



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

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

(11)



1-0034753

(51)⁷ A61K 33/36; A61K 31/285

(13) B

(21) 1-2019-02636

(22) 17/11/2017

(86) PCT/KR2017/013148 17/11/2017

(87) WO 2018/093215 24/05/2018

(30) 10-2016-0155228 21/11/2016 KR

(45) 25/01/2023 418

(43) 25/09/2019 378A

(73) CHEMAS CO., LTD. (KR)

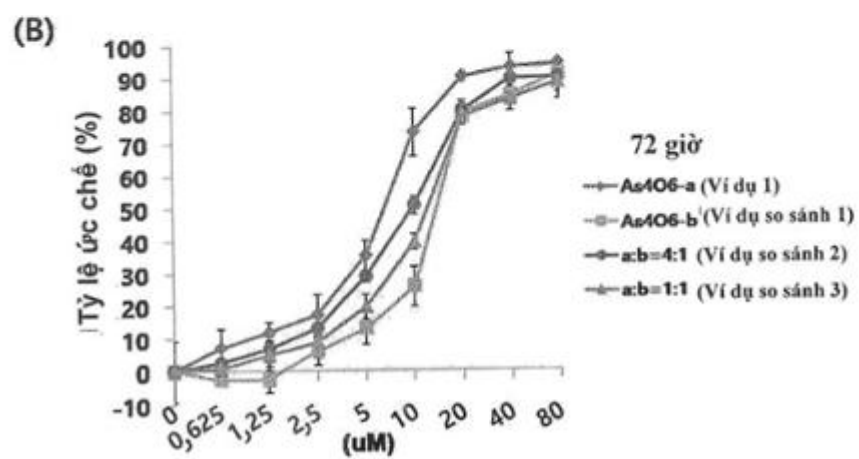
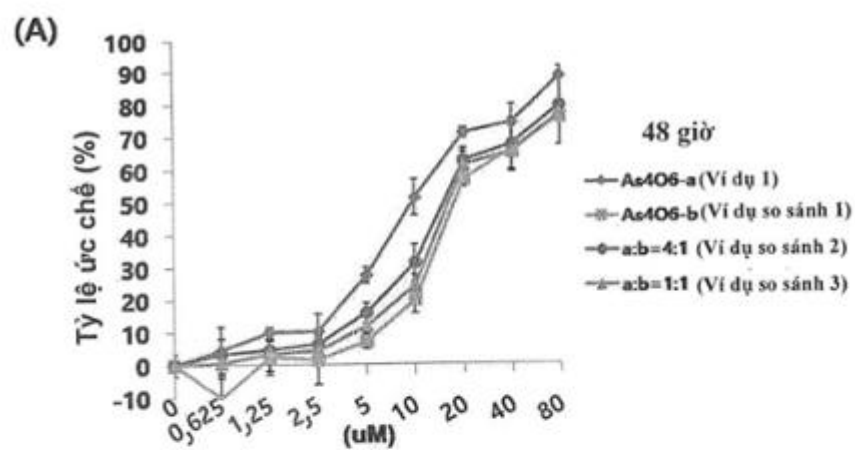
3rd Fl. 502, Bongeunsa-ro, Gangnam-gu, Seoul 06163, Republic of Korea

(72) BAE, Ill Ju (KR); LIAN, Zenglin (CN).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) DƯỢC PHẨM CHỨA DẠNG ĐA HÌNH TINH THỂ CỦA TETRAARSEN
HEXOXIT ĐỂ NGĂN NGỪA HOẶC ĐIỀU TRỊ BỆNH UNG THƯ VÚ

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa dạng đa hình tinh thể a của tetraarsen hexoxit (As_4O_6 -a) với lượng ít nhất 99% để ngăn ngừa và điều trị bệnh ung thư vú, và phương pháp bào chế dược phẩm này. Dược phẩm theo sáng chế có các tác dụng ức chế sự tăng sinh và di căn tế bào ung thư vượt trội, và như vậy có thể được sử dụng một cách hữu ích làm tác nhân chống ung thư.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến được phẩm chứa dạng đa hình tinh thể của tetraarsen hexoxit để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư vú.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh ung thư được đặc trưng bởi sự phát triển tế bào không kiểm soát, và sự phát triển tế bào bất thường này tạo thành khối tế bào được gọi là khối u, khối u này thâm nhập vào các mô xung quanh, và, trong các trường hợp nghiêm trọng, gây di căn vào các cơ quan khác của cơ thể. Về mặt lý thuyết, các khối u được gọi là u tân sinh. Bệnh ung thư tác động đến tất cả các mô và các cơ quan của cơ thể ở những tốc độ lan nhiễm khác nhau.

Khi tỷ lệ mắc bệnh ung thư vú gia tăng do sự cải thiện các tiêu chuẩn sống nhờ tăng trưởng kinh tế, các thay đổi và Âu hóa về thói quen ăn uống, các thay đổi về phương pháp sinh con và nuôi con bằng sữa mẹ, và các thay đổi tương tự, bệnh ung thư vú trước hết xảy ra trong các khối u của nữ giới (Kamangar F., et al., 2006). Bệnh ung thư vú là khối u ác tính có thể lây lan tới các cơ quan khác đe dọa đến tính mạng, không giống các khối u lành tính vẫn ở lại trong vú. Bệnh ung thư vú, bao gồm bệnh ung thư vú di căn đến các khối u rắn, có các đặc tính sinh học khác nhau, và do đó có các phương án điều trị và tiên lượng khác nhau.

Mặc dù các phát triển mới đây về cắt bỏ toàn bộ, hóa trị, và liệu pháp hoóc môn đã cải thiện đáng kể các kết quả điều trị bệnh ung thư vú, song bệnh ung thư vú vẫn tái phát ở khoảng 25-30% số bệnh nhân mà không di căn hạch lympho nách và khoảng 75-

80% số bệnh nhân có di căn hạch lympho nách trong vòng 10 năm, và hầu hết các bệnh nhân này đều chết do bệnh ung thư vú di căn. Do số bệnh nhân ung thư vú luôn gia tăng, các bệnh nhân bị bệnh ung thư vú di căn cũng gia tăng, và do đó, việc nghiên cứu tiếp tục với các bệnh nhân ung thư vú giai đoạn đầu cũng như các phương pháp điều trị cho các bệnh nhân này, tiên lượng, và các nhân tố ảnh hưởng đến tiên lượng, song kết quả vẫn chưa đáng kể.

Do đó, liên quan đến điều trị bệnh ung thư vú, vẫn tiếp tục cần phải có các tác nhân trị liệu có tác dụng chống ung thư vượt trội bất kể có hay không di căn ung thư vú.

Các tác giả sáng chế đã nhận được quyền đối với patent về các dấu hiệu kỹ thuật trong đó tetraarsen hexoxit được tinh chế từ arsenolit tự nhiên chứa arsen thông qua các kỹ thuật tách và tinh chế thể hiện tác dụng ức chế di căn ung thư trong các thử nghiệm động vật và có tác dụng điều trị chống ung thư vượt trội khi được sử dụng cho những bệnh nhân bị ung thư giai đoạn cuối bị bệnh ung thư dạ con, ung thư bàng quang, ung thư phổi, ung thư xoang hàm, ung thư thận, và các bệnh ung thư tương tự (patent Hàn Quốc số 272835).

Các tác giả sáng chế, do quá trình nghiên cứu không ngừng về arsen, đã biết rằng tetraarsen hexoxit có dạng đa hình tinh thể của tetraarsen hexoxit là 99% hoặc lớn hơn có thể được tạo ra bằng phương pháp điều chế mới, khác với phương pháp được bộc lộ trong patent nêu trên, và được phẩm chứa tetraarsen hexoxit này có tác dụng lớn đối với việc ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư vú, và hoàn thành sáng chế này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Một khía cạnh của sáng chế là đề xuất được phẩm chứa dạng đa hình tinh thể của tetraarsen hexoxit (As_4O_6) làm hoạt chất để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư vú.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp bào chế được phẩm chứa dạng đa hình tinh thể của tetraarsen hexoxit (As_4O_6) làm hoạt chất để ngăn ngừa

hoặc điều trị bệnh ung thư vú.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế là đề xuất được phẩm chứa dạng đa hình tinh thể của tetraarsen hexoxit (As_4O_6) làm hoạt chất để ức chế di căn ung thư vú.

Giải pháp kỹ thuật

Sáng chế đề cập đến được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư vú, được phẩm này chứa dạng đa hình tinh thể của tetraarsen hexoxit (As_4O_6), trong đó tetraarsen hexoxit bao gồm dạng đa hình tinh thể a ($\text{As}_4\text{O}_6\text{-a}$) của tetraarsen hexoxit với lượng bằng 99% hoặc lớn hơn.

