



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0002936

(51)⁷ **A61K 33/26; A61K 36/00; A61K 33/38**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00351

(22) 12/09/2018

(45) 27/06/2022 411

(43) 25/12/2018 369A

(73) Viện kỹ thuật nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Nhà A13, 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội.

(72) Trần Đại Lâm (VN); Lê Thế Tâm (VN); Nguyễn Xuân Phúc (VN).

(54) **QUY TRÌNH CHẾ TẠO HỆ DẪN THUỐC CURCUMIN TRÊN NỀN HẠT NANO SẮT
TỪ/CHITOSAN**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chế tạo hệ dẫn thuốc curcumin trên nền hạt nano Fe_3O_4 /chitosan bao gồm các công đoạn: a) tạo hạt nano Fe_3O_4 /chitosan và b) tải thuốc curcumin lên hệ dẫn thuốc Fe_3O_4 /CS. Quy trình được hoàn thành trên cơ sở áp dụng một số cấu trúc polyme thiên nhiên làm chất mang một số thuốc ung thư nhả chậm có nguồn gốc thiên nhiên kết hợp hạt nano để gia tăng hoạt tính điều trị của thuốc tăng hướng đích, dẫn truyền thuốc và làm giảm độc hại của liệu pháp. Sản phẩm thu được bởi quy trình theo giải pháp hữu ích cho thấy những tác dụng hiệp đồng trong việc tiêu diệt các tế bào ung thư, nâng cao hơn nữa hiệu lực tác động lên các tế bào ung thư.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực chế tạo hệ dẫn thuốc ứng dụng cho y sinh, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến nghiên cứu quy trình ổn định chế tạo một số hệ dẫn thuốc trên cơ sở áp dụng một số cấu trúc polyme thiên nhiên (trong giải pháp này là chitosan) làm chất mang một số thuốc ung thư nhả chậm có nguồn gốc thiên nhiên (trong giải pháp này là curcumin) kết hợp hạt nano Fe_3O_4 để gia tăng hoạt tính điều trị của thuốc, tăng hướng đích, dẫn truyền thuốc và làm giảm độc hại của liệu pháp.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Y học đòi hỏi phát hiện và diệt trừ các u, mô; các tác nhân gây bệnh như vi khuẩn, virus hoặc hiện đại hơn là tác nhân cấp độ phân tử, gen. Phát hiện thì yêu cầu độ nhạy càng cao, còn chữa trị thì phải giảm thiểu hiệu ứng phụ. Vật liệu hạt kích thước nano có một số đặc tính vật lý thú vị triển vọng ứng dụng lớn cho mục đích chẩn đoán và chữa trị bệnh theo xu hướng mong muốn trên. Về mặt chữa trị, khá nhiều liệu pháp không phẫu thuật quan tâm đến công nghệ nano. Chẳng hạn, đối với liệu pháp hóa trị các nghiên cứu nhằm mục đích chế tạo các hệ thống mang thuốc nano hướng đích làm tăng hiệu quả của thuốc và giảm thiểu các tác dụng phụ; liệu pháp nhiệt trị sử dụng nguyên tắc đốt nội với các nguồn nhiệt là các hạt từ, hạt kim loại kích thước bé hơn tế bào để bóc tách hoặc diệt tế bào ung thư; hay liệu pháp thực khuẩn thể) là phương pháp sử dụng các thực khuẩn thể đặc hiệu gắn với các hạt mang thuốc, v.v..

Để giải quyết vấn đề hướng đích, người ta có thể sử dụng các tác nhân hóa, lý, sinh khác nhau. Khi hệ có chứa các hạt từ tính, có thể dùng từ trường ngoài để dẫn dắt và khu trú dịch thuốc. Tùy thuộc vào đặc trưng hóa học vùng mô bệnh (như độ pH) người ta có thể định nhóm chức hướng đích thích hợp lên hệ dẫn thuốc. Phần lớn các thuốc hiện nay đã và đang sản xuất là các thuốc có phân tử lượng thấp, chỉ có một phần rất nhỏ tồn tại dưới dạng cao phân tử. Các thuốc có phân tử lượng thấp dễ bị đào thải ra khỏi cơ thể, do vậy nồng độ thuốc trong máu giảm nhanh nên chúng chỉ có tác dụng trong một thời gian ngắn. Muốn đảm bảo hiệu lực liên tục của thuốc, ta phải dùng nhiều lần, nhiều ngày trong một phác đồ điều trị. Hơn thế, các thuốc phân tử

lượng thấp thường gây ra một số tác dụng phụ do chúng dễ bị phân hủy bởi các enzym trong cơ thể tạo ra các dẫn xuất khác có hoạt tính không mong muốn. Ví dụ, Artemisin và các dẫn xuất là các hoạt chất rất triển vọng trong điều trị sốt rét, đặc biệt với các chủng kháng thuốc. Hiện nay một số dẫn xuất như artemether, arteether và artesunate đã được sử dụng rộng rãi, có hiệu quả cao trong điều trị sốt rét ở Trung Quốc, Việt Nam và nhiều nước khác. Tuy nhiên, các dẫn xuất này còn có một số nhược điểm, đáng kể nhất là thời gian tác dụng của thuốc ngắn dẫn đến khả năng tái phát cao. Nguyên nhân chủ yếu là do nhóm axetal trong các dẫn xuất này không bền vững trong cơ thể. Một trong những chuyển hoá chính của artemether trong cơ thể là quá trình monohydroxylation dưới tác dụng của men cytochrome P450, sau đó oxy hoá thành dihydroartemisinin (DHA), một dẫn xuất có hoạt tính cao song độc đối với hệ thần kinh và có thời gian bán phân huỷ ngắn.

Nhằm kéo dài hiệu lực của thuốc và hạn chế các tác dụng phụ do thuốc gây ra, người ta có nhiều giải pháp khác nhau, trong đó một giải pháp quan trọng là đưa thuốc vào các chất mang. Việc đưa thuốc vào chất mang sẽ cho các ưu điểm sau: i) có khả năng vận chuyển chọn lọc đến các tế bào mang bệnh; ii) tăng thời gian bán thải của thuốc do vậy giảm số lần sử dụng thuốc; iii) đôi khi làm xuất hiện những tác dụng sinh học mới so với thuốc ban đầu.

