



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0038757

(51)^{2020.01} A61K 47/24; A61P 35/00; A61K 31/352; (13) B
A61K 38/50

(21) 1-2021-08470

(22) 30/12/2021

(45) 26/02/2024 431

(43) 25/03/2022 408

(73) Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Số 18 Đường Hoàng Quốc Việt, Phường Nghĩa Đô, Quận Cầu Giấy, Thành Phố Hà
Nội

(72) Đỗ Thị Thảo (VN); Đỗ Thị Phương (VN); Nguyễn Thị Cúc (VN); Nguyễn Thị Nga
(VN); Triệu Hà Phương (VN); Lê Thị Hồng Minh (VN); Trịnh Thị Thủy (VN); Bá
Thị Châm (VN).

(54) CHẾ PHẨM NANOLIPOSOM NHIỀU LỚP CHỨA L-ASPARAGINAZA VÀ
CINCHONAIN IA CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ SỰ PHÁT TRIỂN CỦA KHỐI U

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và
cinchonain Ia (CF8.4) có khả năng ức chế sự phát triển của khối u ung thư, trong đó chế
phẩm này chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) ở dạng nanoliposom nhiều lớp,
trong đó tỷ lệ giữa L-asparaginaza và CF8.4 là từ 2 đến 20 UI/mg, và lượng CF8.4 trong
chế phẩm nằm trong khoảng từ 5 đến 15% khối lượng. Chế phẩm nanoliposom nhiều lớp
theo sáng chế có khả năng phân tán tốt trong nước, phù hợp để tiêm tĩnh mạch, cho phép
dẫn L-asparaginaza hướng đích, nâng cao hiệu quả trong điều trị ung thư.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực hóa ứng dụng và hoạt chất có nguồn gốc thiên nhiên. Cụ thể, sáng chế đề cập đến chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) có khả năng ức chế sự phát triển của khối u ung thư. Chế phẩm theo sáng chế có tiềm năng lớn để ứng dụng trong điều trị ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ung thư là một nhóm các bệnh được đặc trưng bởi sự phát triển không thể kiểm soát và lan rộng của các tế bào bất thường. Theo WHO, ung thư là nguyên nhân của gần 10 triệu trường hợp tử vong trong năm 2020 và số lượng tử vong do ung thư dự đoán vẫn tiếp tục cao trong những năm tiếp theo (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>). Các loại ung thư gây tỉ lệ tử vong cao phải kể đến ung thư phổi, ung thư gan, ung thư đường ruột, v.v. Mặc dù hiện đã có nhiều loại thuốc được nghiên cứu để điều trị ung thư, tuy nhiên hiệu quả điều trị còn nhiều hạn chế do tác dụng phụ, kháng thuốc và giá thành cao. Trong các loại thuốc đang được điều trị ung thư hiện nay phải kể đến L-asparaginaza (ASNaza). Đây là một loại thuốc thiết yếu dùng cho chữa trị bệnh ung thư hiệu quả, đặc biệt là ung thư bạch cầu cấp. Tuy nhiên, ứng dụng của thuốc chủ yếu là sử dụng cho điều trị ung thư máu, trong khi đó loại ung thư này chỉ chiếm tỉ lệ nhỏ trong các bệnh ung thư đang biết đến. Gần đây, L-asparaginaza cũng đã được chứng minh là có tiềm năng để ngăn ngừa sự di căn từ các khối u rắn. Tuy nhiên, phương pháp điều trị ASNaza cũng có đặc trưng bởi rất nhiều tác dụng phụ tiềm ẩn, từ phản ứng miễn dịch đến độc tính nghiêm trọng như viêm tụy, huyết khối, viêm niêm mạc, buồn nôn, nhức đầu, đau bụng và rối loạn chức năng hệ thần kinh (Brumano LP, da Silva FV, Costa-Silva TA, Apolinário AC, Santos JH, Kleingesinds EK, Monteiro G, Rangel-Yagui CD, Benyahia B, Junior AP. Development of L-asparaginase biobetters: current research status and review of the desirable quality profiles. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2019 Jan 10;6:212). Hơn nữa, ASNaza có độ ổn định thấp trong huyết thanh và độ thanh thải nhanh trong huyết tương do tác động của các proteaza và kháng thể của người (Pieters và cộng sự, 2012). Vì vậy, những

thể hệ thuốc mới của L-asparaginaza đã ra đời và cải thiện đáng kể độc tính và tính kháng thuốc, ví dụ như dạng được nanoliposom hóa, PEG hóa v.v.

Nanoliposom là một trong các hệ thống phân phối thuốc hiệu quả đang được sử dụng để giải quyết các vấn đề trên. Về bản chất, nanoliposom là những túi nhân tạo nhỏ có dạng hình cầu có thể được tạo ra từ cholesterol và các phospholipit tự nhiên không độc hại. Do kích thước và đặc tính kỵ nước và ưa nước (bên cạnh tính tương hợp sinh học), nanoliposom là hệ thống đầy hứa hẹn để phân phối thuốc. Các đặc tính của lipid khác nhau đáng kể với thành phần lipid, điện tích bề mặt, kích thước và phương pháp điều chế. Hơn nữa, việc lựa chọn các thành phần của lớp kép xác định độ "cứng" hoặc "tính lưu động" và điện tích của lớp kép. (Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. Nanoliposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* 2013 Feb 22;8(1):102.). Bên cạnh đó, sự biến đổi của nanoliposom bằng polyetyleneglycol (PEG), tức là PEGyl hóa, cho phép chúng lưu thông trong một thời gian dài đáng kể trong tuần hoàn máu sau khi tiêm tĩnh mạch. Ổn định lớp kép lipid và cản trở steric, dẫn đến ức chế hấp phụ protein và ít được các đại thực bào nhận biết (Hatakeyama H, Akita H, Harashima H. The polyethyleneglycol dilemma: advantage and disadvantage of PEGylation of nanoliposomes for systemic genes and nucleic acids delivery to tumors. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2013 Jun 1;36(6):892-9). Thêm vào đó, việc biến đổi nanoliposom bằng các phân tử PEG làm cho nanoliposom có trọng lượng phân tử cao do đó làm tăng khả năng tích tụ tự phát của nanoliposom ở các vị trí bệnh lý khác nhau, chẳng hạn như khối u rắn và các khu vực nhiễm trùng. Hiện tượng này được gọi là hiệu ứng tăng cường tính thấm và lưu giữ (EPR) (Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS. *Cancer Res.*, 46, 6387–6392 (1986)). Hiệu ứng này dựa trên thực tế là tân mạch bệnh lý của mô khối u, không giống như các mô bình thường, có chứa màng đáy không liên tục hoặc không có, làm cho nó "bị rò rỉ". Điều này cho phép các đại phân tử lớn và thậm chí các hạt nhỏ thoát ra ngoài và tích tụ trong không gian khối u kẽ. Sự tích tụ như vậy cũng được tạo điều kiện do thiếu hệ thống bạch huyết, hệ thống này chịu trách nhiệm thoát các đại phân tử khỏi các mô. Một số sản phẩm nanoliposom được PEG hóa đã được