Tetraarsen hexoxit của được phẩm này có thể được điều chế bằng các bước: bước đầu tiên là gia nhiệt natri clorua ở nhiệt độ $100\sim 800^\circ\text{C}$, sau đó là làm lạnh; bước thứ hai là đặt arsen trioxit (As_2O_3) lên trên natri clorua, sau đó gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 1000°C ở trạng thái kín khí và sau đó làm lạnh; bước thứ ba là tách các tinh thể được kết tinh ở tầng lọc bằng cách thu gom arsen thăng hoa; và bước thứ tư là lặp lại bước thứ hai và thứ ba bốn đến mười lần có sử dụng các tinh thể thu được ở bước thứ ba thay cho arsen trioxit ở bước thứ hai, nhờ đó thu được các tinh thể tetraarsen hexoxit.

Tetraarsen hexoxit của được phẩm có thể bao gồm dạng đa hình tinh thể b của tetraarsen hexoxit ($\text{As}_4\text{O}_6\text{-b}$) nhỏ hơn 1%.

Tetraarsen hexoxit có thể có độ tinh khiết bằng 99,9% hoặc lớn hơn.

$\text{As}_4\text{O}_6\text{-a}$ và $\text{As}_4\text{O}_6\text{-b}$ có thể có các đặc điểm (dấu hiệu) từ (i) đến (iii) dưới đây.

[Bảng 1]

Loại	Dạng đa hình tinh thể a ($\text{As}_4\text{O}_6\text{-a}$)	Dạng đa hình tinh thể b ($\text{As}_4\text{O}_6\text{-b}$)
(i) Các thông	$a = b = c = 11,0734 \text{ \AA}$	$a = b = c = 11,0600 \text{ \AA}$

số khối cơ bản	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ $V = 1357,82 \text{ \AA}^3$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ $V = 1352,90 \text{ \AA}^3$
(ii) Độ dài liên kết As-O	1,786 \AA	2,011 \AA
(iii) Góc liên kết O-As-O	98,36°	109,47°

As₄O₆-a có dạng tinh thể, mà phổ nhiễu xạ bột tia X của nó thu được bằng cách sử dụng bước sóng nguồn sáng 1,5406 \AA trong góc nhiễu xạ (2 θ) bằng 10° đến 50° ở tốc độ 1°/phút (bước quét bằng 0,02°) thể hiện các đỉnh ở các trị số 2 θ là 13,84, 27,88, 32,32, 35,3, 39,84, 42,38, 46,34, 48,6, và 49,34 (xem FIG. 1). Ngoài ra, tỷ lệ của các đỉnh chính thể hiện ở các trị số 2 θ 13,8 và 27,9 là 1:1,3.

As₄O₆-b có dạng tinh thể, mà phổ nhiễu xạ bột tia X của nó thu được bằng cách sử dụng bước sóng nguồn sáng 1,5406 \AA trong góc nhiễu xạ (2 θ) bằng 10° đến 50° ở tốc độ 1°/phút (bước quét bằng 0,02°) thể hiện các đỉnh ở các trị số 2 θ là 13,86, 27,92, 32,36, 35,34, 39,9, 42,44, 46,4, 48,66, và 49,4 (xem FIG. 1). Ngoài ra, tỷ lệ của các đỉnh chính thể hiện ở các trị số 2 θ 13,8 và 27,9 là 1:2,5.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất được phẩm chứa tetraarsen hexoxit làm hoạt chất để ức chế di căn ung thư vú, trong đó tetraarsen hexoxit bao gồm dạng đa hình tinh thể a của tetraarsen hexoxit (As₄O₆-a) với lượng bằng 99% hoặc lớn hơn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện phổ nhiễu xạ bột tia X của As₄O₆-a và As₄O₆-b.

FIG. 2 thể hiện đồ thị mô tả các kết quả đánh giá các tác dụng ức chế sự tăng sinh

tế bào thông qua thử nghiệm MTT sau khi dòng tế bào MCF-7 đã được xử lý bằng hợp chất Ví dụ 1 và hợp chất ví dụ so sánh từ 1 đến 3 và được ủ trong 48 giờ (FIG. 2A) và 72 giờ (FIG. 2B).

FIG. 3 thể hiện đồ thị mô tả các kết quả đánh giá các tác dụng ức chế sự tăng sinh tế bào thông qua thử nghiệm MTT sau khi dòng tế bào SK-BR-3 đã được xử lý bằng hợp chất Ví dụ 1 và hợp chất ví dụ so sánh từ 1 đến 3 và được ủ trong 48 giờ (FIG. 3A) và 72 giờ (FIG. 3B).

FIG. 4 thể hiện kết quả phát hiện annexin V và PI, là các chất đánh dấu tế bào, qua phép đo đếm tế bào dạng dòng (4A), về tác dụng gây chết tế bào theo chương trình theo nồng độ của hợp chất ví dụ 1 khi các tế bào MCF-7 được xử lý bằng hợp chất Ví dụ 1 có nồng độ khác nhau, và kết quả nghiên cứu tỷ lệ chết tế bào theo chương trình bằng cách phân tích lượng annexin V so với PI (4B).

FIG. 5 thể hiện kết quả nghiên cứu các thay đổi biểu hiện của các gen, tham gia vào chu trình tế bào và sự chết tế bào theo chương trình, theo nồng độ của hợp chất ví dụ 1 khi các tế bào MCF-7 được xử lý bằng hợp chất Ví dụ 1 có nồng độ khác nhau.

FIG. 6 thể hiện ảnh CT của phổi trước và sau khi dùng hợp chất ví dụ 1 cho bệnh nhân mắc bệnh ung thư vú di căn trong thử nghiệm lâm sàng, xác nhận rằng kích thước khối u di căn giảm do việc dùng hợp chất ví dụ 1.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa tetraarsen hexoxit (As_4O_6) làm hoạt chất để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư vú, trong đó tetraarsen hexoxit bao gồm dạng đa hình tinh thể a của tetraarsen hexoxit ($\text{As}_4\text{O}_6\text{-a}$) với lượng bằng 99% hoặc lớn hơn.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế được phẩm chứa dạng đa hình tinh thể của tetraarsen hexoxit (As_4O_6) làm hoạt chất để ngăn

ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư vú, phương pháp này bao gồm: bước đầu tiên là gia nhiệt natri clorua ở nhiệt độ 100~800°C, sau đó là làm lạnh; bước thứ hai là đặt arsen trioxit (As_2O_3) lên trên natri clorua, sau đó gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 1000°C ở trạng thái kín khí và sau đó làm lạnh; bước thứ ba là tách các tinh thể được kết tinh ở tầng lọc bằng cách thu gom arsen thăng hoa; và bước thứ tư là lặp lại bước thứ hai và thứ ba bốn đến mười lần có sử dụng các tinh thể thu được ở bước thứ ba thay cho arsen trioxit ở bước thứ hai, nhờ đó thu được các tinh thể tetraarsen hexoxit, trong đó các tinh thể tetraarsen hexoxit thu được ở bước bốn bao gồm dạng đa hình tinh thể α của tetraarsen hexoxit ($\text{As}_4\text{O}_6\text{-}\alpha$) với lượng bằng 99% hoặc lớn hơn.

Bình phản ứng tổng hợp làm từ vật liệu cao lanh và các kẹp có khả năng lắp các thiết bị lọc lên trên bình phản ứng tổng hợp được chuẩn bị. Sau đó, natri clorua được đặt trong bình phản ứng tổng hợp, và được gia nhiệt và làm lạnh. Lý do tại sao lại sử dụng natri clorua trong phương pháp điều chế của sáng chế là vì khi tiến hành gia nhiệt trong khi đặt arsen trioxit lên trên natri clorua ở bước thứ hai, nhiệt được chuyển đều đến hợp chất arsen, nhờ đó giúp cho sự thăng hoa của các hợp chất arsen. Để loại bỏ các tạp chất và hơi ẩm ra khỏi natri clorua này, natri clorua được gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100 đến 800°C trong khoảng thời gian từ 2 đến 6 giờ trong bước đầu tiên. Ở bước đầu tiên, natri clorua được làm lạnh ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian từ 3 đến 10 giờ sau khi gia nhiệt.

Sau đó, tiến hành bước thứ hai bằng cách đặt arsen trioxit (As_2O_3) lên trên natri clorua, sau đó là gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 1000°C ở trạng thái kín khí và sau đó làm lạnh. Ở đây, sau khi đặt arsen trioxit, ba đến sáu thiết bị lọc (các tầng lọc) có khả năng thu gom arsen thăng hoa được lắp trên các kẹp sao cho các khoảng cách giữa các thiết bị lọc bằng 2 đến 6 mm. Các thiết bị lọc được sử dụng trong bản mô tả tốt hơn là có trọng lượng tối thiểu nằm trong khoảng từ 70 đến 100 g/m², độ dày nằm trong khoảng từ 0,17 đến 0,25 mm, tốc độ lọc nằm trong khoảng từ 22 đến 30 giây/100 ml, và tỷ lệ lưu giữ nằm trong khoảng từ 5 đến 10 μm .

