



(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)



1-0041625

(51)^{2021.01} A61K 47/42; A61K 47/50

(13) B

(21) 1-2022-05827

(22) 13/09/2022

(45) 25/11/2024 440

(43) 25/11/2022 416

(73) Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

1B, đường Thanh Lộc 29, khu phố 1, phường Thanh Lộc, quận 12, thành phố Hồ Chí Minh

(72) Nguyễn Đại Hải (VN).

(54) QUY TRÌNH TỔNG HỢP VẬT LIỆU GELATIN-POLYETYLEN GLYCOL-AXIT FOLIC (GEL-PEG-FA) DÙNG TRONG HỆ TỔNG HỢP NANO HƯỚNG ĐÍCH, VẬT LIỆU GEL-PEG-FA THU ĐƯỢC TỪ QUY TRÌNH NÀY VÀ QUY TRÌNH TỔNG HỢP LIPOSOM ĐƯỢC BIẾN TÍNH BỀ MẶT BẰNG VẬT LIỆU GEL-PEG-FA NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình tổng hợp vật liệu gelatin-polyetylen glycol-axit folic (Gel-PEG-FA) dùng trong hệ tổng hợp nano hướng đích, vật liệu Gel-PEG-FA thu được từ quy trình này và quy trình tổng hợp liposom được biến tính bề mặt bằng vật liệu Gel-PEG-FA này. Liposom hướng đích được biến tính bằng vật liệu này có thời gian tuần hoàn trong máu được kéo dài, giúp tập trung thuốc tại tế bào đích và làm tăng hiệu quả điều trị. Vật liệu Gel-PEG-FA và liposom được biến tính bề mặt bằng vật liệu Gel-PEG-FA là một sản phẩm tiềm năng để ứng dụng trong y sinh, cụ thể là ứng dụng làm hệ chất mang thuốc trong điều trị bệnh ung thư bằng liệu pháp hướng đích.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ hóa dược, y sinh. Cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình tổng hợp vật liệu gelatin-polyetylen glycol-axit folic (Gel-PEG-FA) dùng trong hệ tổng hợp nano hướng đích, vật liệu Gel-PEG-FA thu được từ quy trình này và quy trình tổng hợp liposom được biến tính bề mặt bằng vật liệu Gel-PEG-FA này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Theo số liệu thống kê của GLOBOCA 2020 (một dự án của Cơ quan nghiên cứu ung thư quốc tế) thì tình hình mắc và tử vong do ung thư trên toàn thế giới vẫn còn có xu hướng gia tăng. Trong 185/204 quốc gia có báo cáo thống kê về tình hình bệnh ung thư, Việt Nam xếp thứ 91/185 về tỷ lệ mắc mới và thứ 50/185 về tỷ lệ tử vong trên 100000 người. Thứ hạng này cho thấy tình hình mắc mới và tử vong do ung thư ở Việt Nam đang tăng nhanh (tỷ lệ mắc mới và tử vong do ung thư ở Việt Nam năm 2018 là 99/185 và 56/185). Tình hình này cũng xảy ra tương tự với nhiều quốc gia trên thế giới, trong đó có các quốc gia phát triển như Anh, Pháp, Ý, Nhật Bản, Hàn Quốc, Thái Lan, Hoa Kỳ. Tuy nhiên, tỷ lệ tử vong do ung thư tại các quốc gia này lại giảm. Trong đó, vấn đề đáng chú ý là hầu hết các nước nghèo đều cho thấy tỷ lệ tử vong do ung thư có chiều hướng gia tăng. Xu hướng này cho thấy sự hạn chế trong việc tiếp cận đối với các phương pháp chữa trị mới và đặc biệt là các phương pháp chữa trị có giá thành thấp nhưng đem lại hiệu quả cao. Cho tới nay, hóa trị liệu vẫn là một trong những phương pháp phổ biến trong phác đồ điều trị hay hỗ trợ trong điều trị ung thư. Bệnh nhân trong giai đoạn điều trị ung thư thường mệt mỏi, chán ăn, giảm sức đề kháng và rụng tóc,... nguyên nhân là do trong quá trình hóa trị, thuốc điều trị ung thư được đưa vào trong cơ thể không chỉ tiêu diệt tế bào ung thư mà còn tiêu diệt luôn các tế bào lành. Điều đó dẫn đến hiệu quả điều trị giảm và gây ảnh hưởng rất nhiều đến sức khỏe bệnh nhân.

