



(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)



1-0035169

(51)⁷ A61K 33/36; A61K 31/285

(13) B

(21) 1-2019-02550

(22) 07/09/2017

(86) PCT/KR2017/009820 07/09/2017

(87) WO 2018/093029 24/05/2018

(30) 10-2016-0154409 18/11/2016 KR

(45) 25/04/2023 421

(43) 26/08/2019 377A

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

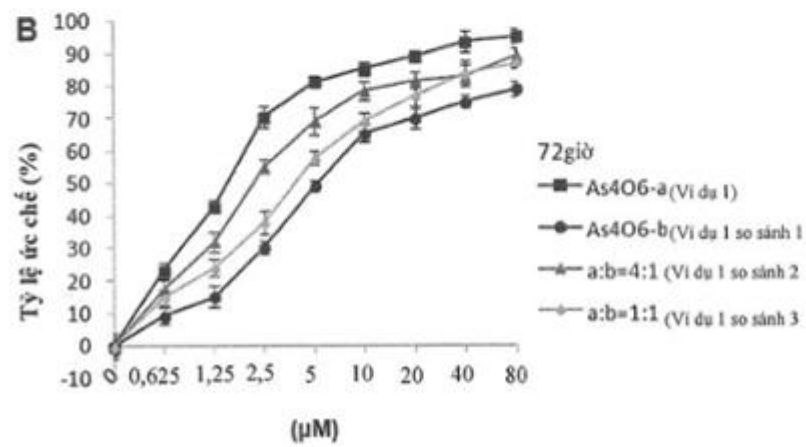
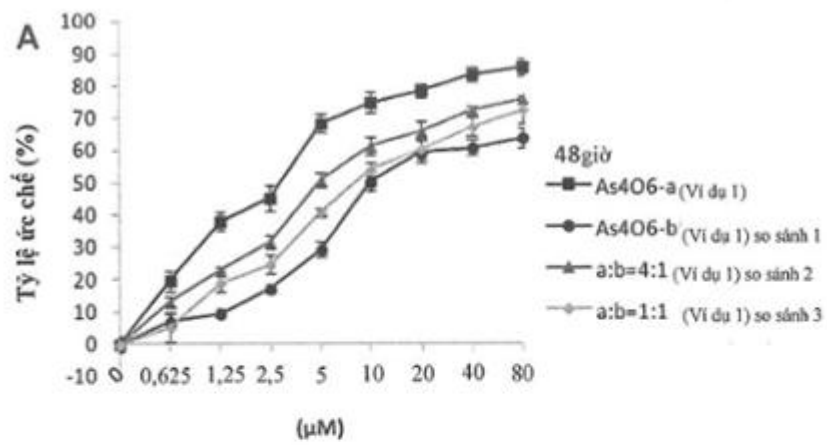
3rd Fl. 502, Bongeunsa-ro, Gangnam-gu, Seoul 06163, Republic of Korea

(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 VÀ ĐIỀU TRỊ BỆNH UNG THƯ NÃO, VÀ
PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ DƯỢC PHẨM NÀY

(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 não, 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 mỹ mãn, 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 não.

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 sự tạo u. 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.

Đặc biệt là, bệnh ung thư não (khối u não ác tính) gây tổn hại lớn đến não, và tỷ lệ sống sót của những bệnh nhân bị bệnh ung thư não là rất thấp. Việc cắt bỏ khối u bằng phẫu thuật có hiệu quả nhất trong những phương pháp trị liệu hiện nay đối với bệnh ung thư não. Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp, việc phẫu thuật không thể thực hiện được tùy thuộc vào loại hoặc vị trí của ung thư não, và việc cắt bỏ hoàn toàn sẽ dẫn đến nguy cơ rất cao gây ra những biến chứng sau phẫu thuật. Ngoài ra, não có hàng rào máu não (BBB) mà làm ức chế sự thâm nhiễm của các thuốc, và như vậy để điều trị bệnh ung thư não thông qua phương pháp hóa trị liệu bằng cách sử dụng các thuốc chống ung thư, thì cần phải sử dụng nồng độ thuốc chống ung thư cao hơn so với các bệnh ung thư khác, điều này gây ra các tác dụng phụ nghiêm trọng ở các cơ quan khác của cơ thể.

Do đó, liên quan đến việc điều trị bệnh ung thư não, vẫn tiếp tục cần phải có các tác nhân trị liệu có tác dụng chống ung thư mỹ mãn và không gây khó

khẩn trong việc đi qua BBB.

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 cho thấy có tác dụng ức chế di căn ung thư trong các thử nghiệm ở động vật và có tác dụng điều trị chống ung thư mỹ mãn khi được sử dụng cho những bệnh nhân 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) giai đoạn cuối .

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 nhiều 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 não, và hoàn thành sáng chế này.

Trong khi đó, trước đây đã được báo cáo rằng tetraarsen hexoxit đã kích thích sự ức chế của sự xâm lấn tế bào u thần kinh đệm ác tính (J Neurosurg 121: 1483-1491, 2014), nhưng tài liệu này không bộc lộ loại dạng đa hình tinh thể nào của tetraarsen hexoxit có tác dụng đó, và đã xác nhận được rằng được phẩm chứa dạng đa hình tinh thể a của tetraarsen hexoxit với lượng bằng 99% hoặc nhiều hơn, được bào chế bằng phương pháp bào chế theo sáng chế, có tác dụng điều trị bệnh ung thư não tốt hơn so với tetraarsen hexoxit được bộc lộ trong tài liệu ở trên.

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 thành phần hoạt tính để ngăn ngừa hoặc

điều trị bệnh ung thư não.

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 thành phần hoạt tính để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư não.

Giải pháp kỹ thuật

Sáng chế hướng đến được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư não, 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 nhiều hơn.