Sau khi lắp các thiết bị lọc, tạo trạng thái kín khí, và sau đó phần đáy của bình

phản ứng tổng hợp được gia nhiệt trong khoảng thời gian từ 3 đến 10 giờ trong khi nhiệt độ tăng từ từ từ 100°C đến 1000°C, sao cho nhiệt độ của phần giữa của tầng lọc cao nhất được duy trì ở nhiệt độ $150 \pm 100^\circ\text{C}$, và tetraarsen hexoxit kết tinh được cho qua các tầng lọc. Sau đó, tiến hành làm lạnh ở nhiệt độ trong phòng trong 5 giờ hoặc lâu hơn, và tốt hơn là trong khoảng thời gian từ 5 đến 10 giờ.

Sau đó, bước thứ ba được thực hiện bằng cách tách các tinh thể màu trắng được thu gom ở các tầng lọc được đặt cách nhau từ tầng 3 đến tầng 6 được lắp đặt theo kiểu xếp chồng.

Sau khi loại bỏ một lượng nhỏ arsen trioxit còn lại trên natri clorua trong bình phản ứng tổng hợp, các tinh thể màu trắng được thu gom được đặt trên thiết bị đó, và sau đó các bước thứ hai và thứ ba được lặp lại bốn đến mười lần trong cùng điều kiện, bằng cách này cuối cùng thu được các tinh thể tetraarsen hexoxit. Do việc kiểm tra các cấu trúc tinh thể thu được theo phương pháp điều chế của sáng chế, đã được xác nhận rằng hầu hết các tinh thể là As_4O_6 -a, các tinh thể này chiếm 99% hoặc lớn hơn.

Dược phẩm chứa dạng đa hình tinh thể của tetraarsen hexoxit theo sáng chế có thể được sử dụng thích hợp để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư vú và ức chế di căn ung thư vú.

Dược phẩm của sáng chế có thể được phối trộn ở dạng của: dược phẩm dùng qua đường miệng, như thuốc bột, hạt cốm, viên nén, viên nang, huyền phù, nhũ tương, sirô, hoặc sol khí; các dược phẩm được dùng bên ngoài; thuốc đạn; và dung dịch tiêm vô trùng, theo phương pháp thông thường. Các ví dụ về chất mang, tá dược, và chất pha loãng mà có thể được chứa trong dược phẩm có thể bao gồm lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, manitol, xylitol, erythritol, maltitol, tinh bột, cao su acacia, alginat, gelatin, canxi phosphat, canxi silicat, xenluloza, metyl xenluloza, xenluloza vi tinh thể, polyvinyl pyrrolidon, nước, metyl hydroxybenzoat, propyl hydroxybenzoat, bột talc, magie stearat, và dầu khoáng. Dược phẩm có thể được phối trộn thành các dược phẩm bằng cách sử dụng chất pha loãng hoặc tá dược, như chất làm đầy, chất độn, chất liên kết, chất tạo ẩm,

chất gây rã, hoặc chất hoạt động bề mặt. Dược phẩm rắn để dùng qua đường miệng bao gồm viên nén, viên thuốc dẹt, thuốc bột, hạt cốm, viên nang, và các loại tương tự. Các dược phẩm rắn này có thể được điều chế bằng cách trộn tetraarsen hexoxit của sáng chế với ít nhất một tá dược, ví dụ, tinh bột, canxi cacbonat, sucroza hoặc lactoza, gelatin, hoặc chất tương tự. Ngoài ra, các chất bôi trơn, như magie stearat và bột talc, có thể được sử dụng ngoài các tá dược đơn giản. Dược phẩm lỏng để dùng qua đường miệng tương ứng với huyền phù, chất lỏng để dùng bên trong, nhũ tương, sirô, và các chất tương tự, và có thể bao gồm các chất pha loãng đơn giản mà được sử dụng thường xuyên, như nước và parafin lỏng, và một số tá dược, như tác nhân tạo ẩm, chất tạo ngọt, chất tạo hương thơm, và chất bảo quản. Dược phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch nước vô trùng, dung môi không chứa nước, huyền phù, nhũ tương, chất làm đông khô, và thuốc đạn. Dung môi và huyền phù không chứa nước có thể bao gồm propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật như dầu ô liu, este tiêm được như etylolat, và các dung môi tương tự. Nguyên liệu nền dùng cho viên đạn có thể bao gồm Witepsol, Macrogol, Tween 61, bơ cacao, bơ laurin, glyxerogelatin, và các nguyên liệu tương tự.

Liều của dược phẩm có thể thay đổi tùy thuộc vào độ tuổi, giới tính, và cân nặng của đối tượng được điều trị, bệnh cụ thể hoặc tình trạng bệnh lý cần được điều trị, mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý, đường dùng, và xác định của bác sĩ kê đơn. Việc xác định liều dựa vào các yếu tố này thuộc phạm vi hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và liều thông thường nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 đến 500 mg/kg/ngày. Liều tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100 mg/kg/ngày. Việc dùng có thể được thực hiện một lần một ngày hoặc vài lần với các liều nhỏ trong một ngày. Liều trên không dự định làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Dược phẩm có thể được sử dụng cho các động vật có vú, như chuột cống, động vật nuôi trong nhà, và người thông qua các đường dùng khác nhau. Tất cả các cách dùng có thể được tính trước, và ví dụ, việc dùng có thể được thực hiện thông qua đường miệng, qua trực tràng, tiêm trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, trong dạ con, trong não

thất.

Hiệu quả của sáng chế

Dược phẩm chứa dạng đa hình tinh thể a của tetraarsen hexoxit với lượng bằng 99% hoặc lớn hơn để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư vú của sáng chế có tác dụng chống ung thư vượt trội.

Ngoài ra, dược phẩm của sáng chế được xác nhận là có tác dụng ức chế di căn ung thư vú.

Cách thức thực hiện sáng chế

Sau đây, các ví dụ ưu tiên của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ được mô tả ở đây, và như vậy có thể được kết hợp thành các dạng khác nhau. Hơn nữa, các ví dụ này được đưa ra sao cho phần mô tả sẽ sẽ trọn vẹn và hoàn chỉnh, và sẽ chuyển tải đầy đủ phạm vi của sáng chế cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Điều chế hợp chất tetraarsen hexoxit

Bình phản ứng tổng hợp (chiều cao 100 mm và đường kính 190 mm) được sản xuất đặc biệt bằng cách sử dụng cao lanh và ba đến sáu bản kẹp có khả năng lắp các thiết bị lọc trên thiết bị đã được chuẩn bị. Bản kẹp thứ nhất được lắp đặt ở khoảng cách bằng 50 mm từ bình phản ứng tổng hợp, và các bản kẹp từ thứ 2 đến thứ 6 được lắp đặt ở trên bản kẹp thứ nhất ở khoảng cách bằng từ 2 đến 6 mm từ bản kẹp thứ nhất, và kích thước của mỗi bản kẹp có đường kính 210mm và độ dày 10mm.

Muối thô cân nặng 400-600 g (hàm lượng hơi ẩm bằng 10% hoặc nhỏ hơn) được đưa vào bình phản ứng tổng hợp, và sau đó được trải đều và được đóng gói thành độ dày khoảng 20 mm. Bình phản ứng tổng hợp được gia nhiệt từ từ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100 đến 800°C trong 3 giờ, và được gia nhiệt liên tục sao cho nhiệt độ bề mặt

của muối bên trong bình phản ứng này bằng $290\pm 30^{\circ}\text{C}$, bằng cách này loại được hơi ẩm và các tạp chất. Sau đó, tiến hành làm lạnh ở nhiệt độ trong phòng trong 5 giờ.

Sau đó, 100 g nguyên liệu, As_2O_3 (độ tinh khiết bằng 98% hoặc cao hơn, được chuẩn bị bởi YUNNAN WENSHAN JINCHI ARSENIC CO., LTD.) được đặt lên trên muối thô bên trong bình phản ứng tổng hợp, và các thiết bị lọc (các tầng lọc) có khả năng thu gom arsen thăng hoa được lắp lên trên ba đến sáu bàn kẹp được lắp đặt ở trên bình phản ứng tổng hợp sao cho các khoảng cách giữa các thiết bị lọc bằng 2 đến 6 mm. Các thiết bị lọc được sử dụng ở đây tốt hơn là có trọng lượng tối thiểu nằm trong khoảng từ 70 đến 100 g/m², độ dày nằm trong khoảng từ 0,17 đến 0,25 mm, tốc độ lọc nằm trong khoảng từ 22 đến 30 giây/100 ml, và tỷ lệ lưu giữ nằm trong khoảng từ 5 đến 10 μm .