Công nghệ nano đã ra đời và có nhiều phát triển ứng dụng vượt bậc. Ứng dụng công nghệ nano trong y học cụ thể là hạt nano dẫn truyền thuốc đã mở ra một trang mới trong phát hiện, chuẩn đoán và điều trị bệnh ung thư. Hạt nano dẫn truyền thuốc có kích thước nhỏ từ 2-200 nm nên khi đưa vào trong cơ thể hạt nano có thể di chuyển theo mạch máu tới các tế bào ung thư. Bằng nhiều phương pháp tổng hợp có thể tạo ra nhiều hạt nano dẫn truyền thuốc như nanogel, micell, dendrime, liposom,... Trong đó liposom đang được chú ý bởi đặc tính như khả năng mang tải thuốc cao có thể mang thuốc ưa nước hoặc kỵ nước, kích thước hạt từ 100-200 nm, hệ có độ ổn định hơn, tốc độ phóng thích thuốc chậm, tương thích sinh học,...

Nghiên cứu của Nakamura và cộng sự (2012) đã cho thấy việc biến đổi bề mặt liposom bằng tác nhân polyme sẽ tạo ra các đặc điểm có lợi cho hệ mang thuốc. Nghiên cứu đã tiến hành khảo sát các phương pháp để gắn polyetylen glycol (PEG) lên bề mặt liposom, nhiệt độ và thời gian lên tính chất của hệ liposom sau tổng hợp. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ PEG tỷ lệ thuận với kích thước hạt và thế zeta của hệ liposom. Khi tăng tỷ lệ PEG từ 0% đến 2% (phần trăm mol) thì kích thước hạt tăng từ 110 nm lên đến 130 nm. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu cho thấy hệ có gắn PEG ở tỷ lệ cao sẽ góp phần làm tăng độ ổn định, giảm việc lipid bị phân hủy và giúp tăng cường thời gian lưu thông trong cơ thể. Tuy nhiên, việc chỉ sử dụng một loại polyme PEG với quy trình nang hóa thuốc tương đối dài đã làm giảm khả năng ứng dụng của hệ mang thuốc.

Wei và cộng sự (2015) đã phát triển một hệ liposom hướng đích bằng việc biến đổi bề mặt hệ với lactoferrin – một loại phối tử hướng đích cho mục tiêu vận chuyển thuốc chủ động tới tế bào ung thư. Trong nghiên cứu này, tác giả đề xuất việc sử dụng tác nhân hướng đích gắn lên bề mặt liposom bằng liên kết cộng hóa trị amit. Hệ mang thuốc của nghiên cứu cho thấy rằng liposom từ lecithin đậu nành khi được biến đổi bề mặt bằng các tác nhân hướng đích tạo ra hạt nano có kích thước khoảng 100 nm và khả năng phóng thích thuốc tốt. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu còn cho thấy khả năng thâm nhập vào tế bào của hệ liposom được biến đổi bề mặt bằng tác nhân lactoferrin hướng đích là tốt hơn so với liposom thông thường.

Marcos-Contreras và cộng sự (2019) đã công bố nghiên cứu về hệ liposom được biến đổi bề mặt bằng tác nhân hướng đích là kháng thể ICAM-1 trong việc tăng cường khả năng hấp thụ chất ở não. Kết quả nghiên cứu cho thấy kích thước hạt của hệ liposom tổng hợp là 200 nm. Kết quả thử nghiệm trên chuột kèm với phân tích trực quan bằng hình ảnh cho thấy hệ được chứng minh là có khả năng phân bố tốt ở mô hình động vật. Ngoài ra, hệ liposom còn cho thấy đặc tính thâm nhập nội bào cao gấp 5 lần và khả năng lưu thông trong máu lâu hơn so với hệ liposom thông thường.