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

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

$\text{As}_4\text{O}_6\text{-a}$ và $\text{As}_4\text{O}_6\text{-b}$ có thể có các đặc điểm 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 tham số tế bào	$a = b = c = 11,0734 \text{ \AA}$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ $V = 1357,82 \text{ \AA}^3$	$a = b = c = 11,0600 \text{ \AA}$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ $V = 1352,90 \text{ \AA}^3$
(ii) Độ dài liên kết As-O	1,786 $\text{\AA}$	2,011 $\text{\AA}$
(iii) Góc liên kết O-As-O	98,36°	109,47°

As_4O_6 -a có dạng tinh thể, trong đó phổ nhiễu xạ bột tia X thu được bằng cách sử dụng bước sóng nguồn sáng bằng 1,5406 Å trong góc nhiễu xạ (2θ) nằm trong khoảng từ 10° đến 50° ở tốc độ $1^\circ/\text{phút}$ (bước quét bằng $0,02^\circ$) thể hiện đỉnh ở trị số 2θ bằng 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 giữa các đỉnh chính được thể hiện ở các trị số 2θ là 13,8 và 27,9 bằng 1:1,3.

As_4O_6 -b có dạng tinh thể, trong đó phổ nhiễu xạ bột tia X thu được bằng cách sử dụng bước sóng nguồn sáng bằng 1,5406 Å trong góc nhiễu xạ (2θ) nằm trong khoảng từ 10° đến 50° ở tốc độ $1^\circ/\text{phút}$ (bước quét bằng $0,02^\circ$) thể hiện đỉnh ở các trị số 2θ bằng 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 giữa các đỉnh chính được thể hiện ở các trị số 2θ là 13,8 và 27,9 bằng 1:2,5.

Theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, sáng chế đề xuất được phẩm chứa dạng đa hình tinh thể của tetraarsen hexoxit (As_4O_6) làm thành phần hoạt tính để ức chế di căn ung thư não, trong đó tetraarsen hexoxit chứa dạng đa hình tinh thể a của tetraarsen hexoxit với lượng bằng 99% hoặc nhiều hơn.

Theo một khía cạnh khác nữa 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 thành phần hoạt tính để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư não, phương pháp này bao gồm các bước:

bước thứ nhất gia nhiệt natri clorua ở nhiệt độ nằm trong khoảng $100\sim 800^\circ\text{C}$, sau đó là làm lạnh;

bước thứ hai là đặt arsen trioxit (As_2O_3) lên trên natri clorua, sau đó 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;

bước thứ ba là tách các tinh thể được kết tinh trong tầng lọc; và

bước thứ tư là lặp lại các bước thứ hai và bước 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 thứ tư bao gồm dạng đa hình tinh thể a của tetraarsen hexoxit ($\text{As}_4\text{O}_6\text{-a}$) với lượng bằng 99% hoặc nhiều hơn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện phổ nhiễu xạ bột tia X của $\text{As}_4\text{O}_6\text{-a}$ và $\text{As}_4\text{O}_6\text{-b}$.

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 U-87MG 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 U-118MG 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 các hình ảnh SE theo trục trọng lượng T2 là các hình ảnh MRI trước xử lý của bệnh nhân (Thử nghiệm lâm sàng-1) bị chẩn đoán mắc u thần kinh đệm não.

FIG. 5 thể hiện các hình ảnh SE theo trục trọng lượng T2 là các hình ảnh MRI thể hiện kích thước khối u giảm xuống sau hai tháng trị liệu bằng tia xạ cùng với việc dùng hợp chất Ví dụ 1 cho bệnh nhân bị u thần kinh đệm não trong Thử nghiệm lâm sàng-1.

FIG. 6 thể hiện các hình ảnh SE theo trục trọng lượng T2 là các hình ảnh MRI thể hiện các khối u hầu như biến mất sau ba tháng trị liệu bằng tia xạ cùng

với việc dùng hợp chất Ví dụ 1 cho bệnh nhân bị u thần kinh đệm não trong Thử nghiệm lâm sàng-1.

FIG. 7 thể hiện các hình ảnh MRI trước điều trị của bệnh nhân bị chẩn đoán mắc u nguyên bào xốp ở thùy đỉnh-thùy thái dương trái (Thử nghiệm lâm sàng-2). FIG. 7A thể hiện các hình ảnh SE theo trục trọng lượng T2, và FIG. 7B thể hiện hình ảnh SE theo trục trọng lượng T1 sau tương phản.

FIG. 8 thể hiện các hình ảnh MRI sau khi phẫu thuật và trị liệu bằng bức xạ cho bệnh nhân bị mắc u nguyên bào xốp trong Thử nghiệm lâm sàng-2. FIG. 8A thể hiện các hình ảnh SE & FLAIR theo trục trọng lượng T2 và FIG. 8B thể hiện các hình ảnh SE theo trục trọng lượng T2.

FIG. 9 thể hiện các hình ảnh SE theo trục trọng lượng T1 là các hình ảnh MRI sau bốn tháng (FIG. 9A), bảy tháng (FIG. 9B), và mười tháng (FIG. 9C) sử dụng hợp chất ví dụ 1 cho bệnh nhân bị mắc u nguyên bào xốp trong Thử nghiệm lâm sàng-2.

FIG. 10 thể hiện các hình ảnh (FIG. 10A) và sơ đồ (FIG. 10B) mô tả hiệu quả ức chế tín hiệu hình ảnh khối u sau khi dòng tế bào U-87MG được chủng vào các con chuột cái không lông Balb/C.

Mô tả chi tiết sáng chế

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

Sáng chế đề cập đến được phẩm chứa tetraarsen hexoxit (As_4O_6) làm thành phần hoạt tính để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư não, 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 nhiều hơn.

Phương pháp bào chế được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư não của sáng chế bao gồm các bước: bước đầu tiên gia nhiệt natri clorua ở

nhệt độ nằm trong khoảng 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 trong tầng lọc; và bước thứ tư là lặp lại các bước thứ hai và thứ ba từ 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.

Bình phản ứng tổng hợp của nguyên 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 tốc độ lưu 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 nhiều hơn.

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

Dược phẩm của sáng chế có thể được phối trộn ở dạng của: dược phẩm dùng qua đường miệng, như thuốc bột, hạt cơm, 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 acaxia, alginat, gelatin, canxi phosphat, canxi silicat, xenluloza, methyl xenluloza, xenluloza vi tinh thể, polyvinyl pyrolidon, nước, methyl

hydroxybenzoat, propyl hydroxybenzoat, bột talc, magie stearat, và dầu khoáng. Dược phẩm có thể được phối trộn thành các chế phẩm được 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 trình độ 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 nhiều hơn để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư não của sáng chế có tác dụng chống ung thư mỹ mãn.