Các thiết bị lọc được lắp cố định bằng cách sử dụng các kẹp, và sau đó áp dụng gia nhiệt vào phần đáy của bình phản ứng tổng hợp để làm tăng từ từ nhiệt độ từ 100°C đến 1.000°C . Trước tiên, phần đáy của bình phản ứng tổng hợp được gia nhiệt trong 1 giờ sao cho nhiệt độ bên ngoài phần đáy của bình phản ứng tổng hợp là nằm trong khoảng $350\pm 100^{\circ}\text{C}$, và sau đó, tiến hành gia nhiệt sao cho nhiệt độ bên ngoài phần đáy của bình phản ứng tổng hợp là nằm trong khoảng từ 600 đến 650°C và nằm trong khoảng từ khoảng 700 đến 1.000°C , chính vì vậy nhiệt độ của phần giữa của tầng lọc cao nhất được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng $150\pm 100^{\circ}\text{C}$ để gia nhiệt trong tổng thời gian là từ 5 đến 10 giờ. Sau đó, tiến hành làm lạnh ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian từ 5 đến 7 giờ. Trong quy trình này, bột As_2O_3 được đặt lên trên muối bên trong bình phản ứng tổng hợp được chuyển thành khí bên trong bình phản ứng tổng hợp, và khí này được chuyển lên trên, và sau đó được chuyển thành chất lỏng vì nhiệt độ phía trên bên ngoài bình phản ứng tổng hợp là tương đối thấp, và sau đó, chất lỏng này được kết tinh dưới dạng chất rắn, và như vậy các tinh thể màu trắng được tạo ra trên các thiết bị lọc.

Các tinh thể màu trắng được thu gom được đặt lên trên muối thô bên trong bình phản ứng tổng hợp, và các quá trình gia nhiệt, làm lạnh, và thu gom tinh thể được lặp lại 4 lần, bằng cách này cuối cùng thu được 12,0 g tinh thể. Do việc kiểm tra cấu trúc của các tinh thể của hợp chất arsen thu được, đã xác nhận được rằng hầu hết các tinh thể là

As₄O₆-a trong khi thu được 99% trọng lượng hoặc lớn hơn là As₄O₆-a và dưới 1% trọng lượng là As₄O₆-b.

Đã xác nhận được rằng đối với giá trị nhiệt quét vi sai (DSC) ở tốc độ tăng nhiệt độ là 10°C/phút, As₄O₆-a thể hiện đỉnh thu nhiệt (điểm nóng chảy) ở nhiệt độ 282,67°C và As₄O₆-b thể hiện đỉnh thu nhiệt (điểm nóng chảy) ở nhiệt độ 286,77°C.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của As₄O₆-a và As₄O₆-b được thể hiện trên FIG. 1, và các số liệu nhiễu xạ của As₄O₆-a và As₄O₆-b được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

[Bảng 2]

As ₄ O ₆ -a		As ₄ O ₆ -b	
2θ (°)	Cường độ nhiễu xạ	2θ (°)	Cường độ nhiễu xạ
13,84	7631,01	13,86	4012,09
27,88	10000	27,92	10000
32,32	2801,74	32,36	2130,23
35,3	3369,82	35,34	2511
39,84	623,242	39,9	447,422
42,38	1551,5	42,44	1431,86
46,34	2345,2	46,4	4159,8
48,6	447,69	48,66	564,995
49,34	502,761	49,4	375,571

Như được xác nhận trên FIG. 1 và trong Bảng 2, tỷ lệ giữa các đỉnh chính được thể hiện ở các trị số 2θ là 13,8 và 27,9 bằng 1:1,3 trong $\text{As}_4\text{O}_6\text{-a}$, và tỷ lệ giữa các đỉnh chính được thể hiện ở các trị số 2θ là 13,8 và 27,9 bằng 1:2,5 trong $\text{As}_4\text{O}_6\text{-b}$. Phân tích DSC, xác định cấu trúc, và phân tích nhiễu xạ tia X của các hợp chất được điều chế được tiến hành theo các phương pháp sau.

(1) Phân tích DSC

Bằng cách sử dụng hệ thống DSC (SDT Q600 V20.9 Build 20), 20,0 mg mẫu được phân tích trong khi tăng nhiệt độ lên đến 310°C với tốc độ tăng nhiệt độ là $10^\circ\text{C}/\text{phút}$ và dòng N_2 chảy ra ở tốc độ $100\text{mL}/\text{phút}$.

(2) Tinh thể học tia X

Các tinh thể đơn của tetraarsen hexoxit (As_4O_6 , $\text{MW}=395,6$) được đặt lên trên sợi thủy tinh và sau đó tác động chùm tia X vào các tinh thể đó, để quan sát các kiểu (mẫu hình) nhiễu xạ trên các phim chụp và sự có mặt hoặc không có mặt của tổ chức các số liệu nhiễu xạ, bằng cách này xác định được các nhóm không gian và các thông số khối cơ bản (ô cơ bản). Cường độ nhiễu xạ được thu thập trong khoảng $10^\circ < 2\theta < 50^\circ$. Cấu trúc tinh thể của As_4O_6 được xác định từ các số liệu theo phương pháp Patterson bằng cách sử dụng chương trình xác định cấu trúc (chương trình SHELXTL).

(3) Nhiễu xạ tia X

Mẫu được chuẩn bị bằng cách tán bột các tinh thể thu được thành các hạt có kích cỡ nằm trong khoảng từ 10 đến $30\ \mu\text{m}$ (cỡ sàng -325), nạp các hạt vào bộ giữ mẫu bằng thủy tinh để phân tích nhiễu xạ tia X ($20\ \text{mm} \times 16\ \text{mm} \times 1\ \text{mm}$), ép các hạt bằng phiến kính hoặc vật tương tự, và dàn mỏng các hạt để cho phép bề mặt mẫu song song với bề mặt bộ giữ mẫu. Phổ nhiễu xạ tia X của các tinh thể được vẽ bằng cách sử dụng $\text{Cu K}\alpha_1$ ($1,54060\ \text{\AA}$) của XRD trong góc nhiễu xạ (2θ) nằm trong khoảng từ 10° đến 50° ở tốc độ $1^\circ/\text{phút}$ (bước quét bằng $0,02^\circ$).

Ví dụ so sánh 1: Điều chế hợp chất tetraarsen hexoxit

Bình phản ứng tổng hợp (chiều cao 100 mm và đường kính 190 mm) được sản xuất đặc biệt bằng cách sử dụng cao lanh và ba đến sáu bàn kẹp có khả năng lắp các thiết bị lọc trên các bàn kẹp đã được chuẩn bị. Bàn kẹp thứ nhất được lắp đặt ở khoảng cách là 50 mm từ bình phản ứng tổng hợp, và các bàn kẹp từ thứ 2 đến thứ 6 được lắp đặt ở trên bàn kẹp thứ nhất ở khoảng cách bằng 2 đến 6 mm tính từ bàn kẹp thứ nhất, và kích thước của mỗi bàn kẹp có đường kính 210 mm và độ dày 10 mm.

Muối thô cân nặng 400-600 g (hàm lượng hơi ẩm 10% hoặc nhỏ hơn) được đưa vào bình phản ứng tổng hợp, và sau đó được trải đều và được đóng gói thành độ dày khoảng 20 mm. Bình phản ứng tổng hợp được gia nhiệt từ từ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100 đến 800°C trong 3 giờ, và được gia nhiệt liên tục sao cho nhiệt độ bề mặt của muối bằng $290 \pm 30^\circ\text{C}$ bên trong bình phản ứng này, bằng cách này loại được hơi ẩm và các tạp chất. Sau đó, tiến hành làm lạnh ở nhiệt độ trong phòng trong 5 giờ.

Sau đó, 100 g nguyên liệu, As_2O_3 (độ tinh khiết bằng 98% hoặc cao hơn, được chuẩn bị bởi YUNNAN WENSHAN JINCHI ARSENIC CO., LTD.) được đặt lên trên muối thô bên trong bình phản ứng tổng hợp, và các thiết bị lọc (các tầng lọc) có khả năng thu gom arsen thăng hoa được lắp trên ba đến sáu bàn kẹp được lắp đặt ở trên bình phản ứng tổng hợp sao cho các khoảng cách giữa các thiết bị lọc bằng từ 2 đến 6 mm. Các thiết bị lọc được sử dụng trong bản mô tả tốt hơn là có trọng lượng tối thiểu bằng 70-100 g/m², độ dày nằm trong khoảng từ 0,17 đến 0,25 mm, tốc độ lọc từ 22 đến 30 giây/100 ml, và tỷ lệ lưu giữ nằm trong khoảng từ 5 đến 10 μm .