thương mại hóa như Doxil (Caelyx), doxorubicin PEGyl hóa nanoliposom có đường kính 100 nm, tích tụ trong các khối u ở mức độ cao và có ít tác dụng phụ hơn so với doxorubicin tự do, và được sử dụng trong điều trị hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS) liên quan đến Kaposi's sarcoma, ung thư buồng trứng và ung thư vú (Davis ME, Chen ZG, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 7, 771–782 (2008)). Trong các phân tử PEG được sử dụng hiện nay, D-alpha tocopheryl polyetylen glycol 1000 succinat (TPGS) đã được sử dụng như một chất điều chỉnh của nanoliposom trong nhiều nghiên cứu. TPGS là một dẫn xuất polyetylen glycol (PEG) hòa tan trong nước của vitamin E succinat, được cấu tạo của nhóm ưa nước (PEG) và nhóm ưa béo (tocopherol succinat) để tạo thành amphiphilic kết cấu. TPGS là một chất nhũ hóa tuyệt vời, chất hòa tan và chất tăng cường sinh khả dụng cho thuốc kỵ nước do giá trị cân bằng ưa nước-lipophilic (HLB) của nó (Malamatari và cộng sự, 2015; Duhem và cộng sự, 2014). Ngoài ra, TPGS ức chế kháng đa thuốc qua trung gian P-gp, tăng cường hấp thu thuốc và tăng độc tính tế bào của thuốc. Theo Li và cộng sự, TPGS nâng cao tương tác giữa nanoliposom và luteolin để chống rò rỉ thuốc. Ngoài điểm yếu tương tác, TPGS có hình dạng công kênh và diện tích bề mặt lớn đảm bảo nó là chất nhũ hóa tốt cho một loạt các loại thuốc kỵ nước (Li J, Cheng X, Chen Y, He W, Ni L, Xiong P, Wei M. Vitamin E TPGS modified nanoliposomes enhance cellular uptake and targeted delivery of luteolin: An in vivo/in vitro evaluation. *International journal of pharmaceutics*. 2016 Oct 15;512(1):262-72.).

Hiện nay, ngoài việc thiết kế các hệ thống phân phối nhằm nâng cao hiệu quả của thuốc thì việc kết hợp các hoạt chất để nâng cao hiệu quả điều trị là một hướng mới. L-asparaginaza được báo cáo là tăng hoạt tính khi kết hợp với piperin. Ngoài ra, L-asparaginaza kết hợp với decitabin làm chất khử methyl thể hiện tác dụng gây độc tế bào hiệp đồng trong bệnh ung thư bạch cầu T cấp tính (T-ALL) ở trẻ em, với dấu hiệu di truyền cụ thể (Serravalle S, Bertuccio SN, Astolfi A, Melchionda F, Pession A. Synergistic cytotoxic effect of L-asparaginase combined with decitabine as a demethylating agent in pediatric T-ALL, with specific epigenetic signature. *BioMed research international*. 2016 Nov 27;2016.). Sự kết hợp của L-asparaginaza với vincristin và prednisolon thông qua tiêm ven cũng đã cho thấy kết quả tuyệt vời trong điều trị bệnh ung thư bạch cầu. Thêm vào đó,

các loại thuốc khác như dexamethason, methotrexat cũng đã được sử dụng kết hợp với L-asparaginaza trong điều trị ung thư (Kumar K, Kaur J, Walia S, Pathak T, Aggarwal D. L-asparaginase: an effective agent in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. Leukemia & lymphoma. 2014 Feb 1;55(2):256-62.). Như vậy, sự kết hợp L-asparaginaza với các hoạt chất hay thuốc khác để nâng cao hiệu quả điều trị là một hướng đi có tiềm năng.

Tuy nhiên, hiện nay chưa có nhiều nghiên cứu chi tiết, cũng như chưa có các chế phẩm nanoliposom chứa L-asparaginaza kết hợp với hoạt chất khác mà có hiệu quả cao trong việc ức chế khối u. Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm nanoliposom chứa L-asparaginaza kết hợp với hoạt chất khác để nâng cao hiệu quả ức chế sự phát triển của khối u.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) có công thức $C_{24}H_{20}O_9$. Chế phẩm này có thể phân tán tốt trong nước nhằm phù hợp để tiêm tĩnh mạch, cho phép dẫn L-asparaginaza hướng đích, nâng cao hiệu quả trong điều trị ung thư.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) có khả năng ức chế sự phát triển của khối u, trong đó chế phẩm này:

a) chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4), trong đó tỷ lệ giữa L-asparaginaza và CF8.4 là từ 2 đến 20 UI/mg, và lượng CF8.4 trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 5 đến 15% khối lượng; và

b) chế phẩm ở dạng nanoliposom nhiều lớp và được tạo ra theo quy trình sau:

- hòa tan lecithin đậu nành và cholesterol trong metanol theo tỉ lệ lecithin đậu nành/cholesterol 9:1 (mol/mol) để thu được hỗn hợp A;

- hòa tan D-alpha tocopheryl polyetylen glycol succinat (TPGS) đến nồng độ 5,2 mM trong metanol để thu được dung dịch B;

- hòa tan CF8.4 trong metanol đến nồng độ 9 mM để thu được dung dịch C;

- gộp các dung dịch A, B và C thu được ở trên với nhau với tỷ lệ lectin/TPGS/CF8.4 là 9/5,2/9 (mol/mol/mol) và tiến hành cô quay chân không ở áp suất 40 mmHg tại nhiệt độ 50°C, tốc độ 100-200 vòng/phút để loại bỏ dung môi và tạo thành lớp màng mỏng lipid khô;

- để lớp màng mỏng lipid khô này ở 4°C qua đêm rồi tiến hành hydrat hóa lipid trong điều kiện phun khí nitơ với dung dịch L-asparaginaza theo tỷ lệ L-asparaginaza và CF8.4 là từ 2 đến 20 UI/mg, thời gian hydrat hóa trong 5 phút, sau đó bổ sung dung dịch nước muối sinh lý sao cho CF8.4 trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 5 đến 15% khối lượng để tạo ra hỗn dịch chứa các hạt nanoliposom nhiều lớp;

- chuyển hỗn dịch chứa các hạt nano liposom nhiều lớp này vào hệ thống bể siêu âm với chu trình siêu âm 3 lần liên tục, mỗi lần 10 phút với cường độ từ 8 đến 10 biên độ để ổn định cấu trúc hạt; và

- lọc hỗn hợp chứa các hạt nano liposom sau khi siêu âm qua màng lọc 0,22 μm , thu được chế phẩm chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) ở dạng nanoliposom nhiều lớp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là biểu đồ thể hiện sự phân bố và kích thước hạt của chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) theo sáng chế. Trong đó Z-average: Đường kính trung bình các tiểu phần; PDI: độ phân tán; Result quality: chất lượng của các kết quả thu được; size: kích thước; d.nm: đường kính tiểu phần tính theo đơn vị nanomet; intensity: cường độ; Peak: đỉnh đồ thị.

Hình 2 là biểu đồ thể hiện thế zeta của chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) theo sáng chế. Trong đó Zeta potential: thế Zeta; Zeta deviation: độ sai số của thế Zeta; Conductivity: độ dẫn truyền; mean: giá trị trung bình; area: vùng phân bố; width: độ rộng phân bố; Peak: đỉnh đồ thị.

Hình 3 là hình ảnh của chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) theo sáng chế được chụp bằng hệ thống SEM HITACHI.