Ngoài ra, dược phẩm của sáng chế được xác nhận là có tác dụng ức chế sự di căn của, đặc biệt là bệnh ung thư não, như u nguyên bào xốp ở não.

Ví dụ thực hiện sáng chế

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 trọn vẹn và hoàn chỉnh, và sẽ chuyển tải đầy đủ phạm vi của sáng chế cho người có trình độ trung bình trong lĩnh vực.

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 bàn kẹp có khả năng lắp các thiết bị lọc trên thiết bị đã được chuẩn bị. Bàn kẹp thứ nhất được lắp đặt ở khoảng cách bằng 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 từ 2 đến 6 mm từ bàn kẹp thứ nhất, và kích thước của mỗi bàn 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 thô, 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 tốc độ lưu 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 As_4O_6 -a trong khi thu được 99% trọng lượng hoặc nhiều hơn là As_4O_6 -a và dưới 1% trọng lượng là As_4O_6 -b.

Đã xác nhận được rằng đối với giá trị nhiệt quét vi sai (DSC) ở tốc độ tăng nhiệt độ là $10^\circ\text{C}/\text{phút}$, As_4O_6 -a thể hiện điểm thu nhiệt (điểm nóng chảy) ở nhiệt độ $282,67^\circ\text{C}$ và As_4O_6 -b thể hiện điểm thu nhiệt (điểm nóng chảy) ở nhiệt độ $286,77^\circ\text{C}$.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của As_4O_6 -a và As_4O_6 -b được thể hiện trên FIG. 1, và các số liệu nhiễu xạ của As_4O_6 -a và As_4O_6 -b được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

[Bảng 2]

As_4O_6 -a		As_4O_6 -b	
2θ ($^\circ$)	Cường độ nhiễu xạ	2θ ($^\circ$)	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 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 As_4O_6 -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 As_4O_6 -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 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 , 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 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 tham số tế bào. 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 μm (cỡ sàng -325), chèn kẹp giữ kính để phân tích nhiễu xạ tia X (20 mm x 16 mm x 1 mm) bằng các hạt, 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 kẹp giữ. Phổ nhiễu xạ tia X của các tinh thể được vẽ bằng cách sử dụng $\text{Cu K}\alpha_1$ (1,54060 Å) 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 thô, 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 tốc độ lưu nằm trong khoảng từ 5 đến 10 μ m.

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±100°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±100°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 As₂O₃ 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 As₄O₆-b chiếm 99% hoặc nhiều 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 nhiều 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 nhiều 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 u thần kinh đệm ở người

1-1. Thử nghiệm tăng sinh tế bào (thử nghiệm MTT)

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

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

Vì dòng tế bào ung thư ở người, dòng tế bào u nguyên bào xốp ở não người U-87MG và U-118MG thu được từ Ngân Hàng Tế Bào Thượng Hải Của Học Viện Khoa Học Trung Hoa (the Shanghai Cell Bank of Chinese Academy of Sciences). Các tế bào này được ủ trong môi trường chủ yếu tối thiểu để cấy tế bào của Eagle (EMEM), đã được bổ sung FBS 10%, 100 U/ml penixilin, và 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin theo điều kiện nuôi cấy, trong thiết bị ủ ẩm có 5% CO_2 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 cách sử dụng 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 μM , 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 1 M natri hydroxit 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 μl dung dịch 5 mg/mL MTT 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 μl 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 sự hấp phụ được đo bằng cách sử dụng thiết bị đọc vi đĩa ở bước sóng bằng 570nm ($A_{570\text{nm}}$).

(3) Phân tích thống kê:

Giá trị hấp phụ của nhóm đối chứng đã được xử lý mà không có mẫu được tính bằng 100, và giá trị hấp phụ 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 = $\left(\frac{\text{sự hấp phụ trung bình của các tế bào nhóm đối chứng} - \text{sự hấp phụ trung bình của các tế bào nhóm xử lý}}{\text{sự hấp phụ trung bình của các tế bào nhóm đối chứng}} \right) \times 100$

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 đơn giản (ANOVA) 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 U-87MG

Dòng tế bào u nguyên bào xốp ở não người U-87MG 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 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 u nguyên bào xốp ở não 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 u nguyên bào xốp ở não 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 U-118MG

Dòng tế bào u nguyên bào xốp ở não người U-118MG 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 u nguyên bào xốp ở não 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 u nguyên bào xốp ở não 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 lâm sàng

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

(1) Thử nghiệm lâm sàng-1: Bệnh nhân nữ 51 tuổi

Bệnh nhân nữ này không có các triệu chứng chủ quan, nhưng được phát hiện thấy bị tổn thương ở não khi kiểm tra sức khỏe, và bị chẩn đoán mắc u thần kinh đệm não (chẩn đoán bệnh: u tế bào hình sao giải phẫu) khi sinh thiết não ở bệnh viện trường đại học quốc gia ở Seoul (the Seoul National University Hospital). Từ ngày thứ 10 sau khi chẩn đoán, các triệu chứng chuyển động yếu và run rẩy cả hai cánh tay bắt đầu xuất hiện và sau đó tiến triển một cách nhanh chóng. Hợp chất ví dụ 1 được dùng với liều là 15 mg trong một ngày từ ngày thứ 17 sau khi chẩn đoán, và các triệu chứng chuyển động yếu và run rẩy bắt đầu cải thiện. Tiến hành trị liệu cùng với bức xạ từ ngày thứ 27 đến ngày thứ 75 sau khi chẩn đoán, và sau đó các triệu chứng này biến mất hoàn toàn. Các hình ảnh MRI trước điều trị của bệnh nhân này được thể hiện trên FIG. 4, và các hình ảnh MRI sau hai tháng và ba tháng trị liệu bằng bức xạ cùng với việc dùng hợp chất Ví dụ 1 được thể hiện lần lượt trên các hình vẽ FIG. 5 và FIG. 6.