Các thiết bị lọc được lắp cố định bằng cách sử dụng các kẹp, và sau đó áp dụng gia nhiệt vào phần đáy của bình phản ứng tổng hợp để làm tăng từ từ nhiệt độ từ 100°C đến 1.000°C. Trước tiên, phần đáy của bình phản ứng tổng hợp được gia nhiệt trong 1 giờ sao cho nhiệt độ bên ngoài phần đáy của bình phản ứng tổng hợp là nằm trong khoảng $350 \pm 100^\circ\text{C}$, và sau đó, tiến hành gia nhiệt sao cho nhiệt độ bên ngoài phần đáy của bình phản ứng tổng hợp là nằm trong khoảng từ 600 đến 650°C và nằm trong khoảng từ khoảng 700 đến 1.000°C, sao cho nhiệt độ của phần giữa của tầng lọc cao nhất được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng $150 \pm 100^\circ\text{C}$ để gia nhiệt trong khoảng thời gian tổng

cộng là từ 5 đến 10 giờ. Sau đó, tiến hành làm lạnh ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian từ 5 đến 7 giờ. Trong quy trình này, bột As_2O_3 được đặt lên trên muối bên trong bình phản ứng tổng hợp được chuyển thành khí bên trong bình phản ứng tổng hợp, và khí này được chuyển lên, và sau đó được chuyển thành chất lỏng vì nhiệt độ phía trên bên ngoài bình phản ứng tổng hợp là tương đối thấp, và sau đó, chất lỏng này được kết tinh dưới dạng chất rắn, và như vậy các tinh thể màu trắng được tạo ra trên các thiết bị lọc. 48,5 g tinh thể được thu gom từ các thiết bị lọc. Do việc kiểm tra cấu trúc tinh thể của các hợp chất arsen đã được thu gom, đã xác nhận được rằng As_4O_6 -b chiếm 99% hoặc lớn hơn.

Ví dụ so sánh từ 2 đến 4: Điều chế hợp chất tetraarsen hexoxit

Các hợp chất ở các ví dụ so sánh 2 và 3 đã được điều chế bằng cách trộn hợp chất Ví dụ 1 (được phẩm có dạng đa hình tinh thể As_4O_6 -a với lượng bằng 99% hoặc lớn hơn) và hợp chất Ví dụ so sánh 1 (được phẩm có dạng đa hình tinh thể As_4O_6 -b với lượng bằng 99% hoặc lớn hơn) lần lượt theo tỷ lệ là 4:1 và 1:1.

Ví dụ thử nghiệm 1: Thử nghiệm đối với các tác dụng ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư vú ở người

(1) Các nguyên liệu và môi trường nuôi cấy tế bào

Huyết thanh bào thai bò (FBS) và môi trường nuôi cấy tế bào đã được chuẩn bị (Hyclone), và dimetyl sulfoxit (DMSO) và 3-(4,5-dimetyl-thiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoli bromua (MTT, Amresco LLC, USC) đã được chuẩn bị.

Về dòng tế bào ung thư ở người, các dòng tế bào ung thư vú MCF-7 và SK-BR-3 thu được từ Ngân hàng Tế bào Thượng Hải thuộc Học viện Khoa học Trung Hoa (Shanghai Cell Bank of Chinese Academy of Sciences). Tế bào MCF-7 được ủ với môi trường cần thiết tối thiểu (MEM) có bổ sung 10% FBS, 100 U/ml penicillin, và 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin và tế bào SK-BR-3 được ủ trong môi trường Eagle cải tiến của Dulbecco (DMEM) có bổ sung 10% FBS, 100 U/ml penicillin, và 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

streptomycin trong thiết bị ủ ẩm có 5% CO₂ và 95% không khí. Môi trường này được thay đổi cứ ba ngày một lần.

(2) Thử nghiệm tăng sinh tế bào (thử nghiệm MTT):

Các tác dụng của hợp chất Ví dụ 1 và hợp chất ví dụ so sánh từ 1 đến 3 đối với sự tăng sinh tế bào được đánh giá bằng thử nghiệm MTT. Thử nghiệm MTT dựa trên khả năng các tế bào sống được chống lại MTT để tạo ra các sản phẩm formazan màu xanh da trời sẫm không tan. Sau khi các tế bào được tạo huyền phù trong môi trường bằng cách xử lý bằng trypsin và được thu gom, các tế bào được phân phối ở mật độ bằng 4×10^3 tế bào/lỗ trong đĩa nuôi cấy có 96 lỗ (Costar, Cambridge, MA, Mỹ). Sau 24 giờ, bổ sung hợp chất ví dụ 1 và hợp chất ví dụ so sánh từ 1 đến 3 làm mẫu xử lý, ở nồng độ 0, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40, hoặc 80 μ M, vào các tế bào trong môi trường chứa 10% FBS, và sau đó các tế bào này được ủ. Hợp chất Ví dụ 1 và hợp chất ví dụ so sánh từ 1 đến 3 được hòa tan ở mức 5×10^{-2} M trong natri hydroxit 1 M làm dung dịch gốc. Sau khi các tế bào được ủ trong 48 giờ, và 72 giờ, tiến hành thử nghiệm MTT đối với sự tăng sinh tế bào, và các dịch nổi được loại bỏ ở cuối của mỗi lần dừng. Sau đó, bổ sung 20 μ l dung dịch MTT 5 mg/mL vào mỗi lỗ, và các tế bào được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 4 giờ để tạo thành các tinh thể formazan. Sau khi ủ, một lần nữa các dịch nổi được loại bỏ, tiếp theo là bổ sung 100 μ l DMSO vào từng lỗ, và sau đó tiến hành trộn để hòa tan hoàn toàn các tinh thể màu xanh da trời sẫm. Tất cả các tinh thể được hòa tan hoàn toàn bằng cách để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút, và độ hấp thụ được đo bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa đa lỗ ở bước sóng bằng 570nm (A_{570nm}).

(3) Phân tích thống kê:

Giá trị hấp thụ của nhóm đối chứng đã được xử lý mà không có mẫu được tính bằng 100, và giá trị hấp thụ của nhóm xử lý đã được xử lý bằng mẫu này, so với mẫu của nhóm đối chứng, đã được định cỡ, và phần trăm ức chế sự tăng sinh tế bào được tính theo phương trình sau.

Phần trăm (%) ức chế sự tăng sinh tế bào = ((độ hấp thụ trung bình của các tế bào

nhóm đối chứng – độ hấp thụ trung bình của các tế bào nhóm xử lý)/độ hấp thụ trung bình của các tế bào nhóm đối chứng) $\times 100$.

Tất cả các số liệu được tính bằng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn của giá trị trung bình (trung bình $\pm$ SEM). Phân tích phương sai (ANOVA) đơn giản (một yếu tố) tiếp theo sau thử nghiệm Dunnett được sử dụng để tiến hành so sánh nhiều lần. Giá trị thống kê được xác định bằng $p < 0,05$, và mỗi thử nghiệm được lặp lại ba lần.

(4) Các kết quả của thử nghiệm bằng cách sử dụng dòng tế bào MCF-7

Dòng tế bào ung thư vú ở người MCF-7 đã được xử lý (điều trị) bằng hợp chất Ví dụ 1 và hợp chất ví dụ so sánh từ 1 đến 3, và được ủ trong 48 và 72 giờ, tiếp theo là thử nghiệm MTT. Các kết quả được thể hiện trên FIG. 2. Đã xác nhận được rằng phần trăm ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư vú MCF-7 là cao hơn khi điều trị bằng hợp chất Ví dụ 1 và sau đó ủ trong 48 giờ (FIG. 2A) và 72 giờ (FIG. 2B) so với điều trị bằng hợp chất ví dụ so sánh 1. Cũng đã xác nhận được rằng phần trăm ức chế sự tăng sinh tế bào MCF-7 là cao hơn ở hợp chất ví dụ 1 so với hợp chất Ví dụ so sánh 2 hoặc 3 trong đó hợp chất Ví dụ 1 và hợp chất Ví dụ so sánh 1 được trộn theo tỷ lệ 4:1 hoặc 1:1.