Năm 2019, Wang và cộng sự đã biến tính folic axit lên bề mặt liposom có phospholipit đã được gắn PEG để đánh giá hoạt tính tiêu diệt khối u *in vitro* và *in vivo*. Hệ liposom theo nghiên cứu được tổng hợp từ Distearoyl-la-phosphatidylethanolamin (DSPE)-PEG2000 biến tính axit folic (FA) mang curcumin (CUR). Kết quả nghiên cứu cho thấy DSPE-PEG2000-FA-LPs/CUR tổng hợp được có dạng hình cầu và có kích thước hạt là $112,3 \pm 4,6$ nm với chỉ số đa phân tán $0,19 \pm 0,03$ và thế zeta là $-15,3 \pm 1,4$ mV. Ngoài ra, hiệu suất mang thuốc và khả năng mang thuốc của DSPE-PEG2000-FA-LPs/CUR lần lượt là 87,6% và 7,9%. Liposom biến tính FA mang CUR cho thấy sự phóng CUR kéo dài hơn so với CUR tự do. DSPE-PEG2000-FA-LPs/CUR cho thấy tác dụng chống tăng sinh vượt trội trên tế bào HeLa và có tác dụng chống khối u *in vivo* tốt hơn so với liposom chưa biến tính.

Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có hệ liposom được biến đổi bề mặt bằng polyme tương thích sinh học hoặc/và tác nhân hướng đích mang thuốc điều trị ung thư được thương mại hóa. Bên cạnh đó, nguồn cung cấp thuốc điều trị ung thư dựa trên công nghệ nano chủ yếu được nhập khẩu nên có giá thành cao gây ảnh hưởng tới kinh tế người bệnh. Vì vậy, các chế phẩm liposom này khi được phát triển và ứng dụng trong lĩnh vực mang thuốc điều trị ung thư sẽ đáp ứng được nhu cầu của người bệnh.

Hầu hết các nghiên cứu trong nước chủ yếu tập trung bào chế và đánh giá hiệu quả của liposom ứng dụng làm hệ chất mang thuốc đều sử dụng lecithin thương mại là các phospholipit tổng hợp hoặc phospholipit có nguồn gốc từ động vật (điển hình là phospholipit có nguồn gốc từ lòng đỏ trứng). Việc sử dụng các loại lecithin này lại mang nguy cơ truyền nhiễm các mầm bệnh.

Hiện nay tuy đã có những hệ hướng đích ứng dụng trong việc vận chuyển dược chất, nhưng các hệ này vẫn còn những điểm cần khắc phục như giá thành tổng hợp còn cao, khả năng hướng đích kém, chưa hoạt động một cách hiệu quả ở độ pH thấp, là độ pH thường gặp xung quanh các khối u,.. Do đó, vẫn có nhu cầu về các vật liệu ứng dụng trong sản xuất các hệ nano hướng đích, giúp tạo các loại thuốc điều trị ung thư chất lượng tốt hơn, để có thể đáp ứng được nhu cầu điều trị của người bệnh một cách tốt hơn nữa.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất quy trình tổng hợp vật liệu gelatin-polyetylen glycol-axit folic (Gel-PEG-FA) dùng trong hệ tổng hợp nano hướng đích, vật liệu Gel-PEG-FA thu được từ quy trình này và quy trình tổng hợp liposom được biến tính bề mặt bằng vật liệu Gel-PEG-FA này.