Hình 4 là hình ảnh của chế phẩm nanoliposom và cinchonain Ia phân tán trong dung dịch nước muối sinh lý khi quan sát bằng mắt thường; (A) chế phẩm bao gồm L-

asparaginaza và CF.84 tự do; (B) chế phẩm chứa L-asparaginaza và CF.84 ở dạng nano liposom nhiều lớp.

Hình 5 là biểu đồ thử nghiệm đánh giá sự phát triển khối u trên chuột gây u bằng tế bào LLC dưới tác động của các mẫu gồm nanoliposom chứa L-asparaginaza, nanoliposom chứa cinchonain Ia (CF8.4) và chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4).

Hình 6 là một số hình ảnh khối u chuột phân lập sau khi kết thúc thử nghiệm; (A) đối chứng bệnh lý; (B) CFF.4 nanoliposom; (C) L-asparaginaza nanoliposom; (D) CF8.4+ L-asparaginaza nanoliposom.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) có khả năng ức chế sự phát triển của khối u, chế phẩm này chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4), trong đó tỷ lệ giữa L-asparaginaza và CF8.4 là từ 2 đến 20 UI/mg, và lượng CF8.4 trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 5 đến 15% khối lượng; và chế phẩm này ở dạng nanoliposom nhiều lớp.

Cinchonain Ia (CF8.4) là hợp chất được phân lập từ Loài Lim xẹt (*Peltophorum pterocarpum* (DC.) K. Heyne), còn gọi là Lim sét, Diệp, Phượng vàng. Y học cổ truyền sử dụng sử dụng một số loài thuộc chi *Peltophorum* để khử trùng, chống viêm, và thấp khớp. Nghiên cứu về hóa thực vật cho thấy alkaloit, terpenoit, flavonoit, lignan và mono-phenol là các lớp chất chủ yếu có trong chi *Peltophorum* (Y. C. Li, P. C. Kuo, M. L. Yang, T. Y. Chen, T. L. Hwang, C. C. Chiang, T. D. Thang, N. N. Tuan, J. T. C. Chen. Chemical constituents of the leaves of *Peltophorum pterocarpum* and their bioactivity, *Molecules*, 2019, 24, 240, DOI: 10.3390/molecules24020240). Trong khi chất cinchonain Ia (CF8.4) lần đầu được phân lập từ loài *Ceiba pentandra* và theo tra cứu cho đến nay mới chỉ có một vài công bố về hoạt tính chống Alzheimer, chống oxy hóa (Wanxia Tang, Hideaki Hioki, Kenichi Harada, Miwa Kubo, and Yoshiyasu Fukuyama, Antioxidant Phenylpropanoit-Substituted Epicatechins from *Trichilia catigua*. *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 2010–2013). Theo Abouelela, cinchonain Ia có hiệu quả ức chế cao hơn (91%) so với chất chuẩn curcumin (70%) (M. E. Abouelela, M.A.A. Orabia, R.A. Abdelhamid, M.S.A. Abdelkader, F.M.M.

Darwish, M. Hotsumi, H. Konno. Anti-Alzheimer's flavanolignans from *Ceiba pentandra* aerial parts, *Fitoterapia*, 2012, 83, 395-401). Ngoài ra, hoạt chất CF8.4 cũng thể hiện hoạt tính kháng viêm thông qua khả năng ức chế IL-1 β , một chất trung gian quan trọng của phản ứng viêm, có liên quan đến nhiều hoạt động khác nhau của tế bào, bao gồm tăng sinh tế bào, biệt hóa và chết tế bào theo chương trình - apoptosis (Zhong C, Hu D, Hou LB, Song LY, Zhang YJ, Xie Y, Tian LW. Phenolic Compounds from the Rhizomes of *Smilax china* L. and Their Anti-Inflammatory Activity. *Molecules*. 2017 Apr 3;22(4):515. doi: 10.3390/molecules22040515. PMID: 28368360; PMCID: PMC6154459). Chưa có các báo cáo về việc sử dụng cinchonain Ia kết hợp với L-asparaginaza.

Chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) theo sáng chế được tạo ra theo quy trình như sau:

Hòa tan lecithin đậu nành và cholesterol trong metanol, trong đó tỉ lệ lecithin đậu nành/cholesterol 9:1 (mol/mol) để thu được hỗn hợp A. D-alpha tocopheryl polyetylen glycol succinat (TPGS) được hòa tan trong metanol đến nồng độ 5,2 mM để được dung dịch B. Hòa tan CF8.4 trong metanol đến nồng độ 9 mM trong metanol để thu được dung dịch C.

Metanol chỉ đóng vai trò dung môi hòa tan và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hóa học sẽ biết cách lựa chọn lượng metanol được sử dụng khi hòa tan các thành phần một cách thích hợp.

Gộp các dung dịch A, B và C với nhau tỷ lệ lectin/TPGS/CF8.4 là 9/5,2/9 (mol/mol/mol). Tiến hành cô quay chân không tại nhiệt độ 50°C, tốc độ 100-200 vòng/phút, áp suất chân không (40 mmHg) để loại bỏ dung môi và tạo thành lớp màng mỏng lipid khô hoàn toàn. Lớp màng lipid được để ở 4°C qua đêm và đưa qua hệ thống phun khí nitơ để loại bỏ triệt để các dung môi hữu cơ. Hydrat hóa lipid với dung dịch L-asparaginaza trong 5 phút, trong đó lượng L-asparaginaza được tính theo CF8.4. Tỷ lệ L-asparaginaza được bổ sung theo CF8.4 là từ 2 đến 20 UI/mg. Sau đó thêm dung dịch nước muối sinh lý sao cho lượng CF8.4 trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 5 đến 15% khối lượng để tạo ra hỗn dịch chứa các hạt nanoliposom nhiều lớp. Tiếp theo, để giảm kích cỡ của các hạt này, tiến hành chuyển hỗn dịch chứa các hạt nanoliposom nhiều lớp này vào hệ thống bể siêu âm với chu

trình siêu âm 3 lần liên tục, mỗi lần 10 phút với cường độ từ 8 đến 10 biên độ để ổn định cấu trúc hạt nanoliposom. Cuối cùng, hỗn hợp được lọc qua màng lọc 0,22 μm để nhận được chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hóa học sẽ biết cách xác định lượng L-asparaginaza và CF8.4 được sử dụng để thu được chế phẩm nanoliposom chứa 2 thành phần này với tỷ lệ mong muốn theo sáng chế.

Chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) thu được có tỷ lệ L-asparaginaza/cinchonain Ia từ 2 đến 20 UI/mg, và trong đó lượng CF8.4 nằm trong khoảng 5-15% khối lượng chế phẩm có khả năng ức chế sự phát triển của khối u và có tiềm năng lớn để ứng dụng trong điều trị ung thư.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4)

Lecithin đậu nành và cholesterol (tỷ lệ 9:1 về số mol) được hòa trong metanol để thành hỗn hợp A. Tiếp đó hòa tan D-alpha tocopheryl polyetylen glycol succinat (TPGS) trong metanol để thu được dung dịch nồng độ 5,2 mM. Hòa tan 40,68 mg CF8.4 trong metanol để thu được dung dịch CF8.4 nồng độ 9 mM (dung dịch C). Gộp các dung dịch A, B và C với nhau, cô quay chân không tại nhiệt độ 50°C, tốc độ 150 vòng/phút, áp suất chân không (40 mmHg) để loại bỏ dung môi và tạo thành lớp màng mỏng lipid khô hoàn toàn. Lớp màng lipid được để ở 4°C qua đêm và đưa qua hệ thống phun khí nitơ để loại bỏ triệt để các dung môi hữu cơ. Hydrat hóa lipid với 0,2 ml dung dịch L-asparaginaza 50 UI trong 5 phút. Sau đó bổ sung dung dịch nước muối sinh lý vào dung dịch trên để tạo các hạt nanoliposom nhiều lớp. Tiếp theo, để giảm kích cỡ thì hỗn dịch chứa các hạt nanoliposom nhiều lớp này vào hệ thống bể siêu âm với chu trình siêu âm 3 lần liên tục, mỗi lần 10 phút với cường độ 8 biên độ. Cuối cùng, hỗn hợp được lọc qua màng lọc 0,22 μm để nhận được chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) có kích thước hạt nhỏ hơn 0,22 μm .

Chế phẩm nanoliposom thu được được đo kích thước hạt, PDI và thế zeta bằng phương pháp DLS, và chụp SEM bằng hệ thống SEM HITACHI. Chế phẩm nanoliposom

có kích thước từ 118,7 nm, và thể zeta âm tính nằm trong khoảng -47,0 (Các kết quả được thể hiện trên Hình 1, 2 và 3).

Hiệu suất tổ hợp L-asparaginaza được đánh giá thông qua xác định hàm lượng L-asparaginaza còn trong dịch nổi và được thực hiện bằng phương pháp so màu Nessler. Theo đó, phản ứng gồm 1 ml TrisHCl 50 mM, pH 8,6 + 0,1 ml mẫu thử (hoặc enzym chuẩn) + 0,9 ml H₂O và 0,1 ml L-asparaginaza (189 mM) được ủ với nhau trong 30 phút ở 37°C. Phản ứng được dừng lại bằng cách thêm 0,1 ml TCA 1,5 M và ly tâm ở 2000 vòng/5 phút. Tiếp theo 0,2 ml dịch nổi ở bước trên được trộn với 4,3 ml dung dịch H₂O và phản ứng với 0,5 ml dung dịch thuốc thử Nessler, trộn đều sau đó đo ở bước sóng 450 nm ngay lập tức. Nồng độ L-asparaginaza trong dịch nổi được xác định thông qua phương trình đường chuẩn là (NH₄)₂SO₄. Kết quả cho thấy hiệu suất tổ hợp L-asparaginaza trong chế phẩm nanoliposom thu được là 92,81%.

Xác định hiệu suất tổ hợp CF8.4 (C₂₄H₂₀O₉) được thực hiện thông qua xác định hàm lượng CF8.4 trong dịch nổi thu được và so sánh với nồng độ chất đưa vào ban đầu thông qua hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) gắn kết đầu dò khối phổ. Kết quả cho thấy hiệu suất tổ hợp CF8.4 là 99,79%.

Độ phân tán trong nước của chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia thu được được xác định bằng cách quan sát hiện tượng kết tụ hoặc lắng xuống của chế phẩm và xác định giá trị PDI. Kết quả hình 4 cho thấy chế phẩm là hỗn dịch có màu vàng nhạt, đồng nhất, hoàn toàn không có các tiểu phần kích thước lớn hay có thể nhận thấy bằng mắt thường. Sau khi lắc mạnh, các tiểu phần nanoliposom vẫn phân tán đều trong dung dịch nước muối sinh lý, không có hiện tượng kết tụ hay lắng cặn xuống đáy ống đựng. Bên cạnh đó, giá trị PDI (hình 1) của chế phẩm là 0,12 cho thấy sự đồng đều rất cao về kích thước hạt tiểu phần, các hạt tiểu phần đều có kích thước tương đương nhau và nhỏ hơn 200 nm. Trong khi đó, cinchonain Ia dạng tự do không tan, không phân tán trong nước và hợp chất ở dạng rắn đã lắng cặn nhanh chóng trong 1 phút trong dung dịch nước muối sinh lý sau khi lắc mạnh.

Ví dụ 2: Thử nghiệm khả năng ức chế sự phát triển của tế bào gốc ung thư ở người dòng NTERA-2

Để đánh giá khả năng ức chế sự phát triển của tế bào gốc ung thư đối với chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4), tiến hành thử nghiệm trên tế bào gốc ung thư dòng NTERA-2.

Chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) thu được từ Ví dụ 1 (còn được gọi là nanoliposom CF8.4 + L-asparaginaza hoặc CF8.4 + L-asparaginaza nanoliposom) được sử dụng trong thử nghiệm khả năng ức chế sự phát triển của tế bào gốc ung thư ở người dòng NTERA-2 .

Chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza (còn được gọi là nanoliposom L-asparaginaza hoặc L-asparaginaza nanoliposom) và chế phẩm nanoliposom nhiều lớp cinchonain Ia (CF8.4) (còn được gọi là nanoliposom CF8.4 hoặc CF8.4 nanoliposom) được tạo theo các quy trình tương tự như trong Ví dụ 1, trong đó chỉ sử dụng L-asparaginaza hoặc cinchonain Ia (CF8.4).

Các tế bào được nuôi trong đĩa 96 giếng với nồng độ tế bào là 10×10^4 tế bào mỗi giếng trong 190 μ l môi trường DMEM (Dulbeco's Modified EAgle Medium). Mẫu CF8.4 nanoliposom, hoặc L-asparaginaza nanoliposom, hoặc CF8.4 + L-asparaginaza nanoliposom ở các nồng độ khác nhau được đưa vào các giếng của đĩa thí nghiệm, mỗi nồng độ được lặp lại 3 lần. Các giếng chỉ chứa 10 μ l môi trường được dùng làm đối chứng âm. Tiến hành xác định tỉ lệ tế bào sống dưới tác động của các mẫu thí nghiệm sau 72 h bằng phương pháp MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). Cụ thể: loại bỏ môi trường nuôi cấy, sau đó đưa vào mỗi giếng 50 μ l dung dịch MTT (1 mg/ml). Tiếp theo, để đĩa ở 37°C trong 4 h rồi loại bỏ dung dịch MTT. Cuối cùng, thêm vào mỗi giếng 100 μ l DMSO (100%) và đo độ hấp thụ ở bước sóng 490 nm bằng máy đo ELISA chuyên dụng (ELx800, BioTek Instrument). Phân tích số liệu: Số liệu được phân tích bằng phần mềm Excel để xác định % ức chế sự phát triển tế bào theo công thức:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - \frac{OD(\text{mẫu}) - OD(\text{blank})}{OD(\text{DMSO}) - OD(\text{blank})}$$

Trong đó: OD mẫu đối chứng là độ hấp thụ của giếng chỉ có tế bào; OD mẫu thử là độ hấp thụ của các giếng có tế bào ủ với mẫu nghiên cứu; OD blank là độ hấp thụ của các giếng chỉ có môi trường. Giá trị IC₅₀ được tính nhờ phần mềm TableCurve 2Dv4. So sánh

sự sai khác giữa các số liệu được thực hiện bằng phần mềm GraphPad Prism 5.0. Sự khác biệt được coi là có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

Kết quả bảng 1 cho thấy, chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) ức chế mạnh sự phát triển của tế bào gốc ung thư dòng NTERA-2 với giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự phát triển của tế bào) = $2,30 \pm 0,29 \mu\text{g/mL}$ (theo nồng độ CF8.4) và $0,046 \pm 0,006 \text{ UI}$ (theo nồng độ L- asparaginaza). Như vậy chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) cho thấy mức hoạt tính vượt trội, tăng ít nhất 8,69 lần so với CF8.4 nanoliposom ($IC_{50} > 20 \mu\text{g/mL}$) và tăng 4,84 lần so với nanoliposom chỉ chứa L-asparaginaza ($IC_{50} = 0,223 \pm 0,003 \text{ UI}$).