(5) Các kết quả thử nghiệm có sử dụng các tế bào SK-BR-3

Dòng tế bào ung thư vú ở người SK-BR-3 được xử lý bằng hợp chất Ví dụ 1 và hợp chất ví dụ so sánh từ 1 đến 3, và được ủ trong 48 và 72 giờ, tiếp theo là thử nghiệm MTT. Các kết quả được thể hiện trên FIG. 3. Đã xác nhận được rằng phần trăm ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư vú SK-BR-3 là cao hơn khi điều trị bằng hợp chất Ví dụ 1 và sau đó ủ trong 48 giờ (FIG. 3A) và 72 giờ (FIG. 3B) so với điều trị bằng hợp chất ví dụ so sánh 1. Cũng đã xác nhận được rằng phần trăm ức chế sự tăng sinh tế bào SK-BR-3 là cao hơn ở hợp chất ví dụ 1 so với hợp chất Ví dụ so sánh 2 hoặc 3 trong đó hợp chất Ví dụ 1 và hợp chất Ví dụ so sánh 1 được trộn theo tỷ lệ 4:1 hoặc 1:1.

Ví dụ thử nghiệm 2: Thử nghiệm về tác dụng cảm ứng sự chết tế bào ung thư vú ở người

(1) Các nguyên liệu và môi trường nuôi cấy tế bào

Huyết thanh bào thai bò (FBS) và môi trường nuôi cấy tế bào đã được chuẩn bị (Hyclone). RT-PCR Kit và Trizol được thu từ Takara Biotechnology CO., LTD., và Annexin V-FITC được thu từ Shanghai Biyuntian Biological Technology Co., LTD. Các môi được thiết kế vào tổng hợp bởi Beijing Aodingkangsheng Biological Technology Co., LTD.

Tế bào ung thư vú ở người MCF-7, là dòng tế bào ung thư ở người, được thu từ Ngân hàng Tế bào Thượng Hải thuộc Học viện Khoa học Trung Hoa. Tế bào MCF-7 được ủ trong môi trường cần thiết tối thiểu (MEM) có bổ sung 10% FBS, 100 U/ml penicillin, và 100 µg/ml streptomycin trong thiết bị ủ ẩm có 5% CO₂ và 95% không khí. Môi trường này được thay đổi cứ ba ngày một lần.

(2) Đo đếm tế bào dạng dòng

Tác dụng của hợp chất ví dụ 1 đến việc cảm ứng sự chết tế bào theo chương trình được đánh giá bằng phép đo đếm tế bào dạng dòng. Tế bào được phân tán ở nồng độ 1×10^5 tế bào/lỗ trong đĩa nuôi cấy 6 lỗ, và được ủ trong 24 giờ. Sau 24 giờ, tế bào chứa trong MEM có 10% FBS được xử lý bằng hợp chất ví dụ 1 ở 0, 1, 3, 6, 9, 12 hoặc 15 µM, và được ủ trong 24 giờ. Sau 24 giờ, tế bào được xử lý bằng kit Annexin V-FITC để kiểm tra sự chết tế bào theo chương trình, và cũng được xử lý bằng propidi iodua (PI) để phân biệt với sự chết tế bào tự nhiên. Ở đây, các thử nghiệm được thực hiện theo các phương pháp sử dụng của kit PI và Annexin V-FITC. Tế bào được xử lý bằng kit Annexin V-FITC được phân tích về mức độ chết tế bào theo chương trình bằng hệ thống đo đếm tế bào dạng dòng BD FACS. Kết quả được thể hiện trên FIG. 4. Từ kết quả phân tích bằng phép đo đếm tế bào dạng dòng (4A) trên tế bào được xử lý bằng hợp chất ví dụ 1 và tiếp theo được đánh dấu bằng annexin V và PI và kết quả nghiên cứu tỷ lệ chết tế bào theo chương trình (4B) bằng cách phân tích lượng annexin V so với PI, xác nhận được rằng mức độ chết tế bào theo chương trình gia tăng theo sự gia tăng nồng độ xử lý của hợp chất ví dụ 1.

(3) Phản ứng chuỗi sử dụng polymeraza phiên mã ngược (RT-PCR)

Để nghiên cứu tác dụng của hợp chất ví dụ 1 đến việc cảm ứng sự chết tế bào theo chương trình, mức biểu hiện ARN thông tin của caspase-3, p21, cyclin E1, và cyclin A2, là các gen tham gia vào chu trình tế bào và sự chết tế bào theo chương trình, được kiểm tra bằng RT-PCR. Tế bào được phân tán ở nồng độ 1×10^5 tế bào/lỗ trong đĩa nuôi cấy 6 lỗ, và được ủ trong 24 giờ. Sau 24 giờ, tế bào chứa trong MEM có 10% FBS được xử lý bằng hợp chất ví dụ 1 ở 0, 1, 3, 6, 9, 12 hoặc 15 μM , và được ủ trong 24 giờ. Sau 24 giờ, tế bào được thu gom, và tiếp theo ARN được chiết bằng chất phản ứng Trizol. Khuếch đại gen được thực hiện bằng cách sử dụng các môi trong Bảng 3 dưới đây và kit RT-PCR trong khi ARN chiết được sử dụng làm khuôn, và tiếp theo sự thay đổi về mức biểu hiện ARN thông tin của caspase 3, p21, cyclin E1, và cyclin A2 được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarosa. Kết quả được thể hiện trên FIG. 5. Ở đây, mức biểu hiện của β -actin cũng được kiểm tra dưới dạng nhóm đối chứng tải. Nhờ xử lý bằng hợp chất ví dụ 1, mức biểu hiện ARN thông tin của p21 và cyclin E1, là các gen điều hòa chu trình tế bào liên quan đến sự chết tế bào theo chương trình, và caspase-3, là gen tham gia vào sự chết tế bào theo chương trình, gia tăng theo sự gia tăng nồng độ của hợp chất ví dụ 1, trong khi mức biểu hiện ARN thông tin của cyclin A2, là nhân tố điều hòa chu trình tế bào tham gia vào sự tăng sinh tế bào, lại giảm.

Do đó, có thể thấy rằng tetraarsen hexoxit của ví dụ 1 có thể điều trị bệnh ung thư vú bằng cách cảm ứng quá trình chết theo chương trình của các tế bào ung thư vú.

[Bảng 3]

Gen	Các trình tự môi (5' $\rightarrow$ 3')	Chiều dài khuếch đại (bp)
β -actin	Môi ngược: TGACGTGGACATCCGCAAAG Môi xuôi:	206

	CTGGAAGGTGGACAGCGAGG	
p21	Mỗi ngược: ACATCTTCTGCCTTAGTCTCA Mỗi xuôi: GCCCCTTCAAAGTGCCATC	426
Caspase-3	Mỗi ngược: TGGCAACAGAATTTGAGTCCT Mỗi xuôi: GCAGTTAAGTCATCCGTGTAT	596
Cyclin E1	Mỗi ngược: GCCTTGTATCATTTCTCGTCAT Mỗi xuôi: CTCTGCTTCTTACCGCTCT	305
Cyclin A2	Mỗi ngược: GTAAACAGCCTGCGTTCACC Mỗi xuôi: ACTTCAACTAACCAGTCCACGAG	382

Ví dụ thử nghiệm 3: Nghiên cứu tác dụng ức chế di căn ung thư vú

Chuột nhắt trần babl/c-nu được 5 tuần tuổi, không có tác nhân gây bệnh đặc hiệu và bệnh hô hấp và có thể trọng 18-20 g, được sử dụng làm động vật thí nghiệm. Chuột nhắt trần này được tự do tiếp cận thức ăn và nước, và được lấy máu theo chu kỳ sáng 12 giờ/tối 12 giờ trong 7 ngày.

Chuột được cấy tế bào ung thư vú của người, MDA-MB-231, bằng cách tiêm dưới da, và lấy máu trong 7 ngày. Sau 7 ngày, các chuột được phân chia ngẫu nhiên, và tiếp theo các chuột tương ứng được dùng qua đường miệng các dược phẩm của ví dụ 1 và Ví dụ so sánh 1 ở liều 4,5 mg/kg trong 7 ngày. Ở đây, các chuột không được điều trị sau khi dùng tế bào ung thư vú được dùng làm nhóm đối chứng. Sau 7 ngày dùng được

phẩm, mô phổi được lấy từ chuột, và tiếp theo các tế bào lây lan tới phổi được đếm để so sánh mức độ ức chế di căn ung thư vú.

Kết quả là, xác nhận được rằng hầu hết các tế bào ung thư vú được cấy đều lây lan đến phổi trong nhóm đối chứng không được điều trị sau khi cấy tế bào ung thư vú, trong khi sự lây lan tế bào ung thư vú đến phổi bị ức chế trong các nhóm được điều trị bằng hợp chất Ví dụ so sánh 1 và Ví dụ 1. Đặc biệt xác nhận được rằng hợp chất Ví dụ 1 cho thấy tỷ lệ phần trăm ức chế di căn tế bào ung thư 90% hoặc lớn hơn, chỉ ra tác dụng ức chế di căn ung thư cao đáng kể so với Ví dụ so sánh 1 thể hiện tỷ lệ phần trăm ức chế di căn tế bào ung thư 50%.