Một polyme có khả năng bao bọc các hạt nano phải có nhiều đặc tính đặc biệt như chứa các nhóm chức năng dễ dàng biến tính và đặc biệt phải có độ tương thích và phân hủy sinh học cao. Trong lịch sử nghiên cứu, các polyme biến tính có nguồn gốc tự nhiên như từ tinh bột, xenlulozơ đã được ứng dụng nhiều làm tá dược trong công nghiệp dược. Các hợp chất này cũng có nhiều đặc tính quý và thường đóng vai trò đa chức năng: có thể trở thành một tá dược siêu rã, tá dược độn, tá dược dính, v.v. cũng góp phần vào sự hoàn thiện của một chế phẩm dược phẩm và tăng sinh khả dụng của dược chất trong một số trường hợp. Chitosan là một polysaccarit, sản phẩm bán tổng hợp từ chitin - một thành phần quan trọng cấu tạo nên vỏ của các loài giáp xác. Chitosan có tính tương thích sinh học tốt, đã được tổ chức y tế thế giới (WHO) đánh giá rất cao về các ứng dụng sinh học của nó.

Curcumin là thành phần hoạt tính sinh học được chiết xuất từ củ nghệ và từ xa xưa đã được sử dụng làm màu phụ gia thực phẩm và dược liệu. Curcumin đã được nghiên cứu nhiều trên thế giới bởi các tác dụng điều trị như làm lành vết thương,

kháng khuẩn, chống viêm, hạ cholesterol trong máu, lợi mật, bảo vệ gan và kháng u. Tuy nhiên, curcumin cũng như các thuốc điều trị ung thư truyền thống thường thiếu tính đặc hiệu đối với tế bào ung thư và khả năng tan trong nước hạn chế, do đó sinh khả dụng của các hợp chất này khá thấp mặc dù có hoạt tính tốt. Vì vậy, để cải thiện khả năng hấp thu hợp chất này là một vấn đề rất lớn. Hầu hết các patent đã công bố đều tập trung vào đưa ra quy trình chế tạo nano curcumin với mục đích nano hóa các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính cao để tăng tính tan và tính khả dụng của nó. Tác giả Anitha Kri và đồng sự trong US 2011/0229532A1 đã đề cập đến quy trình chế tạo hệ vi nhũ tương của hợp chất thuộc nhóm polyphenol thân dầu bằng cách sử dụng siêu âm với chất hoạt động bề mặt dạng non-ionic và một dung môi dạng non-ionic để tăng khả năng hòa tan trong nước. Tác giả Bakulesh Mafatlal Khamar và đồng sự trong US 2013/0225689 A1 đã đề cập đến quy trình chế tạo nano curcumin ở dạng lỏng, dạng muối được dùng và các dẫn xuất của curcumin. Tác giả C. Moorthi và K. Kathiresan trong một nghiên cứu “Curcumin-Piperin/curcumin-Quercetin/Curcumin-Silibinin dual drug-loaded nanoparticulate combination therapy: A novel approach to target and treat multidrug resistant cancer” cũng chỉ tập trung nghiên cứu chỉ ra sự kết hợp curcumin và quercetin làm tăng cường rõ rệt các hoạt tính và tác dụng dược lý của các chất này khi sử dụng riêng rẽ.

Do đó, vẫn có nhu cầu cao về một quy trình chế tạo hệ dẫn thuốc nano có thể hướng đích thụ động và hướng đích chủ động, nhờ đó giúp giảm tác dụng phụ, giảm liều lượng của thuốc.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Với kích thước nano, hệ dẫn thuốc sẽ có thêm ưu điểm cơ bản là thu hẹp phạm vi phân bố của thuốc trong cơ thể nên làm giảm tác dụng phụ của thuốc, và giảm lượng thuốc điều trị. Với việc tối ưu các tính chất hóa lý (thông qua kích thước hạt, điện tích bề mặt, ưa/kỵ nước) tốc độ giải phóng thuốc hoàn toàn có thể được kiểm soát.

Hạt nano từ đã được biết đến rộng rãi nhờ khả năng ứng dụng cao trong y sinh, đặc biệt trong chẩn đoán (cung cấp ảnh cộng hưởng từ MRI và phương pháp thử miễn dịch gắn enzym (từ tính làm tăng liên kết enzym với hệ miễn dịch) và trong điều trị (tải thuốc và nhiệt trị, hyperthermia). Các hướng nghiên cứu hiện nay nhằm nâng cao từ tính của vật liệu, giảm kích cỡ hạt và chức năng hóa bề mặt bởi các polyme sinh

học. Hạt nano từ tính có tính tương hợp sinh học được gắn kết với thuốc điều trị. Lúc này hạt nano có tác dụng như một hạt mang. Thông thường hệ thuốc/hạt tạo ra một chất lỏng từ và đi vào cơ thể thông qua hệ tuần hoàn. Khi các hạt đi vào mạch máu, một từ trường ngoài rất mạnh được dùng để tập trung các hạt vào một vị trí nào đó trên cơ thể. Khi hệ thuốc/hạt được tập trung tại vị trí cần thiết, quá trình nhả thuốc có thể diễn ra thông qua cơ chế hoạt động của các enzym hoặc các tính chất sinh lý học do các tế bào ung thư gây ra như độ pH, quá trình khuếch tán hoặc sự thay đổi của nhiệt độ.

Quá trình vật lý diễn ra trong việc dẫn truyền thuốc cũng tương tự như trong phân tách tế bào. Các chất mang thường đi vào các tĩnh mạch hoặc động mạch nên các thông số thủy lực như thông lượng máu, nồng độ chất lỏng từ, thời gian tuần hoàn đóng vai trò quan trọng như các thông số sinh lý như khoảng cách từ vị trí của thuốc đến nguồn từ trường, mức độ liên kết thuốc/hạt, và thể tích của khối u.