(2) Thử nghiệm lâm sàng-2: Bệnh nhân nữ 16 tuổi

Bệnh nhân này bị triệu chứng đau đầu, buồn nôn, chóng mặt, và khuyết tật trường nhìn bị chẩn đoán mắc u nguyên bào xốp ở thùy đỉnh-thùy thái dương trái. Vào ngày thứ 3 sau khi chẩn đoán, việc loại bỏ khối u được thực hiện bằng phẫu thuật, và khối u được xác định là u nguyên bào xốp theo WHO loại IV/IV theo kết quả của chẩn đoán bệnh. Việc trị liệu bằng bức xạ cùng với việc điều trị bằng Tremodal (61,2 Gy / 33fx) được thực hiện từ ngày thứ 45 đến ngày thứ 90 sau khi chẩn đoán. Các khối u vẫn còn được xác nhận trên các hình ảnh MRI sau khi trị liệu bức xạ và điều trị bằng Tremodal. Từ ngày thứ 95 sau khi chẩn đoán, 5 mg hợp chất ví dụ 1 được sử dụng ba lần một ngày trong 17 tháng. Bệnh nhân không có triệu chứng chủ quan từ 2 tháng dùng hợp chất ví dụ 1, và kích thước khối u vẫn còn đã được xác nhận là giảm xuống sau khi sử dụng hợp chất Ví dụ 1. Các hình ảnh MRI trước điều trị của bệnh nhân này được thể hiện trên FIG. 7, và các hình ảnh MRI sau phẫu thuật và trị liệu bức xạ được thể hiện trên FIG. 8. Các hình ảnh tương ứng sau bốn tháng, bảy tháng, và mười tháng sử

dụng hợp chất ví dụ 1 được thể hiện lần lượt trên các hình vẽ FIG. 9A, FIG. 9B, và FIG. 9C.

Đã được xác nhận thông qua các kết quả thử nghiệm lâm sàng mà được phẩm của sáng chế có các tác dụng ức chế một cách hiệu quả sự tăng sinh của khối u não ác tính, như u nguyên bào xốp, bằng cách cho qua hàng rào máu não (BBB).

Ví dụ thử nghiệm 3: Thử nghiệm hiệu quả in vivo trong mô hình động vật đã được cấy dòng tế bào u nguyên bào xốp ở não người

(1) Phương pháp:

Dòng tế bào u nguyên bào xốp ở não người U-87MG (mua được từ ATCC) đã được ủ trong môi trường chủ yếu tối thiểu để cấy tế bào của Eagle (EMEM) đã được bổ sung 10% FBS, 100 U/ml penixilin, và 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin trong thiết bị ủ trong các điều kiện ở nhiệt độ 37°C, không khí 5% CO₂, và 95%. Môi trường này được trao đổi cứ ba ngày một lần.

Các tế bào U-87MG được gắn nhãn luciferaza được cấy vào điểm ban đầu của não ở 15 con chuột cái không lông Balb/C cân nặng từ 16 đến 19 g, và lượng tế bào được cấy bằng $5 \times 10^5/5\mu\text{L}$. Các con chuột được cho kiểm tra hình ảnh vào ngày thứ 6 sau khi cấy, khi các điểm phẫu thuật của các con chuột được phục hồi và các tế bào khối u được phát triển ở mức không đáng kể. Các con chuột được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm, mỗi nhóm bốn con, theo các kết quả hình ảnh. Nhóm thử nghiệm được dùng dung dịch chứa hợp chất Ví dụ 1 đã được hòa tan trong nước muối sinh lý (0,9% NaCl), và nhóm đối chứng được dùng chỉ có nước muối sinh lý, mà là dung môi được sử dụng cho nhóm thử nghiệm. Các con chuột của hai nhóm được dùng nước muối sinh lý một lần một ngày hoặc 2,25 mg/kg hợp chất Ví dụ 1. Liều này bằng 10 uL/g trên cơ sở trọng lượng của các con chuột. Trong quá trình sử dụng, khối lượng và tình trạng sức khỏe của

các con chuột được theo dõi liên tục, và đồng thời, các con chuột được cho qua kiểm tra bằng hình ảnh. Các con chuột có cân nặng giảm quá mức ($> 20\%$) hoặc các tình trạng không khỏe được gây mê, và sau đó cắt bỏ các khối u, được cố định bằng formalin, và cho qua sinh thiết.

(2) Các kết quả đo khối lượng

Sau 9 ngày dùng thuốc, các con chuột của nhóm thử nghiệm cho thấy hầu hết không thay đổi trọng lượng, nhưng các con chuột của nhóm đối chứng thể hiện trọng lượng giảm đáng kể như được thể hiện dưới đây.

[Bảng 3]

Nhóm	Số chuột	Trọng lượng (g) ^a			Thay đổi cơ thể 9 ngày sau khi dùng lần đầu tiên (g)
		Trước khi dùng	9 ngày sau khi dùng lần đầu tiên	p^b	
Nhóm đối chứng (dùng muối sinh lý)	4	16,4±0,2	14,7±0,8	-	-1,7
Nhóm thử nghiệm (dùng hợp chất Ví dụ 1)	4	16,9±0,2	16,1±0,5	0,14	-0,8

a: Trung bình ± SEM

b: Thử nghiệm t so sánh thống kê được thực hiện đối với trọng lượng của nhóm thử nghiệm và trọng lượng của nhóm đối chứng sau 9 ngày dùng.

Trong quá trình thử nghiệm, các con chuột của nhóm đối chứng thể hiện trọng lượng giảm đáng kể trong 15 ngày sau khi cấy các tế bào, và các con chuột bắt đầu chết vào ngày 17 đến ngày 19 sau khi cấy các tế bào.