Polyetylen glycol (PEG) là một polyme được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, bao gồm Y sinh dưới sự phê duyệt của Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ. Ưu điểm của PEG là nó có khả năng tan được trong cả dung môi nước và hữu cơ, có độ tương hợp sinh học cao, không có độc tính, có tính kháng protein, không gây kích thích miễn dịch và có động học bài tiết tốt. Hệ liposom được biến tính bề mặt với PEG sẽ giúp tăng thời gian tuần hoàn và giảm tốc độ thanh thải trong huyết tương so với hệ liposom thông thường.

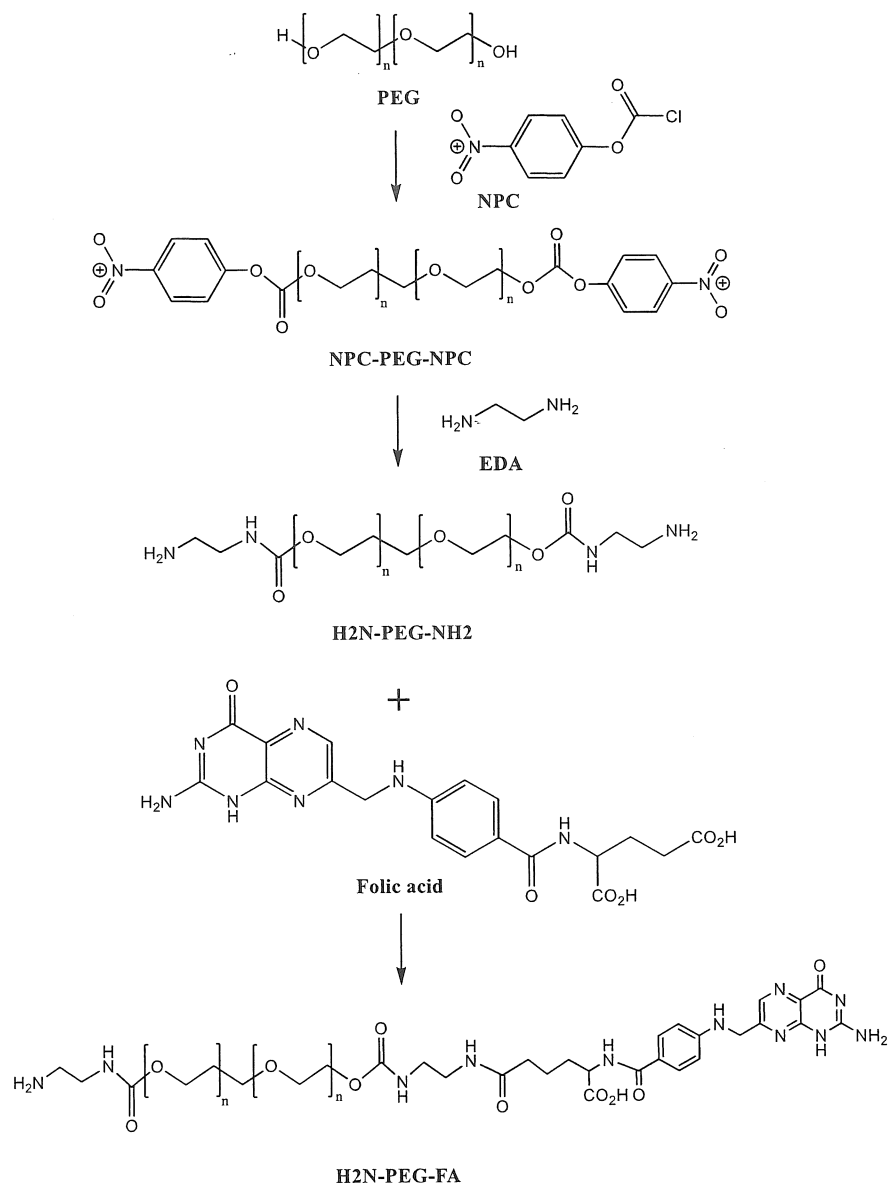
Axit folic (FA) được sử dụng phổ biến như một phối tử để nhắm mục tiêu vào thụ thể trên các tế bào ung thư (folic acid receptor, FR). Vì vậy, khi hệ liposom được biến tính bề mặt với FA sẽ giúp phân phối thuốc hướng đích vào các tế bào ung thư.