Bảng 1. Hoạt tính ức chế sự phát triển tế bào gốc ung thư dòng NTERA-2 của chế phẩm nanoliposom chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4)

Nồng độ CF8.4 (µg/mL)	CF8.4 nanoliposom		CF8.4+ L-asparaginaza nanoliposom		L-asparaginaza nanoliposom		Nồng độ L-asparaginaza (UI)
	% ức chế	sai số	% ức chế	sai số	% ức chế	sai số	
20	16,71	1,77	75,94	3,57	60,30	3,17	0,4
4	11,76	0,53	65,24	3,52	35,02	2,03	0,08
0,8	2,01	0,16	29,01	2,20	19,66	1,24	0,016
0,16	-4,17	0,06	17,26	1,08	7,87	0,09	0,0032
IC ₅₀	>20		(2,30 ± 0,29)***		-		IC ₅₀
	-		(0,046 ± 0,006)###		0,223 ± 0,003		

Ghi chú: $***P < 0.001$ so với CF8.4 nanoliposom; $###P < 0.001$ so với L-asparaginaza nanoliposom

Ví dụ 3: Thử nghiệm khả năng ức chế sự phát triển của khối u tế bào 3D (tumorsphere) tế bào LLC của chế phẩm nanoliposom chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4)

Chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) thu được từ Ví dụ 1 (còn được gọi là nanoliposom CF8.4 + L-asparaginaza hoặc CF8.4 + L-asparaginaza nanoliposom) được sử dụng trong thử nghiệm khả năng ức chế sự phát triển của tế bào gốc ung thư ở người dòng NTERA-2 .

Chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza (còn được gọi là nanoliposom L-asparaginaza hoặc L-asparaginaza nanoliposom) và chế phẩm nanoliposom nhiều lớp cinchonain Ia (CF8.4) (còn được gọi là nanoliposom CF8.4 hoặc CF8.4 nanoliposom) được tạo theo các quy trình tương tự như trong Ví dụ 1, trong đó chỉ sử dụng L-asparaginaza hoặc cinchonain Ia (CF8.4).

Chọn chai tế bào LLC (Lewis Lung Carcinoma) có độ bao phủ bề mặt khoảng 80-85% và làm rời tế bào khỏi bề mặt nuôi cấy theo thường qui có sử dụng trypsin-EDTA. Sau khi xác định nồng độ và lượng tế bào, điều chỉnh nồng độ cho phù hợp để tế bào được đưa vào các giếng đã phủ agarosa trong đĩa 96 giếng với nồng độ 3000 tế bào/giếng. Ủ tế bào ở 37 °C, 5% CO₂ trong 72 giờ để hình thành khối tế bào hình cầu (tumorsphere) duy nhất trong giếng. Mẫu nanoliposom CF8.4, hoặc nanoliposom L-asparaginaza, hoặc nanoliposom CF8.4 kết hợp với L-asparaginaza ở các nồng độ khác nhau được đưa vào các giếng của đĩa thí nghiệm, mỗi nồng độ được lặp lại 3 lần và ủ tiếp 7 ngày. loại bỏ môi trường nuôi cấy, sau đó đưa vào mỗi giếng 50 µl dung dịch MTT (1 mg/ml). Tiếp theo, để đĩa ở 37°C trong 4 h rồi loại bỏ dung dịch MTT. Cuối cùng, thêm vào mỗi giếng 100 µl DMSO (100%) và đo độ hấp thụ ở bước sóng 490 nm bằng máy đo ELISA chuyên dụng (ELx800, BioTek Instrument). Số liệu được phân tích bằng phần mềm Excel để xác định % ức chế sự phát triển của tế bào trong khối 3D theo công thức:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - \frac{OD(\text{mẫu}) - OD(\text{blank})}{OD(\text{DMSO}) - OD(\text{blank})}$$

Trong đó: OD mẫu đối chứng là độ hấp thụ của giếng chỉ có tế bào; OD mẫu thử là độ hấp thụ của các giếng có tế bào ủ với mẫu nghiên cứu; OD blank là độ hấp thụ của các giếng chỉ có môi trường. Giá trị IC₅₀ được tính nhờ phần mềm TableCurve 2Dv4. So sánh sự sai khác giữa các số liệu được thực hiện bằng phần mềm GraphPad Prism 5.0. Sự khác biệt được coi là có ý nghĩa khi p<0,05.

Kết quả bảng 2 cho thấy, chế phẩm nanoliposom chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) ức chế mạnh mẽ sự phát triển của khối tế bào u 3D (tumorsphere) dòng LLC với giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự phát triển của tế bào) = 1,13 ± 0,19 µg/mL (theo nồng độ CF8.4) và = 0,023 ± 0,003 UI (theo nồng độ L- asparaginaza). Như vậy chế phẩm nanoliposom chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) cho thấy mức hoạt tính vượt

trội, tăng ít nhất 17,69 lần so với CF8.4 nanoliposome ($IC_{50} > 20 \mu\text{g/mL}$) và tăng 5,70 lần so với nanoliposom chỉ chứa L-asparaginaza ($IC_{50} = 0,131 \pm 0,016 \text{ UI}$).

Bảng 2. Hoạt tính ức chế sự phát triển khối tế bào ung thư 3D dòng LLC (tumorsphere) của chế phẩm nanoliposom chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4)

Nồng độ CF8.4 (µg/mL)	CF8.4 nanoliposom		CF8.4+ L- asparaginaza nanoliposom		L-asparaginaza nanoliposom		Nồng độ L- asparaginaza (UI)
	% ức chế	sai số	% ức chế	sai số	% ức chế	sai số	
20	24,52	0,73	94,16	8,34	79.53	4.64	0.4
4	16,22	2,07	65,44	6,14	40.27	4.78	0.08
0,8	1,06	0,19	47,11	6,20	20.51	2.32	0.016
0,16	-8,94	0,92	32,18	5,85	9.14	0.18	0.0032
IC ₅₀	>20		(1,13 ± 0,19)***		-		IC ₅₀
	-		(0,023 ± 0,003)###		0,131 ± 0,016		

Ghi chú: $***P < 0.001$ so với CF8.4 nanoliposom; $###P < 0.001$ so với L-asparaginaza nanoliposom

Ví dụ 4: Thử nghiệm khả năng ức chế sự phát triển của khối u ung thư trên chuột của chế phẩm nanoliposom chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4)

Chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) thu được từ Ví dụ 1 (còn được gọi là nanoliposom CF8.4 + L-asparaginaza hoặc CF8.4 + L-asparaginaza nanoliposom) được sử dụng trong thử nghiệm khả năng ức chế sự phát triển của tế bào gốc ung thư ở người dòng NTERA-2.

Chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza (còn được gọi là nanoliposom L-asparaginaza hoặc L-asparaginaza nanoliposom) và chế phẩm nanoliposom nhiều lớp cinchonain Ia (CF8.4) (còn được gọi là nanoliposom CF8.4 hoặc CF8.4 nanoliposom) được tạo theo các quy trình tương tự như trong Ví dụ 1, trong đó chỉ sử dụng L-asparaginaza hoặc cinchonain Ia (CF8.4).

Gây u cho chuột bằng dòng tế bào LLC: Tế bào LLC được nuôi trong môi trường DMEM có bổ sung 10% huyết thanh phôi bò và 1% kháng sinh ở 37°C và 5% CO_2 , khi tế bào mọc tốt tiến hành thu hoạch và tiêm vào bắp đùi chuột nồng độ 2×10^6 tế bào/con (là nồng độ gây u cho chuột thí nghiệm đạt 100%). Sau khi tiêm tế bào LLC 5 ngày thấy có u

thì cho chuột sử dụng mẫu nghiên cứu (Iigo *et al.* 1991; Kimura *et al.* 2004; Thao *et al.* 2019).

Xác định khả năng ức chế khối u trên mô hình chuột bị gây u bằng dòng tế bào LLC: 40 chuột BALB/c khoẻ mạnh, có độ tuổi từ 8-9 tuần tuổi, được tiêm tế bào LLC vào bắp đùi phải của chuột. Sau 5 ngày tiêm LLC, kích thước u của các chuột được xác định, phân chia làm các lô và tiêm mẫu thí nghiệm, như sau:

Lô 1: (đối chứng bệnh lý) tiêm LLC, sau 5 ngày có u thì tiêm ven mẫu nanoliposome-blank, tiêm 2 ngày 1 lần, tiêm 7 lần.

Lô 2: (thử mẫu) tiêm LLC, sau 5 ngày có u thì tiêm mẫu nanoliposom CF8.4 vào ven đuôi nồng độ 5 mg/kg, tiêm 2 ngày 1 lần, tiêm 7 lần.

Lô 3 (thử mẫu): tiêm LLC, sau 5 ngày có u thì tiêm mẫu nanoliposom L-asparaginaza liều 3 UI/con, tiêm 2 ngày 1 lần, tiêm 7 lần

Lô 4 (thử mẫu): tiêm LLC, sau 5 ngày có u thì tiêm mẫu nanoliposom CF8.4 + L-asparaginaza (liều 3 UI/con), tiêm 2 ngày 1 lần, tiêm 7 lần

Theo dõi chuột hàng ngày, cân khối lượng và đo kích thước khối u sơ cấp tại vị trí tiêm 7 ngày/lần theo phương pháp của Kimura *et al.* (2004), Lee *et al.* (2006); để xác định khả năng ức chế khối u của mẫu nghiên cứu. Thể tích khối u được tính theo công thức của Lee (2006) như sau: $V = a \times b^2/2$; Trong đó, V : thể tích khối u; a : chiều dài khối u; b : đường kính khối u

Với bố trí thí nghiệm như trên, chúng tôi nghiên cứu được khả năng kháng u ung thư của mẫu thông qua việc ức chế khối u phát triển. Kết quả được so sánh với lô đối chứng bệnh lý. Sau 28 ngày thử nghiệm (kể từ thời điểm sử dụng mẫu) toàn bộ 10 chuột/lô bị giết để phân lập khối u, thu máu để xác định sự ảnh hưởng của mẫu tới các chỉ tiêu huyết học, enzym gan, thận cơ bản.

Kết quả ở bảng 3, bảng 4 và hình 5 cho thấy:

Nanoliposom cinchonain Ia (CF8.4) có khả năng ức chế sự phát triển của thể tích khối u khoảng 16,24% tại thời điểm kết thúc thí nghiệm ($p > 0,05$ so với đối chứng bệnh lý). Nanoliposom L-asparaginaza (liều 3 UI/con) có khả năng ức chế khối u đạt 27,21 % tại thời

điểm kết thúc thí nghiệm và ở mức có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) với lô đối chứng bệnh lý.

Trong khi đó, nanoliposom L-asparaginaza + CF8.4 (liều 3 UI/con) có khả năng ức chế sự phát triển của khối u mạnh mẽ và nổi trội hơn hẳn chế phẩm nanoliposom riêng lẻ với % ức chế khối u lên đến 62,69 % ở thời điểm kết thúc thí nghiệm khi so sánh với lô đối chứng không được điều trị ($p < 0,001$). Bên cạnh đó, sự sai khác này cũng thể hiện ở thời điểm 21 ngày nghiên cứu.

Ngoài ra, tại thời điểm kết thúc thí nghiệm, khi so sánh với lô thí nghiệm sử dụng nanoliposom chứa L-asparaginaza (liều 3 UI/con), lô được điều trị với nanoliposom L-asparaginaza + CF8.4 (liều 3 UI/con) thể hiện khả năng ức chế khối u mạnh hơn ở mức có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$; 1 chiều) tại thời điểm kết thúc thí nghiệm. Sự khác biệt này thể hiện rõ hơn khi so sánh giữa lô điều trị với nanoliposom L-asparaginaza + CF8.4 (liều 3 UI/con) và lô điều trị với nanoliposom chứa cinchonain Ia (CF8.4) ($p < 0,01$).

Bên cạnh đó, không có sự khác biệt giữa khối lượng của các nhóm thí nghiệm so với đối chứng ở mức có ý nghĩa thống kê (bảng 5) cho thấy các mẫu nghiên cứu không thể hiện độc tính với cơ thể.

Bảng 3. Thể tích khối u tại các thời điểm khác nhau (mm^3)

Ngày TNo	Đối chứng (nanoliposom blank)		CF8.4 nanoliposom		L-asparaginaza nanoliposom		CF8.4+ L- asparaginaza nanoliposom	
	% ức chế	sai số	% ức chế	sai số	% ức chế	sai số	% ức chế	sai số
0	320,77	50,12	301,70	71,30	307,10	82,18	326,73	24,18
7	2453,97	422,26	2199,52	309,82	1984,27	585,42	1457,10	302,02
14	4119,74	379,75	2763,06*	389,10	2128,37*	785,03	2320,73*	881,76
21	7631,84	632,59	6374,85	877,21	5382,06	1869,74	3322,55***	1002,35
28	9468,208	742,25	7930,67 ^b	917,76	6891,98 ^{a*}	1235,77	3551,68***	936,24

Ghi chú: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ so với lô đối chứng bệnh lý (tiêm nanoliposom blank);

^a $P < 0,05$ so với lô tiêm CF8.4 nanoliposom; ^b $P < 0,01$ so với lô tiêm L-asparaginaza nanoliposom

Bảng 4. Khả năng ức chế sự phát triển khối u của các mẫu nanoliposom so với đối chứng (tiêm nanoliposom blank)