(3) Các kết quả ức chế tín hiệu hình ảnh khối u

Do việc nghiên cứu các kết quả sự ức chế tín hiệu hình ảnh khối u, như được thể hiện trên FIG. 10A, các con chuột của nhóm đối chứng thể hiện cường độ tín hiệu khối u mạnh từ ngày dùng thứ 7 (ngày thứ 13 sau khi cấy), và các tín hiệu khối u được quan sát được phân bố trong cột sống do sự di căn khối u vào cột sống, trong khi các tín hiệu khối u của các con chuột ở nhóm thử nghiệm đã được quan sát một cách khó khăn trong cột sống, và cường độ của nó cũng giảm nhẹ một cách đáng kể. Như được xác nhận trên FIG. 10B, đã xác nhận được thông qua sự so sánh các kết quả hình ảnh sinh học vào ngày dùng thứ 7 và thứ 9 (vào ngày 13 và 15 sau khi cấy) giữa nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm mà cường độ tín hiệu phát quang do sự tăng sinh và di căn của các khối u trong nhóm đối chứng là mạnh hơn nhiều so với cường độ tín hiệu phát quang ở nhóm thử nghiệm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

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

(i) Tham số tế bào:

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

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

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

(ii) Độ dài liên kết As-O: 1,786 \AA

(iii) Góc liên kết O-As-O: 98,36°

2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó tetraarsen hexoxit có độ tinh khiết bằng 99,9% hoặc cao 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 \AA 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 thành phần hoạt tính để ức chế di căn ung thư não, trong đó tetraarsen hexoxit chứa dạng đa hình tinh thể của tetraarsen hexoxit với lượng bằng 99% trọng lượng hoặc nhiều hơn của có các dấu hiệu từ (i) đến (iii) dưới đây:

(i) các tham số tế bào:

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

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

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

(ii) Độ dài liên kết As-O: 1,786 \AA

(iii) Góc liên kết O-As-O: 98,36°

5. Phương pháp bào chế dược phẩm chứa tetraarsen hexoxit (As_4O_6) để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư não theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, phương pháp này bao gồm các bước:

bước đầu tiên 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; 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 trong bước thứ tư chứa dạng đa hình tinh thể a của tetraarsen hexoxit ($\text{As}_4\text{O}_6\text{-a}$) với lượng bằng 99% trọng lượng hoặc nhiều hơn.