Mục đích của giải pháp là đề xuất quy trình công nghệ cho phép chế tạo một số hệ dẫn thuốc trên cơ sở áp dụng một số cấu trúc polyme thiên nhiên (trong giải pháp hữu ích này là chitosan) làm chất mang 1 số thuốc ung thư nhả chậm có nguồn gốc thiên nhiên (trong giải pháp hữu ích này là curcumin) kết hợp hạt nano như nano Fe_3O_4 để gia tăng hoạt tính điều trị của thuốc, tăng hướng đích, dẫn truyền thuốc và làm giảm độc hại của liệu pháp.

Trong nội dung giải pháp này, chúng tôi sử dụng phương pháp đồng kết tủa kết hợp với quá trình bọc *in-situ* (bọc ngay trong quá trình hình thành hạt nano). Chất polyme thiên nhiên chitosan được sử dụng làm chất ổn định, đồng thời là chất mang, chất để bọc các hạt nano Fe_3O_4 ngay trong quá trình tạo hạt. Đây là điểm mới của quy trình chế tạo sản phẩm của giải pháp so với các nghiên cứu trước đây (phương pháp bọc *ex-situ*). Nhược điểm của phương pháp bọc hạt nano hiện nay (phương pháp bọc *ex-situ*), các hạt nano sau khi được chế tạo, các hạt này sau đó mới được bọc bằng các polyme như chitosan, poly etylenglycol, natri alginat, v.v.. Theo phương pháp này, do không được vi bọc ngay trong quá trình hình thành tinh thể nano nên các hạt dễ bị kết đám, dẫn đến kích thước lớn, các hạt có độ đơn phân tán thấp, và đặc biệt không đạt được tính chất siêu thuận từ (tính chất quan trọng của hạt nano từ tính trong ứng dụng y sinh).

Theo giải pháp đưa ra, quá trình bọc *in-situ*, các hạt nano Fe_3O_4 được hình

thành ngay trong ma trận của chitosan và được bọc ngay trong quá trình hình thành hạt, sau đó curcumin phân tán trong etanol sẽ được hấp phụ lên bề mặt. Nhờ chitosan có nhiều gốc amino ($-\text{NH}_2$) giúp dễ dàng tạo phức với kim loại, gắn kết với các chất khác, hạt nano từ bọc ngoài bởi chitosan có bề mặt được chức năng rất hiệu quả cho việc tải thuốc.

Theo một phương án, giải pháp đề xuất hệ dẫn thuốc (Cur) nano $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ được chế tạo bằng phương pháp đồng kết tủa và kết hợp bọc *in-situ*, bao gồm các công đoạn sau:

a) tạo hạt nano $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{chitosan}$:

- định lượng các thành phần: chitosan (CS), FeCl_3 , FeCl_2 và NaOH ;
- hòa tan riêng rẽ chitosan (CS) trong axit axetic 2% trong 2 giờ thu được dung dịch A;
- hòa tan các chất FeCl_3 , FeCl_2 với tỷ lệ là 2:1 về số mol trong nước thu được dung dịch B;
- nhỏ giọt chậm dung dịch B vào dung dịch A trong điều kiện khuấy mạnh trong 30-45 phút, tăng nhiệt của hỗn hợp phản ứng lên đến 80°C với tốc độ tăng nhiệt là $7^\circ\text{C}/\text{phút}$ và duy trì ở 80°C trong khoảng 45 đến 60 phút;
- tạo môi trường trơ trong bình phản ứng bằng cách nạp khí N_2 trong thời gian phản ứng;
- nhỏ từ từ dung dịch NaOH vào hỗn hợp dung dịch trên để thực hiện phản ứng tạo hạt nano oxit sắt từ đồng thời chitosan bị kết tủa trên bề mặt các hạt nano sắt từ trong môi trường kiềm;
- làm nguội dung dịch này đến nhiệt độ trong phòng;
- lọc kết tủa, rửa bằng nước đến $\text{pH}=7$, kết hợp ly tâm để loại bỏ chitosan thu được hạt nano $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$;

b) tải thuốc curcumin lên hệ dẫn thuốc $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$:

- định lượng các thành phần: hạt nano $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ và curcumin (Cur);
- nạp riêng rẽ hạt nano từ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ vào bình phản ứng;
- nạp nước vào bình phản ứng;
- phân tán hỗn hợp có trong bình phản ứng bằng siêu âm để thu được dung dịch C;
- phân tán curcumin (Cur) trong etanol để thu được dung dịch D;
- nhỏ từ từ dung dịch D vào bình phản ứng chứa dung dịch C trong điều kiện khuấy

trộn mạnh, nhiệt độ hỗn hợp phản ứng được duy trì ở 40 đến 45°C, khuấy trong thời gian từ 5 đến 7 giờ;

- làm nguội dung dịch này đến nhiệt độ trong phòng;

- lọc loại bỏ curcumin dư bằng trợ giúp nam châm kết hợp ly tâm để thu được hệ dẫn thuốc curcumin trên nền hạt nano $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{chitosan}$.

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, các muối FeCl_3 , FeCl_2 có thể được thay bằng hỗn hợp là $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, FeSO_4 và $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$.

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, thời gian khuấy hỗn hợp trong các bước nằm trong khoảng từ 30 đến 45 phút.

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, tốc độ tăng nhiệt của hỗn hợp phản ứng đến 80°C là 7°C/phút, khi nhiệt độ đạt 80°C duy trì trong khoảng 45-60 phút.

Theo phương án của giải pháp hữu ích, thời gian khuấy hỗn hợp phản ứng để curcumin (Cur) được mang lên $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ là trong thời gian từ 5 đến 7 giờ.

Theo phương án của giải pháp hữu ích, nhiệt độ hỗn hợp phản ứng được duy trì ở nhiệt độ 40-45°C.

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, quy trình lọc loại bỏ curcumin dư bằng trợ giúp nam châm kết hợp ly tâm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ khối quy trình chế tạo hệ dẫn thuốc $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$.

Hình 2 là ảnh được xác định bằng phương pháp kính hiển vi điện tử quét xạ trường (FE-SEM: Field Emission Scanning Electron Microscopy) của mẫu vật liệu từ Fe_3O_4 bọc CS trước (a) và sau (b) khi hấp phụ Curcumin.

Hình 3 là phổ tán xạ laser DLS (Dynamic Light Scattering) của $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ (a) và $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}/\text{Cur}$ (b).