Ngày TNo	% ức chế sự phát triển khối u so với đối chứng bệnh lý (tiêm nanoliposom blank)		
	CF8.4 nanoliposom	L-asparaginaza nanoliposom	CF8.4+ L-asparaginaza nanoliposom
ngày 0	-	-	-
ngày 7	10,37	19,14	40,62
ngày 14	32,93	48,34	43,67
ngày 21	16,47	29,48	56,46
ngày 28	16,24	27,21	62,49

Bảng 5. Khối lượng trung bình chuột u ở các lô thí nghiệm (g/con)

Lô TNo		Khối lượng trung bình của chuột (g/con)				
		ngày 0	ngày 7	ngày 14	ngày 21	ngày 28
CF8.4 nanoliposom	Trung bình	30,14	31,50	31,16	31,10	32,84
	sai số	2,66	1,79	1,56	2,16	2,29
L-asparaginaza nanoliposom	Trung bình	30,20	30,70	32,30	34,00	34,60
	sai số	3,06	2,98	3,17	3,81	3,62
CF8.4+ L-asparaginaza nanoliposom	Trung bình	30,48	33,00	33,38	34,05	31,38
	sai số	0,54	0,54	0,77	1,28	1,33
Đối chứng (nanoliposom blank)	Trung bình	29,98	32,44	32,98	33,42	32,81
	sai số	1,57	1,15	1,29	1,61	1,29

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza kết hợp với cinchonain Ia (CF8.4) theo sáng chế có thể phân tán tốt trong nước nhằm phù hợp để tiêm tĩnh mạch, có thể khắc phục được các khiếm khuyết của thuốc L-asparaginaza tự do và nâng cao hiệu quả trong điều trị ung thư.

Chế phẩm theo sáng chế có tiềm năng lớn trong việc ứng dụng trong điều trị ung thư.

YÊU CẦU BẢO HỘ

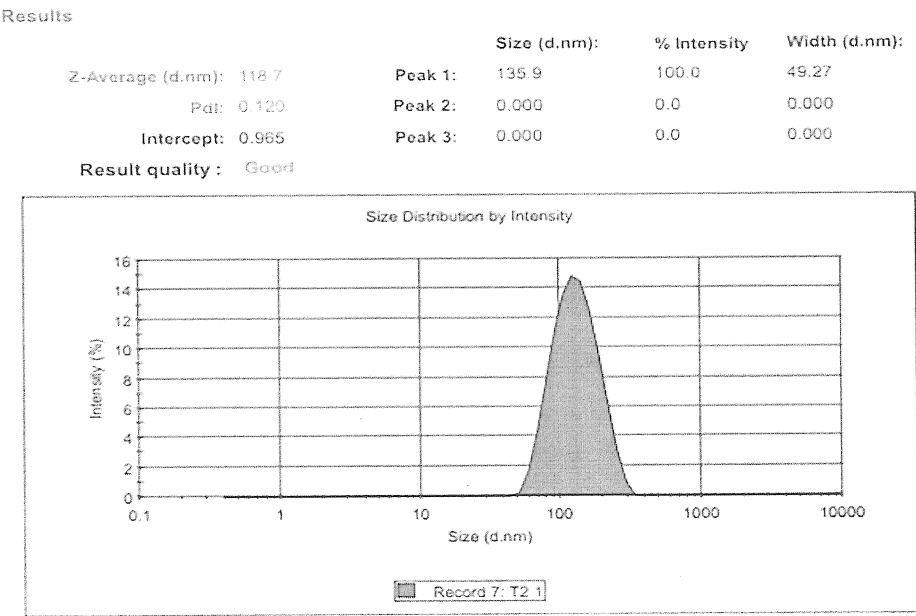
1. Chế phẩm nanoliposom nhiều lớp chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) có khả năng ức chế sự phát triển của khối u, trong đó chế phẩm này:

a) chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4), trong đó tỷ lệ giữa L-asparaginaza và CF8.4 là từ 2 đến 20 UI/mg, và lượng CF8.4 trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 5 đến 15% khối lượng; và

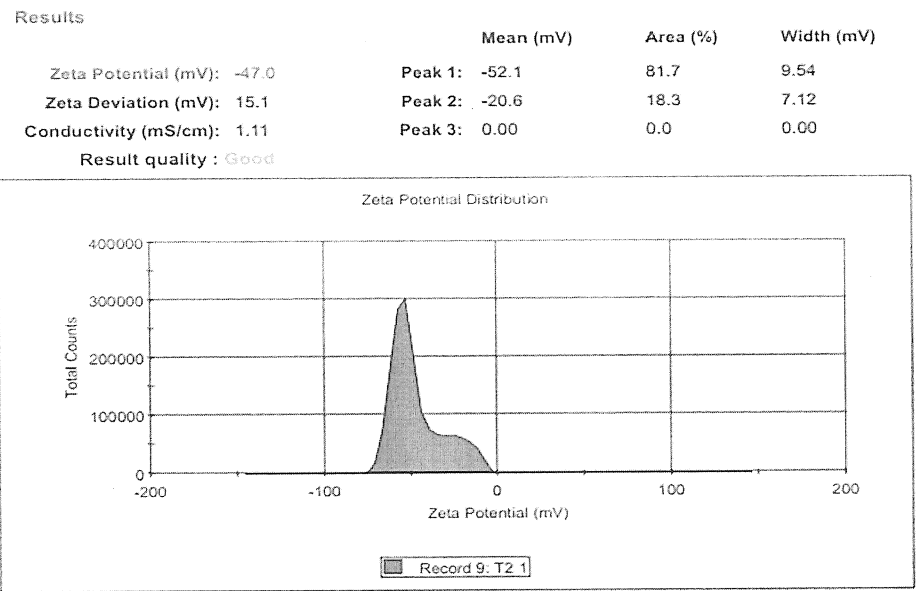
b) chế phẩm ở dạng nanoliposom nhiều lớp và được tạo ra theo quy trình sau:

- hòa tan lecithin đậu nành và cholesterol trong metanol theo tỉ lệ lecithin đậu nành/cholesterol 9:1 (mol/mol) để thu được hỗn hợp A;
- hòa tan D-alpha tocopheryl polyetylen glycol succinat (TPGS) đến nồng độ 5,2 mM trong metanol để thu được dung dịch B;
- hòa tan CF8.4 trong metanol đến nồng độ 9 mM để thu được dung dịch C;
- gộp các dung dịch A, B và C thu được ở trên với nhau với tỷ lệ lectin/TPGS/CF8.4 là 9/5,2/9 (mol/mol/mol) và tiến hành cô quay chân không ở áp suất 40 mmHg tại nhiệt độ 50 °C, tốc độ 100-200 vòng/phút để loại bỏ dung môi và tạo thành lớp màng mỏng lipit khô;
- để lớp màng mỏng lipit khô này ở 4 °C qua đêm rồi tiến hành hydrat hóa lipit trong điều kiện phun khí nitơ với dung dịch L-asparaginaza theo tỷ lệ L-asparaginaza và CF8.4 là từ 2 đến 20 UI/mg, thời gian hydrat hóa trong 5 phút, sau đó bổ sung dung dịch nước muối sinh lý sao cho CF8.4 trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 5 đến 15% khối lượng để tạo ra hỗn dịch chứa các hạt nanoliposom nhiều lớp;
- chuyển hỗn dịch chứa các hạt nano liposom nhiều lớp này vào hệ thống bể siêu âm với chu trình siêu âm 3 lần liên tục, mỗi lần 10 phút với cường độ từ 8 đến 10 biên độ để ổn định cấu trúc hạt; và
- lọc hỗn hợp chứa các hạt nano liposom sau khi siêu âm qua màng lọc 0,22 µm, thu được chế phẩm chứa L-asparaginaza và cinchonain Ia (CF8.4) ở dạng nanoliposom nhiều lớp.