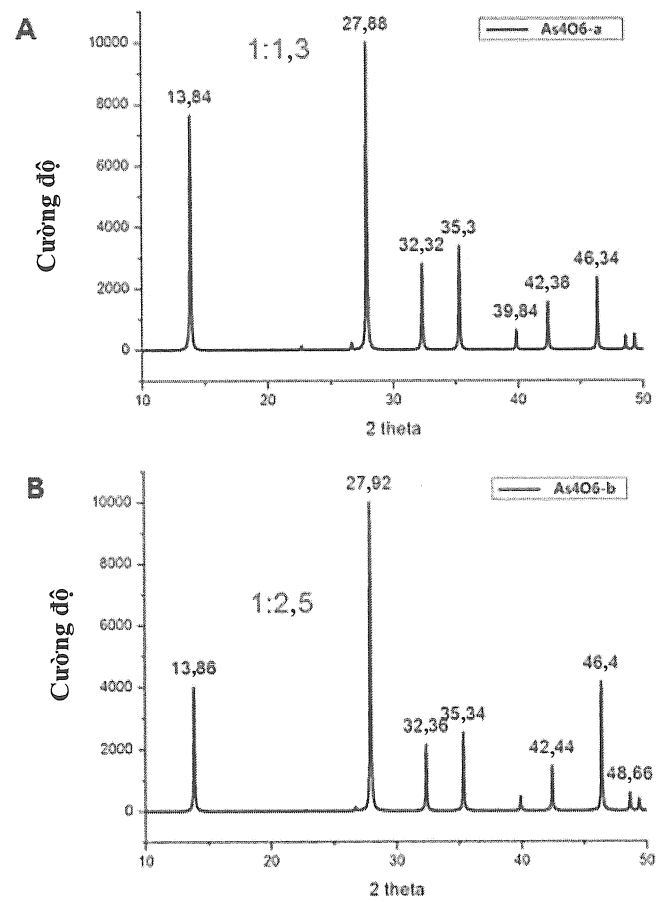


FIG. 1

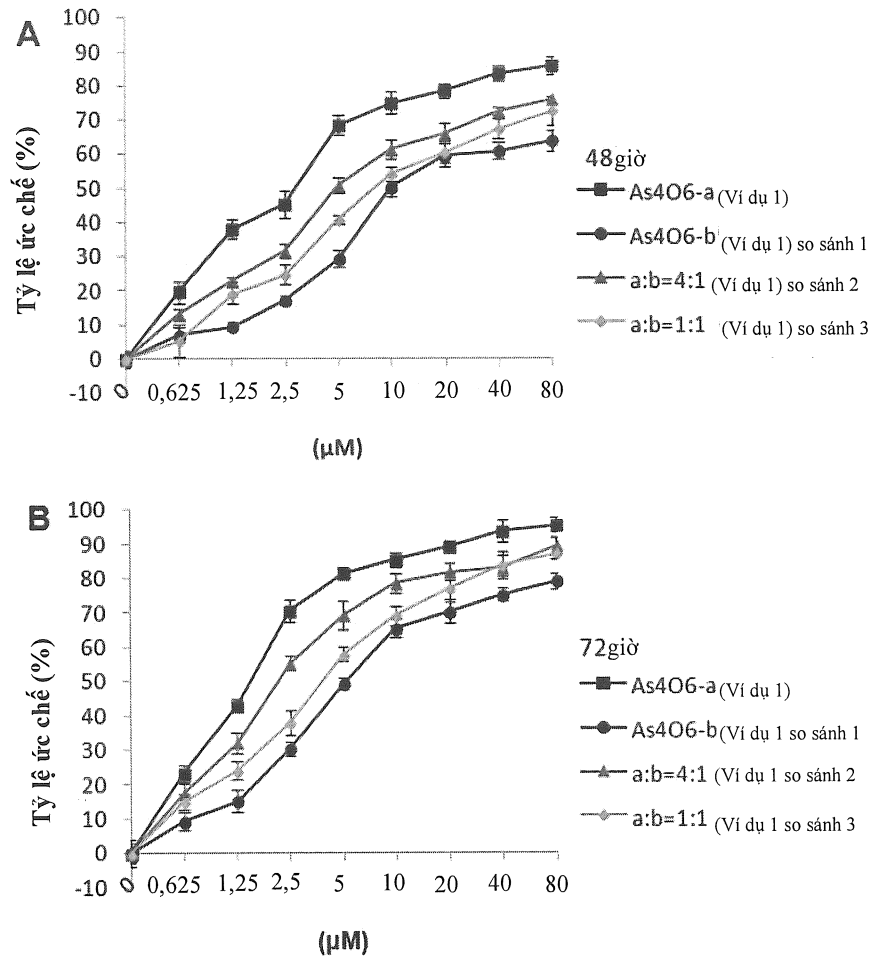


FIG. 2

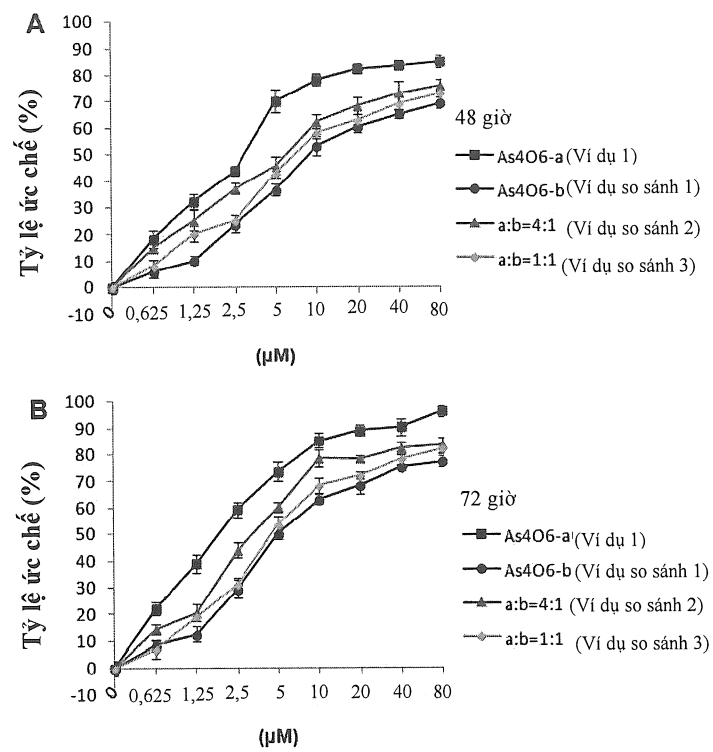


FIG. 3