Ví dụ thử nghiệm 4: Thử nghiệm lâm sàng

Các thử nghiệm lâm sàng dưới đây được thực hiện có sử dụng được phẩm của Ví dụ 1.

Bệnh nhân tiếp nhận điều trị tại bệnh viện và điều trị thông thường khi bệnh ung thư vú được phát hiện vào năm 2006, nhưng bệnh ung thư vú đã di căn đến phổi, màng phổi, xương và gan. Vào tháng 5-2014, tràn dịch màng phổi và dịch màng bụng được phát hiện, và do đó tràn dịch màng phổi được hút vài lần. Tuy nhiên, do khó thở nghiêm trọng gây ra bởi tràn dịch màng phổi ác tính, bệnh nhân phải thở qua hệ thống hô hấp oxy trong phòng cấp cứu và hồi sức cấp cứu. Tuy nhiên, bệnh nhân bắt đầu xanh xao do thiếu oxy, và bệnh nhân này, được chẩn đoán sống thêm một tuần nữa, được dùng qua đường miệng 5 mg hợp chất Ví dụ 1 ba lần mỗi ngày (15 mg/ngày).

Ảnh CT của bệnh nhân trước khi dùng hợp chất Ví dụ 1 và sau 8, 13, 17 và 22 tháng dùng hợp chất Ví dụ 1 được thể hiện trên FIG. 6. Trước khi dùng hợp chất Ví dụ 1, đường thở bị đóng do di căn đến phổi phải và phổi trái, nhưng sau 8, 13, 17, và 22 tháng dùng, kích thước khối u trong cả hai lá phổi đều giảm khi thời gian dùng tăng lên.

Xác nhận được qua các kết quả lâm sàng rằng được phẩm theo sáng chế có tác dụng điều trị bệnh ung thư vú di căn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm chứa tetraarsen hexoxit (As_4O_6) làm hoạt chất để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư vú, trong đó tetraarsen hexoxit chứa dạng đa hình tinh thể a của tetraarsen hexoxit với lượng bằng 99% trọng lượng hoặc lớn hơn có các dấu hiệu từ (i) đến (iii) dưới đây:

(i) Các thông số khối cơ bản:

$$a = b = c = 11,0734 \text{ \AA}$$

$$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$$

$$V = 1357,82 \text{ \AA}^3$$

(ii) Độ dài liên kết As-O: 1,786 \AA

(iii) Góc liên kết O-As-O: 98,36°, và

trong đó tetraarsen hexoxit được điều chế bằng các bước:

bước đầu tiên là gia nhiệt natri clorua ở nhiệt độ 100~800°C, sau đó là làm lạnh;

bước thứ hai là đặt arsen trioxit (As_2O_3) lên trên natri clorua, sau đó gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 1000°C ở trạng thái kín khí và sau đó làm lạnh;

bước thứ ba là tách các tinh thể được kết tinh ở tầng lọc bằng cách thu gom arsen thăng hoa; và

bước thứ tư là lặp lại bước thứ hai và thứ ba bốn đến mười lần có sử dụng các tinh thể thu được ở bước thứ ba thay cho arsen trioxit ở bước thứ hai, nhờ đó thu được các tinh thể tetraarsen hexoxit.

2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó tetraarsen hexoxit có độ tinh khiết 99,9% hoặc lớn hơn.

3. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó trong phổ nhiễu xạ bột tia X của dạng đa hình tinh thể a, thu được bằng cách sử dụng bước sóng nguồn sáng 1,5406 Å trong góc nhiễu xạ (2θ) bằng 10° đến 50° ở tốc độ $1^\circ/\text{phút}$ (bước quét bằng $0,02^\circ$), các đỉnh được thể hiện ở các trị số 2θ là 13,84, 27,88, 32,32, 35,3, 39,84, 42,38, 46,34, 48,6, và 49,34.

4. Dược phẩm chứa tetraarsen hexoxit (As_4O_6) làm hoạt chất để ức chế di căn ung thư vú, trong đó tetraarsen hexoxit chứa dạng đa hình tinh thể a của tetraarsen hexoxit với lượng bằng 99% trọng lượng hoặc lớn hơn có các dấu hiệu từ (i) đến (iii) dưới đây:

(i) Các thông số khối cơ bản:

$$a = b = c = 11,0734 \text{ Å}$$

$$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$$

$$V = 1357,82 \text{ Å}^3$$

(ii) Độ dài liên kết As-O: 1,786 Å

(iii) Góc liên kết O-As-O: $98,36^\circ$, và

trong đó tetraarsen hexoxit được điều chế bằng các bước:

bước đầu tiên là gia nhiệt natri clorua ở nhiệt độ $100\sim 800^\circ\text{C}$, sau đó là làm lạnh;

bước thứ hai là đặt arsen trioxit (As_2O_3) lên trên natri clorua, sau đó gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 1000°C ở trạng thái kín khí và sau đó làm lạnh;

bước thứ ba là tách các tinh thể được kết tinh ở tầng lọc bằng cách thu gom arsen thăng hoa; và

bước thứ tư là lặp lại bước thứ hai và thứ ba bốn đến mười lần có sử dụng các tinh thể thu được ở bước thứ ba thay cho arsen trioxit ở bước thứ hai, nhờ đó thu được các tinh thể tetraarsen hexoxit.