Gelatin là chế phẩm được tạo ra từ collagen chiết xuất ở phía dưới da, xương của động vật hoặc từ thực vật. Gelatin bao gồm các axit amin nối bởi liên kết peptit. Gelatin giảm cấp bởi enzym tạo thành các axit amin. Gelatin bao gồm hai loại là gelatin loại A và gelatin loại B. Trong đó, gelatin loại A được điều chế từ da lợn bằng cách thủy phân trong môi trường axit. Gelatin loại B được điều chế từ da và xương động vật khác bằng cách thủy phân trong môi trường kiềm. Về mặt sinh học, gelatin có tính tương hợp sinh học và đã được sử dụng trong các sản phẩm y sinh theo quy định của Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ.

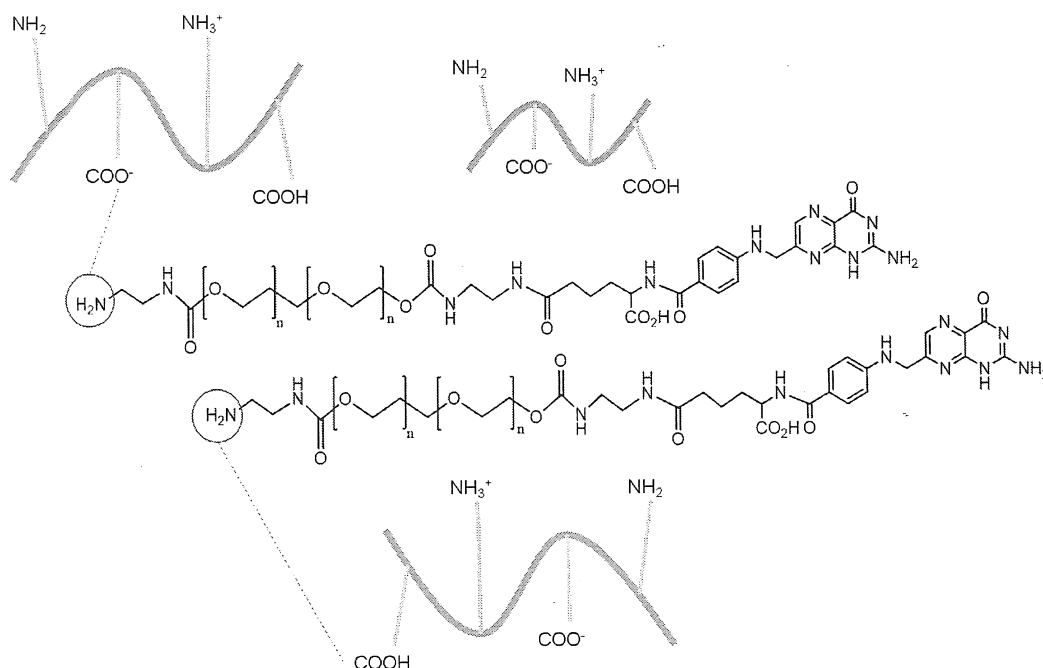
Hệ liposom được tổng hợp trên cơ sở lipit thực vật có thể tách chiết ở Việt Nam, nguồn lipit từ thực vật thân thiện với môi trường, cụ thể là lecithin đậu nành. Hệ liposom được gắn với một số tác nhân như gelatin, polyetylen glycol và axit folic, tăng thời gian tuần hoàn, giảm tốc độ thanh thải trong huyết tương và hướng đích tế bào ung thư, đây là giải pháp có tính khả thi cho việc thương mại hóa các loại thuốc điều trị ung thư với chất lượng đáp ứng được nhu cầu của người bệnh.