Hình 4 là ảnh huỳnh quang vận chuyển Cur của $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}-\text{Cur}$ bằng đại thực bào. So sánh giữa đại thực bào từ bạch cầu đơn nhân nhuộm kháng nguyên CD14 (a), đại thực bào từ bạch cầu đơn nhân của người tải $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}-\text{Cur}$ (b) và đại thực bào của chuột tải $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}-\text{Cur}$ (c). Màu đỏ là Actin được nhuộm đỏ bởi đỏ Red Texas và màu lam là nhân tế bào, màu lá là ảnh huỳnh quang Cur.

Hình 5 là ảnh động học tế bào của $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}-\text{Cur}$ được quan sát in-situ bằng LSCM với các thời gian khác nhau 1, 2, 4 và 6 giờ.

Hình 6 là đồ thị minh họa động học tế bào của $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS-Cur}$ được quan sát in-situ bằng PPMS với các thời gian khác nhau 1, 2, 4 và 6 giờ (Hình nhỏ là giá trị từ trường thay đổi theo thời gian tại 1kOe).

Hình 7 là sơ đồ khối quy trình mang thuốc Curcumin lên hệ dẫn thuốc $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất chế tạo hệ dẫn thuốc curcumin trên nền $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{chitosan}$ bao gồm các công đoạn sau:

Công đoạn a) là công đoạn tạo hạt $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{chitosan}$. Các hóa chất ban đầu bao gồm: FeCl_3 , FeCl_2 ; NaOH và Chitosan (CS). Hòa tan riêng rẽ Chitosan (CS) trong axit axetic trong thời gian 2 giờ thu được dung dịch A. Pha dung dịch B chứa hỗn hợp FeCl_3 , FeCl_2 (với tỉ lệ 2:1 về số mol). Nhỏ giọt chậm dung dịch B vào dung dịch A trong điều kiện khuấy mạnh trong 1 giờ, tốc độ tăng nhiệt của hỗn hợp phản ứng đến 80°C là $7^\circ\text{C}/\text{phút}$ cho đến khi nhiệt độ đạt 80°C thì duy trì trong 45-60 phút. Tạo môi trường trơ trong bình phản ứng bằng cách nạp khí N_2 trong thời gian phản ứng. Sau đó dung dịch NaOH được nhỏ từ từ vào hỗn hợp dung dịch trên để thực hiện phản ứng tạo hạt nano oxit sắt từ đồng thời chitosan bị tủa trên bề mặt các hạt nano sắt từ trong môi trường kiềm. Lọc kết tủa rửa sạch đến $\text{pH}=7$.

Công đoạn b) là công đoạn tải thuốc curcumin lên hệ dẫn thuốc $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$. Nhờ chitosan (CS) có nhiều gốc amino ($-\text{NH}_2$) giúp dễ dàng tạo phức với kim loại, hạt nano từ bọc ngoài bởi CS có bề mặt được chức năng rất hiệu quả cho việc tải thuốc. Curcumin được hòa tan trong dung môi etanol nhỏ giọt chậm vào dung dịch $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ trong điều kiện khuấy trộn mạnh giữ nhiệt độ khoảng $40-45^\circ\text{C}$, khuấy trong thời gian 5-7 giờ. Sau phản ứng để lắng để lọc loại bỏ curcumin không được tải lên.

Bước rửa bằng nước kết hợp ly tâm được thực hiện như sau: lấy một lượng nhất định của mẫu cho vào các ống sạch. Cho tiếp nước vào các ống nghiệm này rồi xử lý bằng siêu âm trong thời gian 10 phút (lần 1), rồi ly tâm ở tốc độ quy định trong thời gian quy định. Sử dụng nam châm để giữ lấy các hạt mẫu sau khi ly tâm, lấy pipet hút hết chất lỏng bên trên rồi tiếp tục cho thêm nước vào, tiếp đó xử lý bằng siêu âm và ly tâm lần nữa (lần 2). Sau khi ly tâm với trợ giúp của nam châm, dung dịch được kiểm tra để về $\text{pH}=7$. Lặp đi lặp lại quy trình này trong một số lần. Khi dung dịch thu được có $\text{pH}=7$ thì tiến hành ly tâm và sử dụng nam châm để thu được

mẫu sạch.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích sẽ được minh họa rõ hơn qua các ví dụ sau đây, các ví dụ hoàn toàn không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của giải pháp.

Ví dụ 1: Quy trình chế tạo hạt nano sắt từ trên nền chitosan ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$)

Quá trình chế tạo hệ dẫn thuốc $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ đã được tổng hợp theo sơ đồ hình 1. Cụ thể, cân chính xác lượng muối $0,01 \text{ mol Fe}^{2+}$ và $0,02 \text{ mol Fe}^{3+}$ theo tỷ lệ số mol 1:2, hòa tan hai muối vào 20 ml nước cất, bổ sung một lượng nhỏ axit HCl nhằm hạn chế sự thủy phân của muối sắt. Cân 0,5 g CS hòa tan trong 50 ml axit axetic 2%, khuấy trong 2 giờ ở 50°C . Nhỏ từ từ dung dịch chứa hỗn hợp muối Fe vào dung dịch CS, khuấy trộn trong 30 phút để thu được dung dịch đồng nhất, được dung dịch A. Đưa dung dịch A vào trong thiết bị phản ứng. Trước khi phản ứng tiến hành bơm sục N_2 trong 15 phút để loại bỏ không khí. Cân lượng NaOH phản ứng vừa đủ với lượng Fe^{2+} và Fe^{3+} theo phương trình phản ứng, hòa tan trong 20 ml H_2O được dung dịch B. Mở van, nhỏ giọt từ từ dung dịch B vào dung dịch A trong khoảng 10 phút, trong điều kiện khuấy mạnh và sục N_2 , để phản ứng diễn ra trong 30 phút. Quan sát quá trình phản ứng qua sự thay đổi của màu sắc từ kết tủa nâu sang đen. Kết thúc quá trình pH dung dịch khoảng 8-10 đảm bảo lượng muối Fe đã phản ứng hết. Sản phẩm thu được ký hiệu $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$. Đổ sản phẩm sau phản ứng ra cốc có mỏ, dùng nam châm thu sắt từ và rửa với nước cất đến khi $\text{pH} = 7$ nhằm loại hết sản phẩm phụ và các chất dư chưa phản ứng. Kết tủa thu được phân tán trong 100ml nước cất bằng siêu âm. Dung dịch chứa nano sắt từ nồng độ 0,7% bền trong điều kiện thường.