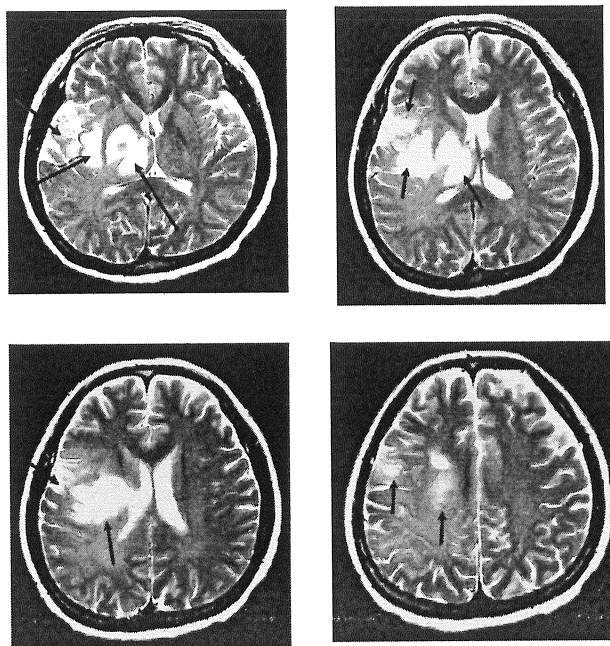


FIG. 4

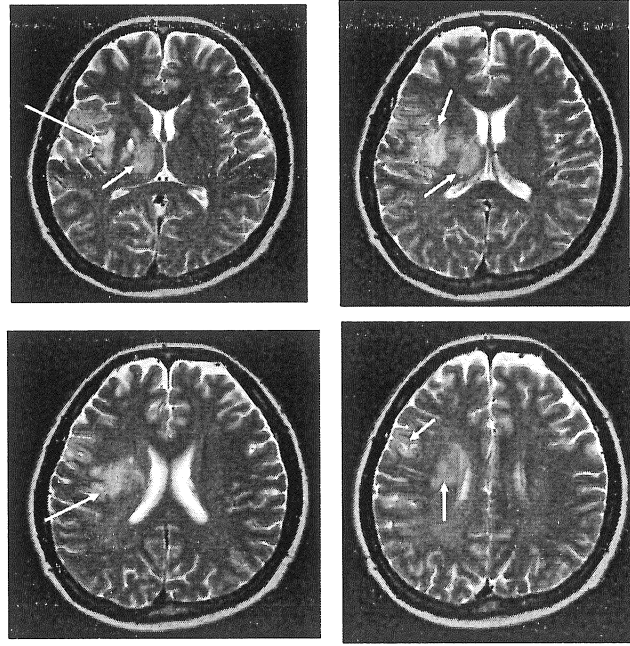


FIG. 5

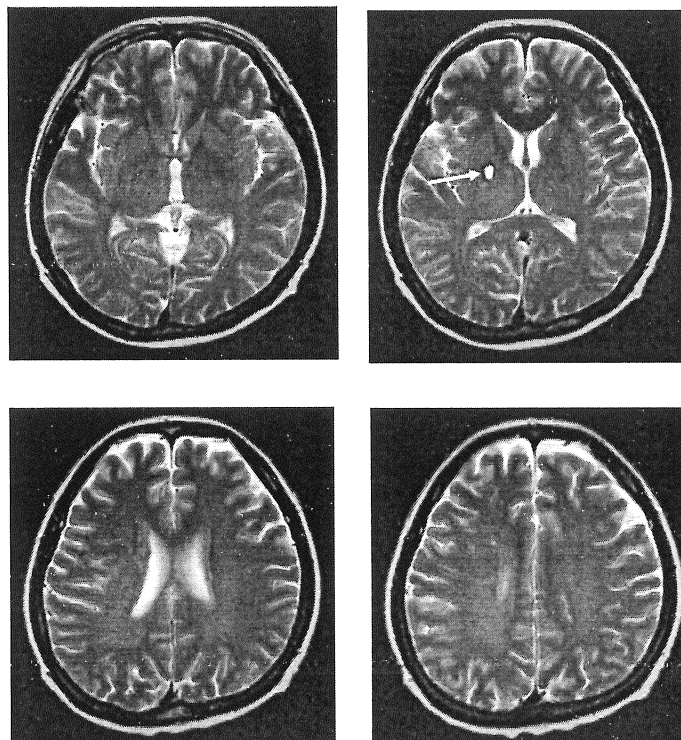


FIG. 6

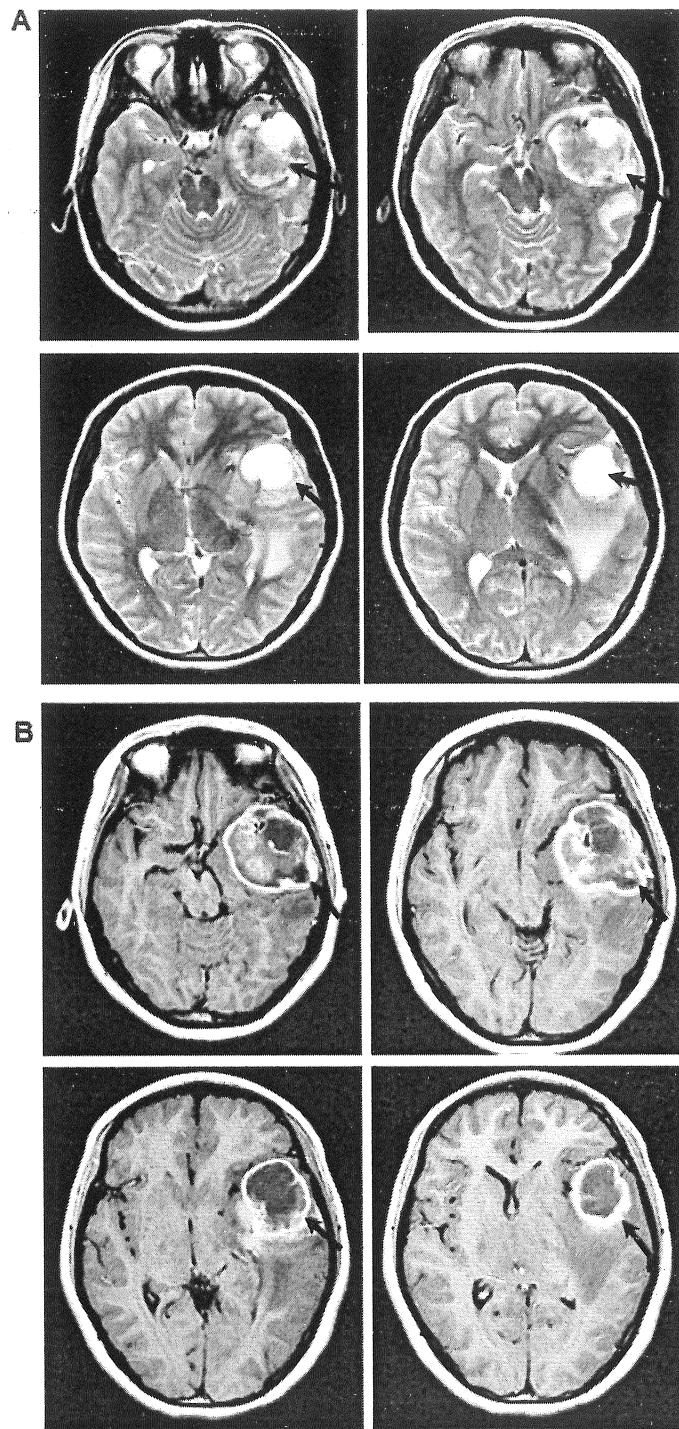