Vật liệu Gel-PEG-FA theo sáng chế là polyme tương thích sinh học cao và có khả năng hướng đích tốt, do đó khi sử dụng vật liệu này để phủ lên bề mặt liposom mang được chất sẽ giúp tập trung được chất tại tế bào đích và làm tăng hiệu quả gây độc tế bào. Bên cạnh đó, vật liệu có PEG giúp hệ liposom tuần hoàn lâu hơn trong máu. Chế phẩm liposom hướng đích thu được từ quy trình theo sáng chế có thể sản xuất rộng rãi với số lượng lớn, dễ dàng vì lecithin đậu nành là nguồn nguyên liệu tương đối dễ kiếm và có giá thành rẻ.

Vật liệu Gel-PEG-FA được tổng hợp bắt đầu từ phần của PEG. PEG-FA được tổng hợp qua phản ứng 3 giai đoạn: hoạt hóa p-nitrophenyl chloroformat (NPC), phản ứng tạo nhóm NH_2 và gắn nhóm chức phản ứng. Phản ứng tổng hợp FA-PEG- NH_2 được tổng hợp qua phản ứng 3 giai đoạn như sau:



Sau đó sẽ thực hiện phản ứng tạo nhóm chức phản ứng $-\text{COOH}$ vào vị trí gốc $-\text{NH}_2$ và gắn Gel để thu được vật liệu Gel-PEG-FA.



Vật liệu Gel-PEG-FA thu được theo sáng chế không mùi, không vị, dạng sợi, màu vàng nhạt và tan trong nước.

Sáng chế cũng đề xuất quy trình tổng hợp liposom được biến tính bề mặt bằng vật liệu Gel-PEG-FA này. Quy trình này được thực hiện theo phương pháp hydrat hóa màng film lipid. Liposom thu được từ quy trình này dạng bột, màu vàng và tan trong nước.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh phổ FT-IR của (a) Gel-PEG-FA, (b) NH₂-PEG-FA, (c) FA, (d) PEG-NH₂, (e) PEG-NPC và (f) Gel.

Hình 2 là hình ảnh phổ ¹H-NMR của Gel-PEG-FA, dung môi (CD₃)₂ S=O.

Hình 3 là hình ảnh phổ FT-IR của (a) liposom biến tính Gel-PEG-FA, (b) Gel-PEG-FA, (c) NH₂-PEG-FA, (d) FA, (e) PEG-NH₂, (f) PEG-NPC và (g) Gel.

Hình 4 là hình ảnh phổ TGA (a) và DSC (b) của liposom biến tính Gel-PEG-FA.

Hình 5 là hình ảnh hệ liposom chưa biến tính và biến tính Gel-PEG-FA trong huyết thanh.

Hình 6 là hình ảnh kết quả phóng thích thuốc của hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA ở pH 7,4 (a) và pH 4,5 (b). (▲) là thuốc từ hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA và (■) là thuốc tự do.

Hình 7 là biểu đồ độ độc trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 của hệ liposom được biến tính bằng vật liệu Gel-PEG-FA mang thuốc quercetin và thuốc quercetin.

Hình 8 là sự hấp thu quercetin nội bào của các tế bào ung thư vú ở người (MCF-7). Kính hiển vi đồng tiêu (confocal microscopy) được sử dụng để đánh giá sự hấp thu và phân phối nội bào của quercetin trong tế bào MCF-7. Tế bào không được ủ với liposom được sử dụng làm đối chứng. Cột đầu tiên đại diện cho hình ảnh hiển vi tương phản pha và các cột liên tiếp đại diện cho lớp phủ DAPI (màu xanh dương), liposom được nhuộm bằng thuốc nhuộm DiO (màu xanh lá), liposom được nhuộm bằng thuốc nhuộm DiO + DAPI và hình ảnh hợp nhất.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với các phương án và những ví dụ thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án và những ví dụ này chỉ nhằm mục đích bộc lộ các phương án thực hiện sáng chế chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Các bước thực hiện quy trình tổng hợp vật liệu gelatin-polyetylen glycol-axit folic (Gel-PEG-FA) dùng trong hệ tổng hợp nano hướng đích theo sáng chế được mô tả một cách chi tiết dưới đây.