Ví dụ 2: Quy trình mang thuốc curcumin lên hệ dẫn thuốc $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$

Quá trình mang thuốc curcumin lên hệ dẫn thuốc $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ đã được tổng hợp theo sơ đồ hình 7 với kích thước xấp xỉ 500 nm, bề mặt bọc bởi CS dễ dàng được vận chuyển tới khối u bằng các đại thực bào (macrophage). Cur (curcumin) được sử dụng ở đây như một thuốc mô hình nhờ các đặc tính quý báu là tự phát quang và tiêu diệt tế bào ung thư. Trong nghiên cứu này, cả quá trình điều khiển/theo dõi và điều trị đều được phối hợp bởi 2 yếu tố từ Cur và nano Fe_3O_4 : phát quang và cộng hưởng từ cho phép theo dõi quá trình vận chuyển; hóa trị và nhiệt trị cho điều trị khối u. Cụ thể, hệ dẫn thuốc $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ được tổng hợp bằng phương pháp đồng kết tủa Fe^{2+} và Fe^{3+} trong môi trường CS loãng với tác nhân hydroxit hóa là NaOH. Sau đó Cur phân tán trong

etanol được hấp phụ lên bề mặt dung dịch phân tán CSF. Phổ tán xạ laser DLS (dynamic light scattering) và ảnh FE-SEM cho thấy $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ và $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}/\text{Cur}$ có kích thước lần lượt khoảng 30 nm và 500 nm (Hình 2, 3). Việc tăng kích thước vật liệu đã khẳng định Cur đã được tải thành công lên hệ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$.

Ảnh huỳnh quang thu được của hệ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}/\text{Cur}$ lên đại thực bào cho thấy $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}/\text{Cur}$ đã được nhận biết và vận chuyển bởi đại thực bào (Hình 4, 5).

Từ hình 6, thử nghiệm đo từ tính PPMS (Physical Properties Measurement Systems) của hệ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}/\text{Cur}$ trước và sau khi vận chuyển (tương ứng chưa “ăn” và “ăn”) bởi đại thực bào (được tiến hành ở cùng điều kiện chụp ảnh hiển vi đồng tiêu LSCM thu được ở trên) cho thấy từ tính của hệ tăng theo thời gian. Kết quả PPMS thu được là rất phù hợp với kết quả LSCM. Các kết quả sơ bộ trên khẳng định tiềm năng ứng dụng của hệ dẫn thuốc $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$.

Lợi ích đạt được của giải pháp hữu ích

Nhằm kéo dài hiệu lực của thuốc và hạn chế các tác dụng phụ do thuốc gây ra, 1 giải pháp quan trọng đã được đưa ra là đưa thuốc vào các chất mang. Việc đưa thuốc vào chất mang sẽ cho các ưu điểm sau: i) Có khả năng vận chuyển chọn lọc đến các tế bào mang bệnh; ii) Tăng thời gian bán thải của thuốc do vậy giảm số lần sử dụng thuốc; iii) Đôi khi làm xuất hiện những tác dụng sinh học mới so với thuốc ban đầu.

Giải pháp đưa ra đã chế tạo và đặc trưng các tính chất lý hóa của hệ dẫn thuốc nano $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$, ứng dụng mang thuốc mô hình ít tan trong nước là curcumin. Chúng minh được khả năng tải thuốc và nhả chậm thuốc của của hệ dẫn thuốc nêu trên. Một trong những kết quả nổi bật của giải pháp là: i) đã tìm cách đưa được các hệ nano vector tới đích (tế bào ung thư) và ii) theo dõi được đường đi hay xác định được địa điểm và mức độ tập trung của các hệ vector (hệ đa chức năng từ-quang) sử dụng đại thực bào.

Giải pháp hữu ích đưa ra đã sử dụng phương pháp đồng kết tủa kết hợp với quá trình bọc *in-situ* (bọc ngay trong quá trình hình thành hạt nano). Chất polyme thiên nhiên chitosan được sử dụng làm chất ổn định, đồng thời là chất mang, chất để bọc các hạt nano Fe_3O_4 ngay trong quá trình tạo hạt. Đây là điểm mới của quy trình chế tạo sản phẩm của giải pháp so với các nghiên cứu trước đây, khi phương pháp này các hạt nano Fe_3O_4 được hình thành ngay trong ma trận của chitosan và được bọc ngay trong quá trình hình thành hạt, sau đó curcumin phân tán trong etanol sẽ được

hấp phụ lên bề mặt. Nhờ chitosan có nhiều gốc amino ($-\text{NH}_2$) giúp dễ dàng tạo phức với kim loại, gắn kết với các chất khác, hạt nano từ bọc ngoài bởi chitosan có bề mặt được chức năng rất hiệu quả cho việc tải thuốc. Đồng thời phương pháp có thể tiến hành dễ dàng, hiệu quả kinh tế cao, dung dịch nano thu được có độ bền tốt.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Ung thư là một trong những căn bệnh nguy hiểm nhất trên thế giới, với hơn 10 triệu trường hợp mắc mới mỗi năm. Tuy nhiên, tỷ lệ tử vong đó giảm trong nhiều năm qua nhờ hiểu biết rõ hơn về sinh bệnh học khối u, các thiết bị chẩn đoán và điều trị ngày càng được cải tiến. Những tiến bộ vượt bậc trong lĩnh vực sinh học phân tử và tế bào đó giúp hỗ trợ con người hiểu biết rõ hơn về sinh lý bệnh của nhiều bệnh khác nhau. Các hệ phân phối thuốc nhằm dẫn thuốc tới đích chính xác hơn, tập trung thuốc tại đích tác dụng trong thời gian dài hơn, đồng thời bảo vệ các mô khác trong cơ thể là đề tài đang được tập trung nghiên cứu trong nhiều năm nay.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chế tạo hệ dẫn thuốc curcumin trên nền hạt nano Fe_3O_4 /chitosan bao gồm các công đoạn:

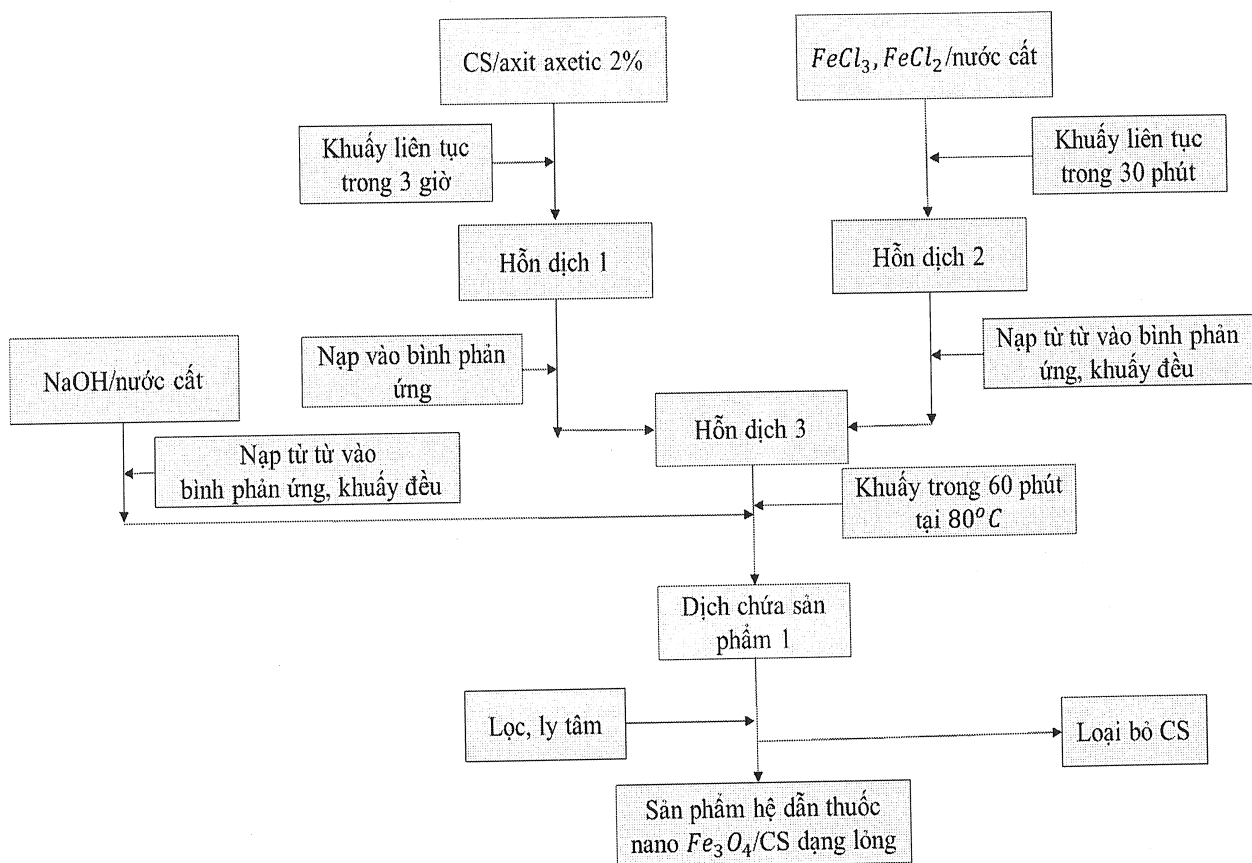
a) tạo hạt nano Fe_3O_4 /chitosan:

- định lượng các thành phần: chitosan (CS), FeCl_3 , FeCl_2 và NaOH;
- hòa tan riêng rẽ chitosan (CS) trong axit axetic 2% trong 2 giờ thu được dung dịch A;
- hòa tan các chất FeCl_3 , FeCl_2 với tỷ lệ là 2:1 về số mol trong nước thu được dung dịch B;
- nhỏ giọt chậm dung dịch B vào dung dịch A trong điều kiện khuấy mạnh trong 30-45 phút, tăng nhiệt của hỗn hợp phản ứng lên đến 80°C với tốc độ tăng nhiệt là $7^\circ\text{C}/\text{phút}$ và duy trì ở 80°C trong khoảng 45 đến 60 phút;
- tạo môi trường trơ trong bình phản ứng bằng cách nạp khí N_2 trong thời gian phản ứng;
- nhỏ từ từ dung dịch NaOH vào hỗn hợp dung dịch trên để thực hiện phản ứng tạo hạt nano oxit sắt từ đồng thời chitosan bị kết tủa trên bề mặt các hạt nano sắt từ trong môi trường kiềm;
- làm nguội dung dịch này đến nhiệt độ trong phòng;
- lọc kết tủa, rửa bằng nước đến $\text{pH}=7$, kết hợp ly tâm để loại bỏ chitosan thu được hạt nano Fe_3O_4 /CS;

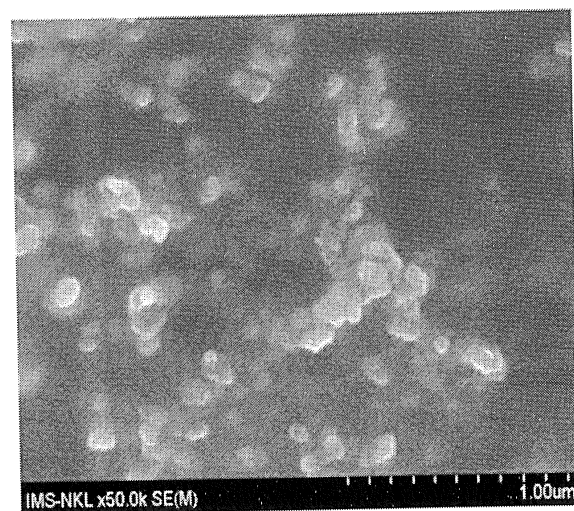
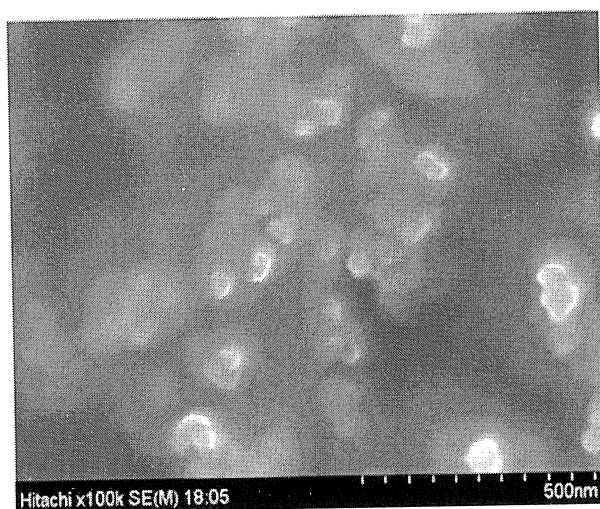
b) tải thuốc curcumin lên hệ dẫn thuốc Fe_3O_4 /CS:

- định lượng các thành phần: hạt nano Fe_3O_4 /CS và curcumin (Cur);
- nạp riêng rẽ hạt nano từ Fe_3O_4 /CS vào bình phản ứng;
- nạp nước vào bình phản ứng;
- phân tán hỗn hợp có trong bình phản ứng bằng siêu âm để thu được dung dịch C;
- phân tán curcumin (Cur) trong etanol để thu được dung dịch D;
- nhỏ từ từ dung dịch D vào bình phản ứng chứa dung dịch C trong điều kiện khuấy trộn mạnh, nhiệt độ hỗn hợp phản ứng được duy trì ở 40 đến 45°C , khuấy trong thời gian từ 5 đến 7 giờ;
- làm nguội dung dịch này đến nhiệt độ trong phòng;
- lọc loại bỏ curcumin dư bằng trợ giúp nam châm kết hợp ly tâm để thu được hệ dẫn thuốc curcumin trên nền hạt nano Fe_3O_4 /chitosan.

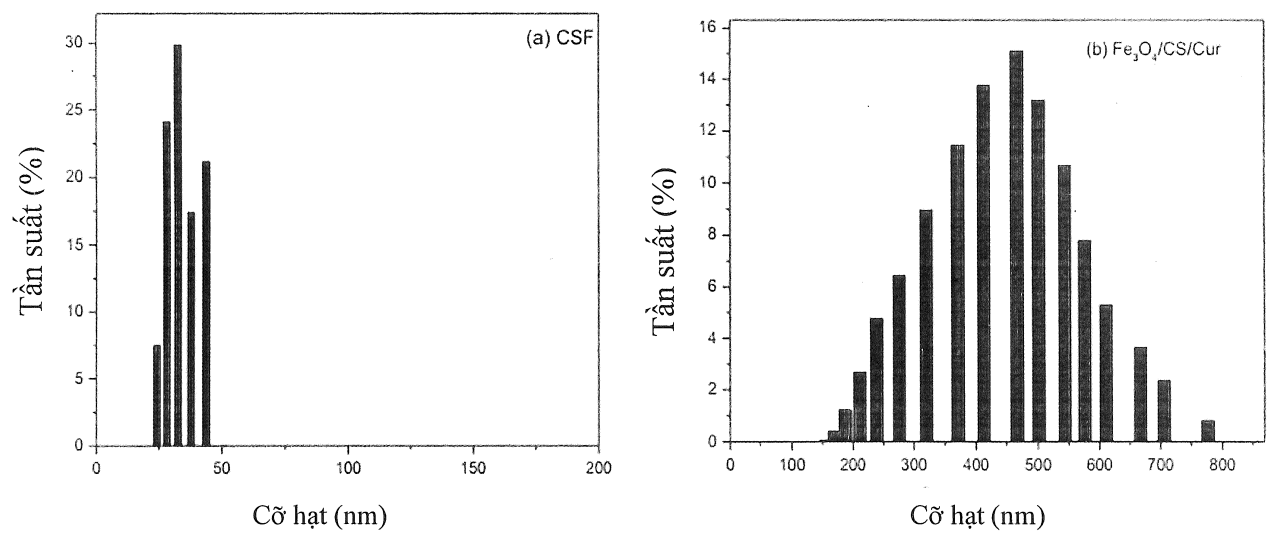
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó bước rửa bằng nước kết hợp ly tâm để loại bỏ chitosan thu được hạt nano $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CS}$ được thực hiện từ 3 đến 4 lần.
3. Quy trình theo điểm 1, trong đó bước lọc loại bỏ curcumin dư bằng trợ giúp nam châm kết hợp ly tâm được thực hiện từ 2 đến 3 lần.