FIG. 7

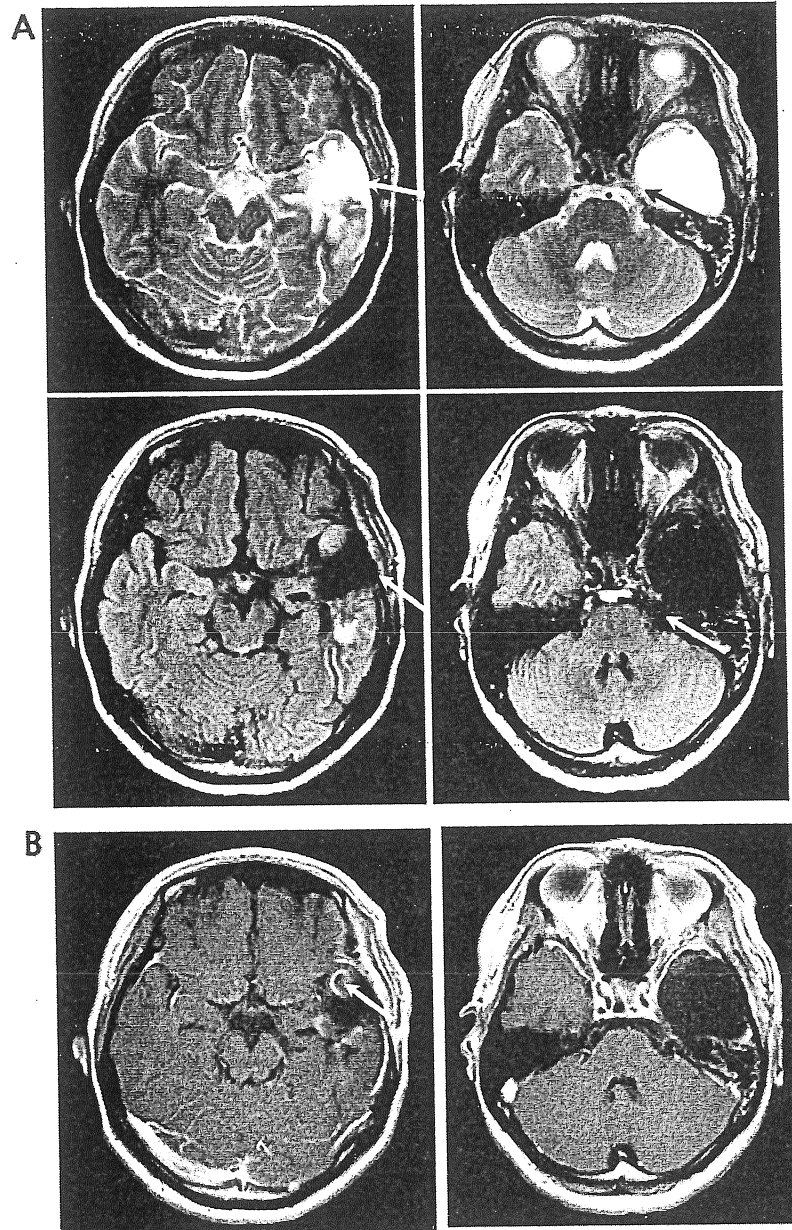


FIG. 8

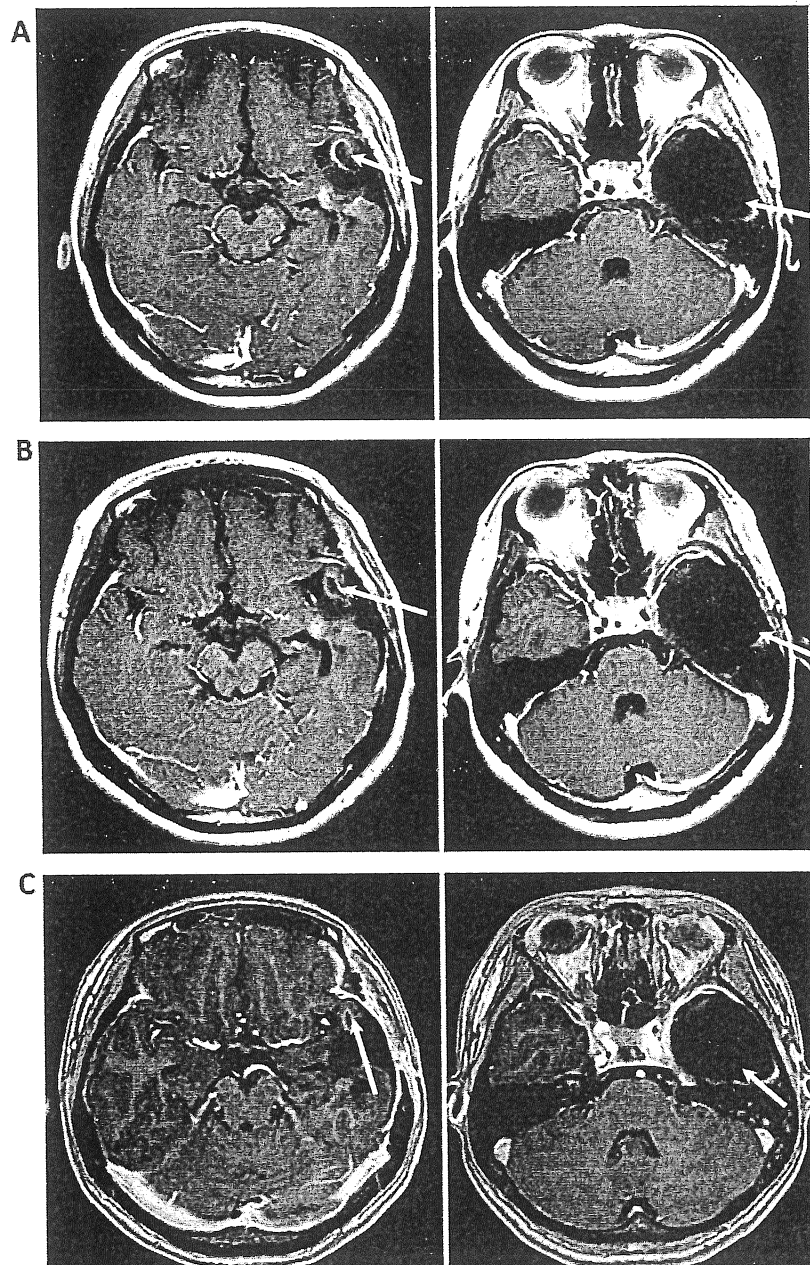


FIG. 9

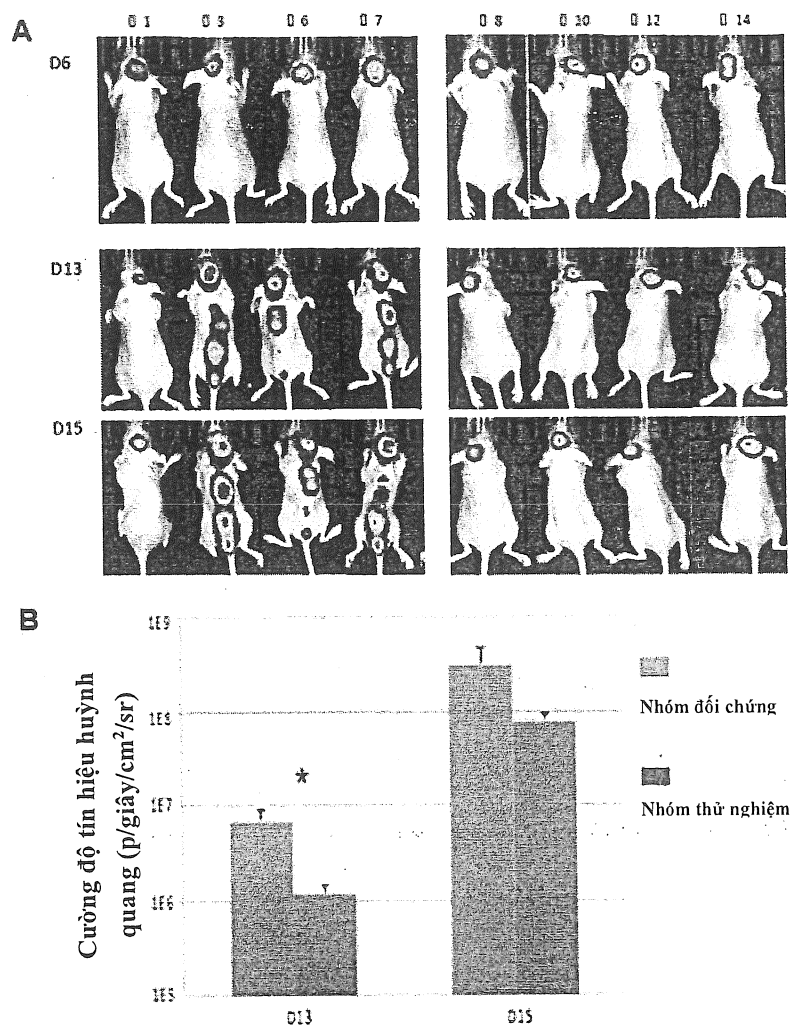


FIG. 10