HÌNH 1

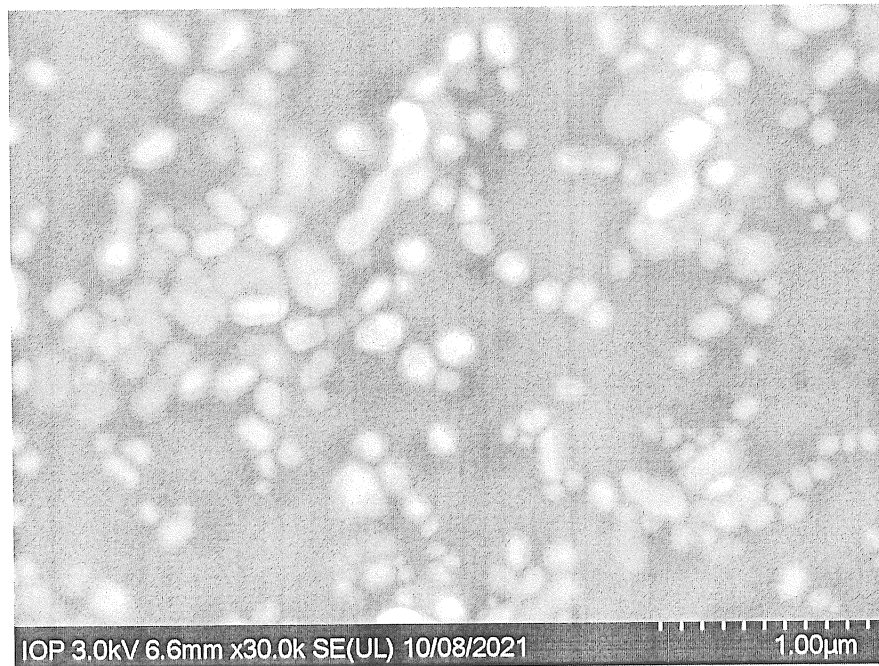


HÌNH 2

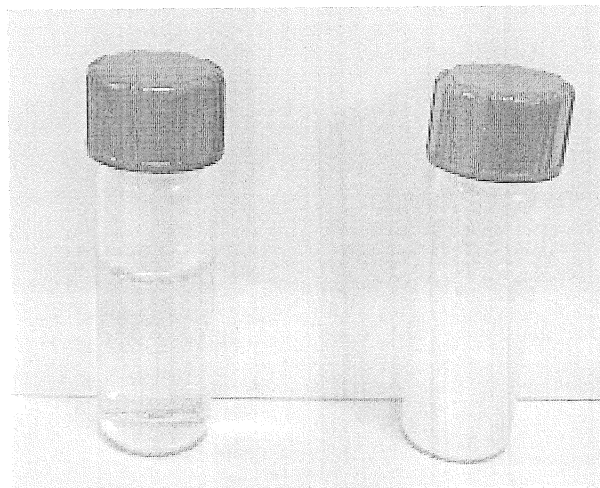


38757

HÌNH 3



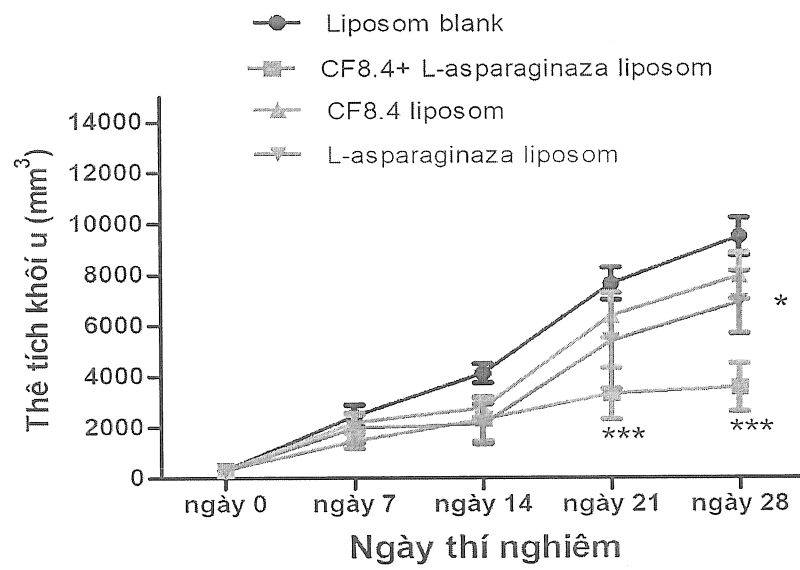
HÌNH 4



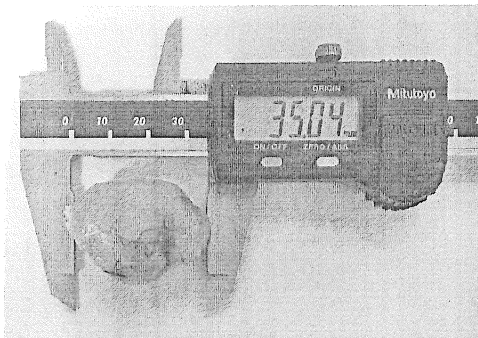
(A)

(B)

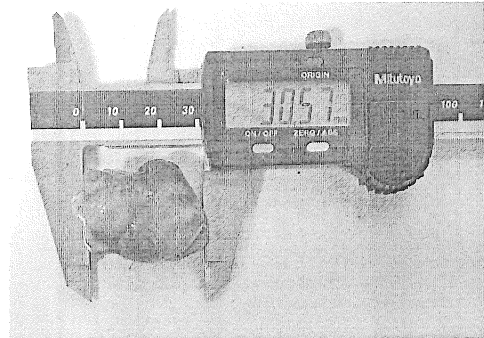
HÌNH 5



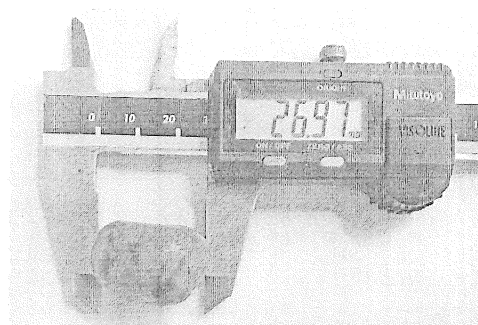
HÌNH 6



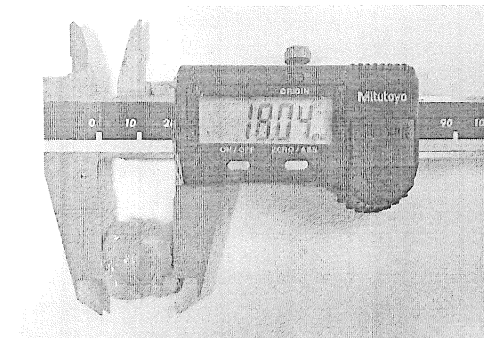
(A)



(B)



(C)



(D)