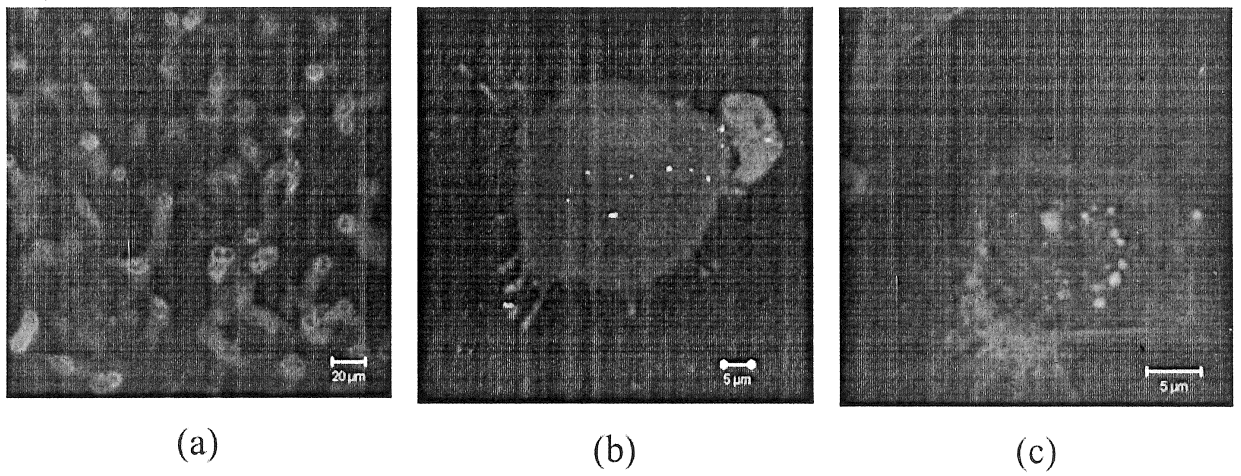
Hình 1



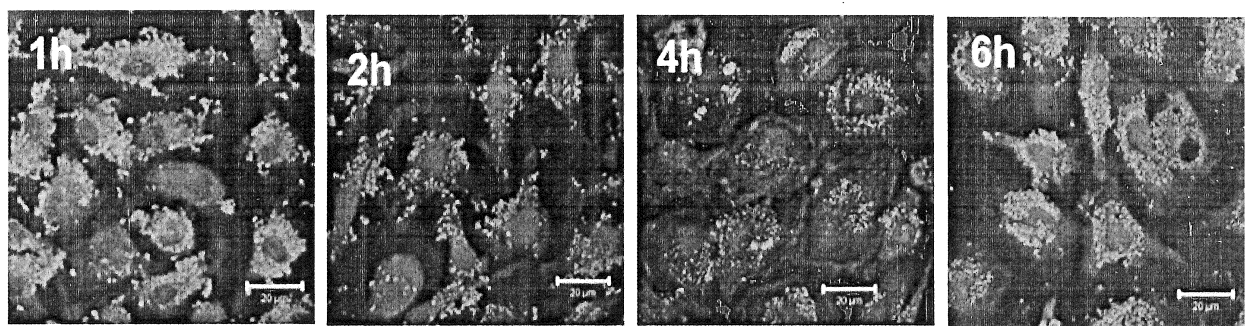
Hình 2



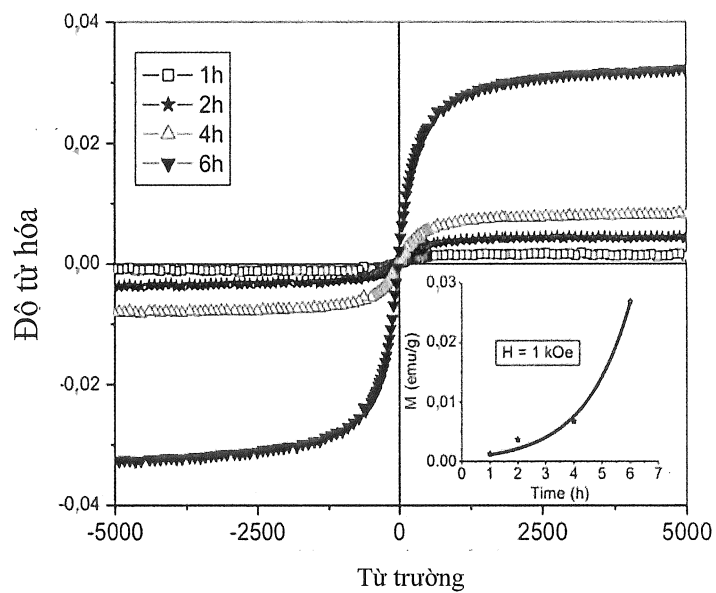
Hình 3



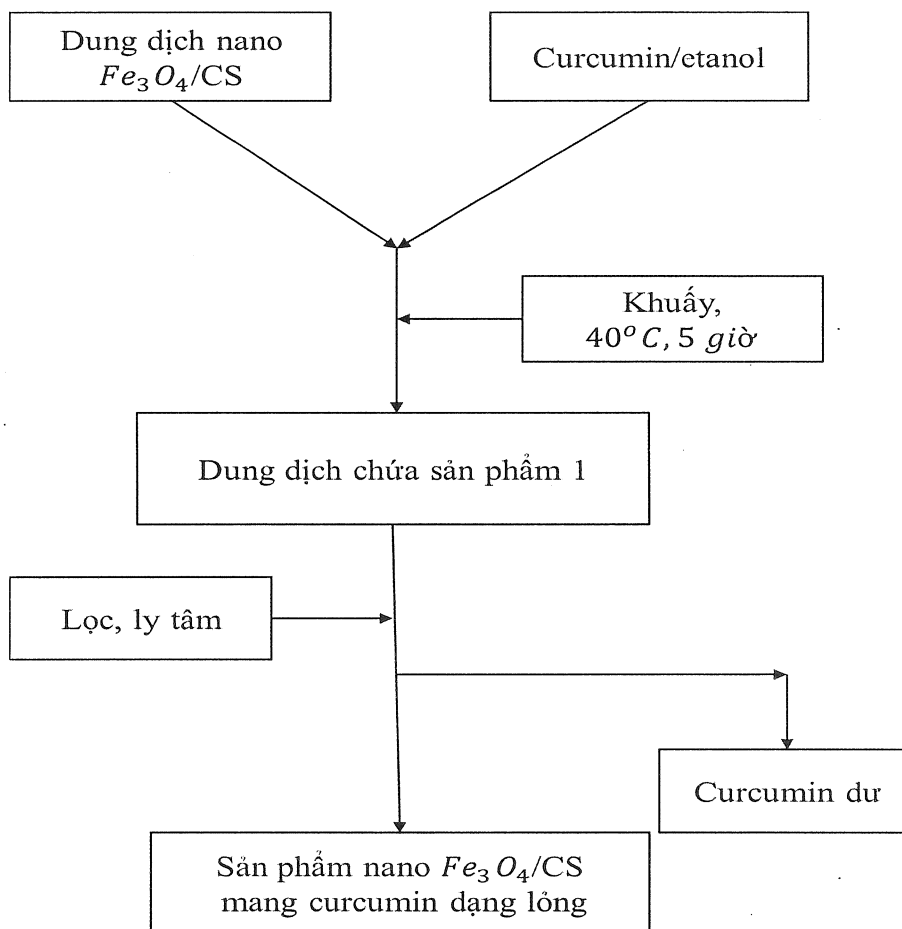
Hình 4



Hình 5



Hình 6



Hình 7