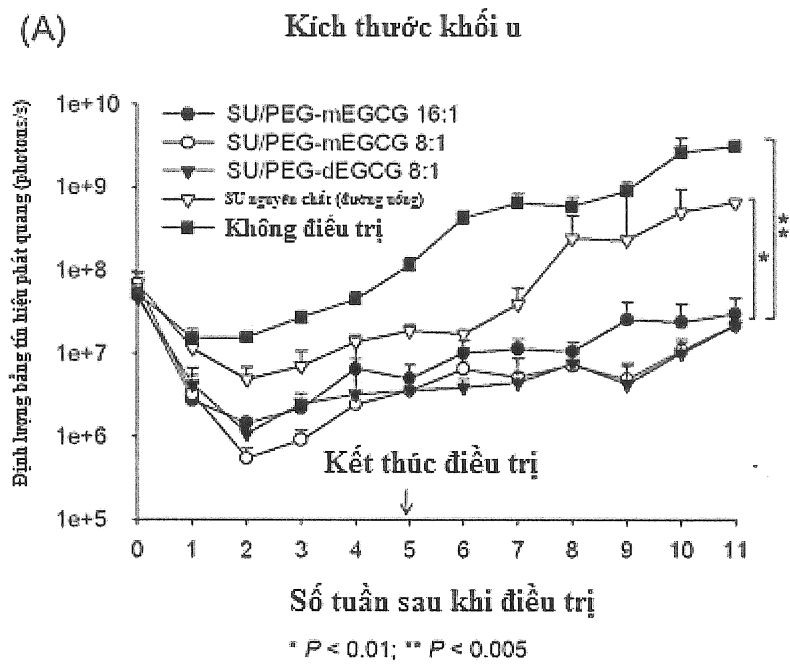
Hình 13



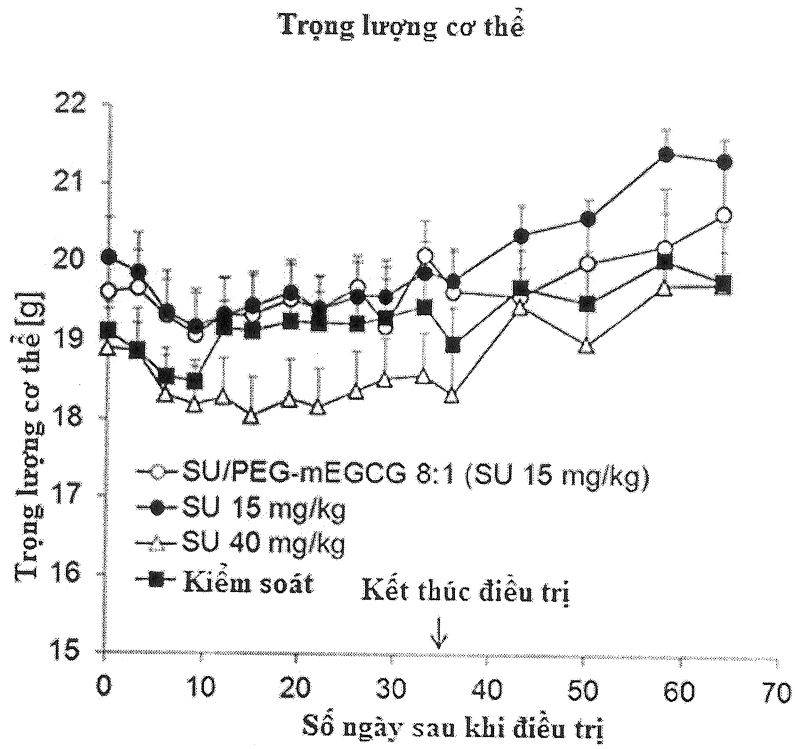
Hình 14



Hình 15



Hình 16



Hình 17