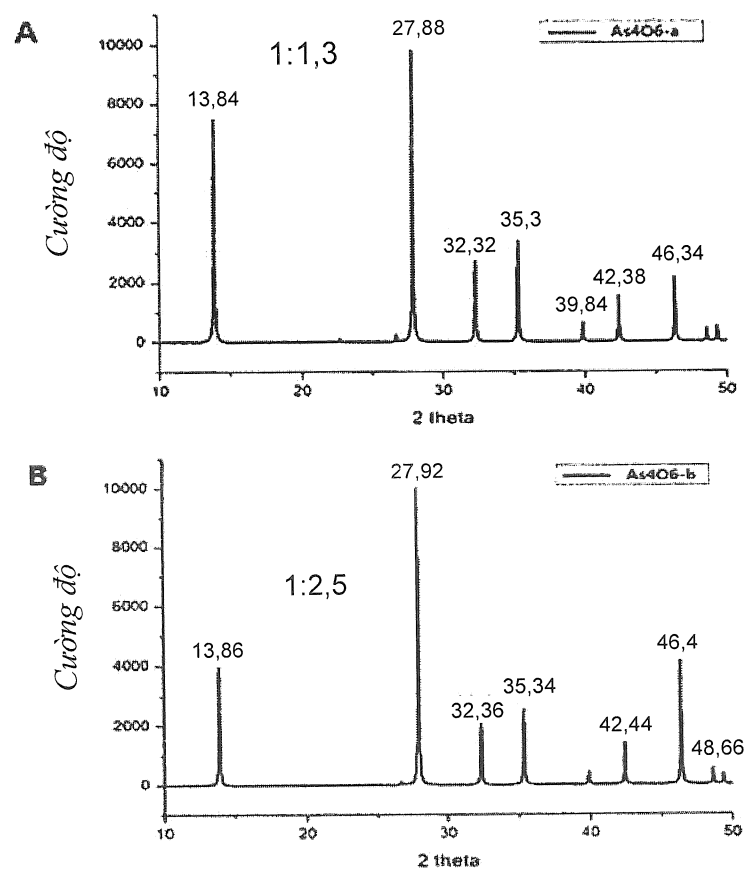


FIG. 1

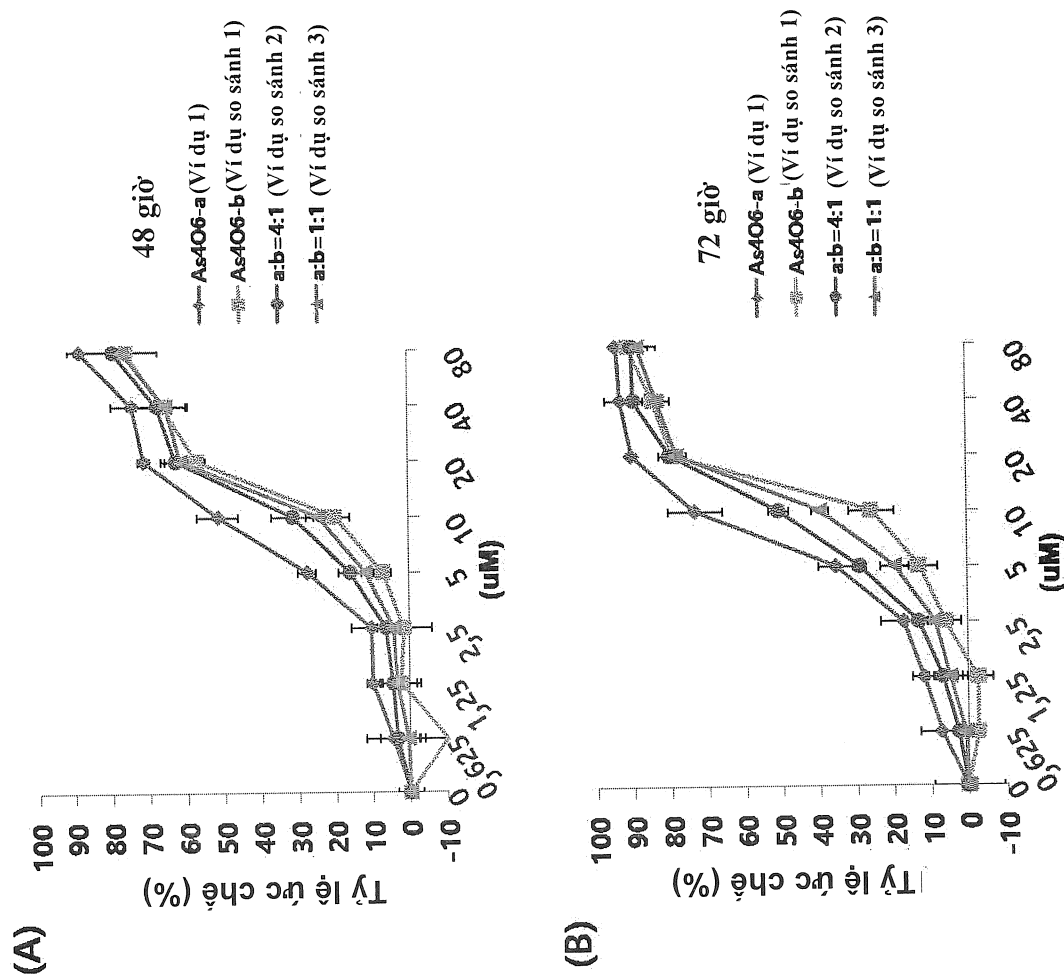


FIG. 2

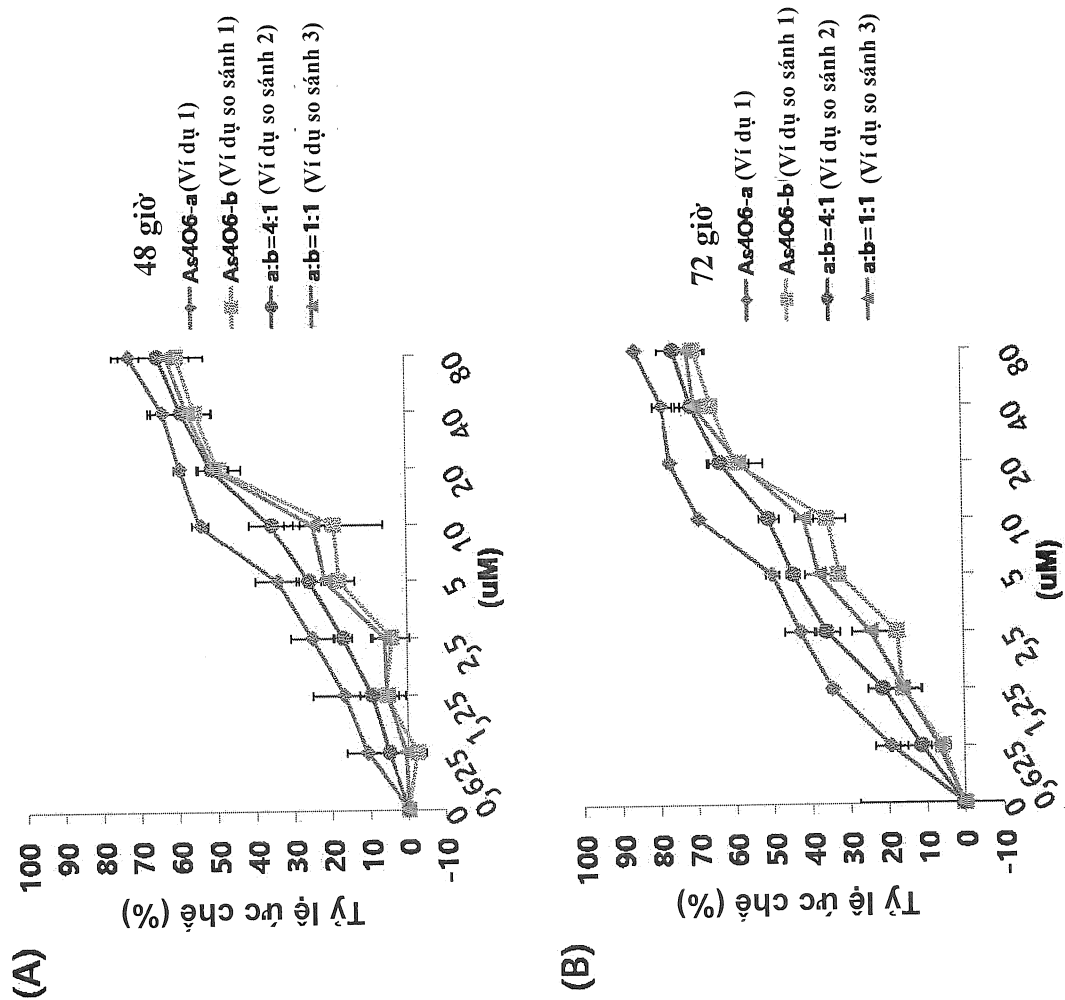


FIG. 3

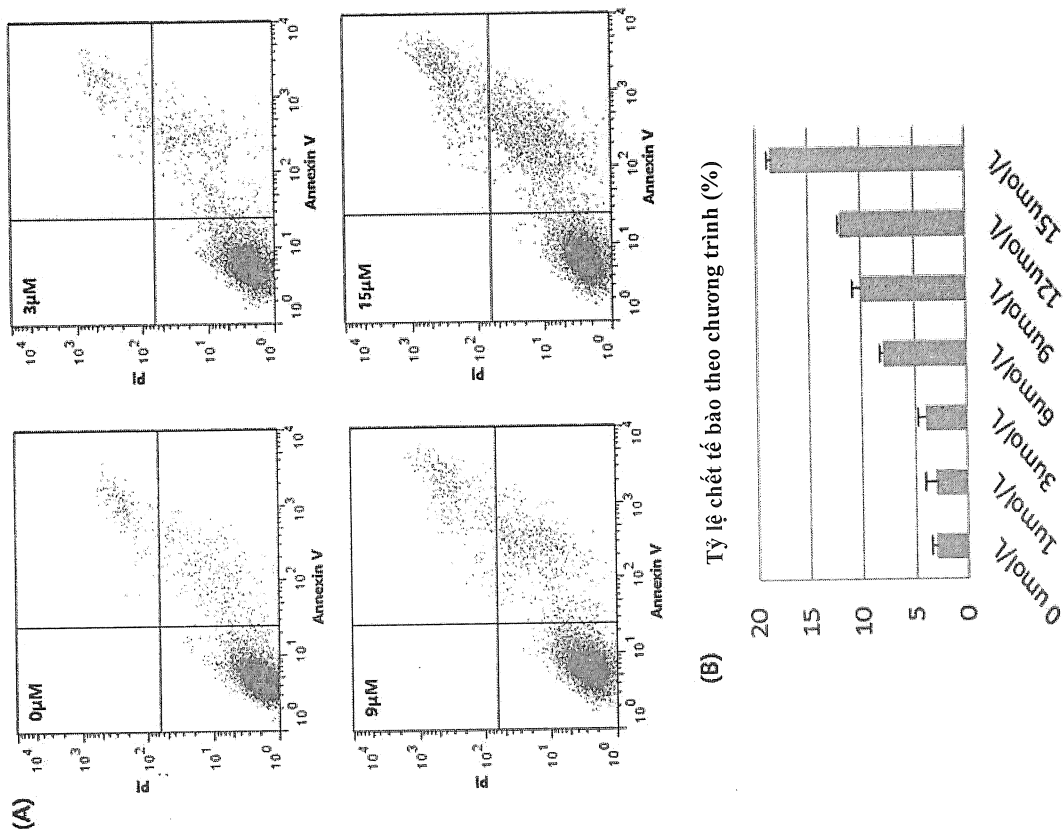


FIG. 4

$As_4O_6(\mu M)$ 0 3 6 9 12 15