(i) Chuẩn bị nguyên liệu:

Chuẩn bị các hợp chất theo tỷ lệ khối lượng như sau:

polyetylen glycol (PEG): 10.000-20.000 phần

p-nitrophenyl chloroformat (NPC): 1-2.000 phần

tetrahydrofuran (THF): 1-20 phần

ethylenediamin (EDA): 1-2.000 phần

axit folic (FA): 1-2.000 phần

dimethyl sulfoxit (DMSO): 1-2.000 phần

etylen diclorua (EDC): 1-200 phần

axit succinic: 1-1.000 phần

gelatin (Gel): 1-100 phần

PEG là polyme mạch dài có công thức chung là $H(OCH_2CH_2)_nOH$, trong đó, với n (mức độ polyme hoá) xác định, PEG sẽ có khối lượng phân tử trung bình và tính chất xác định. PEG được sử dụng có khối lượng phân tử từ 4000 Da trở lên.

NPC, THF, EDA, FA, DMSO, EDC, axit succinic được sử dụng là các hợp chất tinh khiết (>96%).

Gelatin (Gel) trên thị trường hiện nay gồm hai loại là loại A và loại B. Trong đó, gelatin loại A được điều chế từ da lợn bằng cách thủy phân trong môi trường axit, gelatin loại B được điều chế từ da và xương động vật khác bằng cách thủy phân trong môi trường kiềm. Có thể sử dụng Gel loại A hoặc loại B để tổng hợp vật liệu Gel-PEG-FA dùng trong hệ tổng hợp nano hướng đích theo sáng chế. Gelatin có giá thành tương đối thấp, việc kết hợp gelatin vào vì tính tương hợp sinh học tuyệt vời, tính kháng nguyên thấp, khả năng phân hủy sinh học được kiểm soát.

Các hợp chất nêu trên đều được bán rộng rãi trên thị trường.

(ii) Điều chế NH_2 -PEG- NH_2 :

Hòa tan PEG với NPC vào dung dịch THF trong môi trường có nitơ, khuấy đều trong 12-24 giờ.

Nhỏ dung dịch thu được vào EDA trong môi trường có nitơ, khuấy đều trong 24 giờ tại nhiệt độ phòng.

Thực hiện đông khô trong máy đông khô $-45^\circ C$, thu được NH_2 -PEG- NH_2 .

Ở giai đoạn điều chế NH_2 -PEG- NH_2 , PEG được cho phản ứng với NPC, trong đó tỷ lệ PEG gấp ít nhất 10 lần NPC để NPC được sử dụng hết không để lại lượng dư, để hoạt hóa các nhóm $-OH$ của PEG trong môi trường khí nitơ trong 24 giờ, thu được PEG đã hoạt hóa.

Tiếp theo, cho PEG đã hoạt hóa phản ứng tạo nhóm amin bằng cách cho phản ứng với EDA trong môi trường khí nitơ trong 24 giờ, trong đó tỷ lệ PEG đã hoạt hóa được sử dụng gấp ít nhất 10 lần EDA để EDA được sử dụng hết không để lại lượng dư. Việc thực

hiện phản ứng trong môi trường khí nitơ để tạo môi trường khí trơ để hạn chế việc NPC bị bất hoạt do phản ứng với nước có trong không khí.

(iii) Điều chế FA-PEG-NH₂:

Hòa tan NH₂-PEG-NH₂ thu được từ bước (ii) trong nước cất để thu được dung dịch NH₂-PEG-NH₂ có nồng độ 0,01-20% (khối lượng).

Hòa tan FA trong dung môi DMSO thu được dung dịch FA hòa tan trong dung môi.

Hòa tan một nửa lượng EDC đã chuẩn bị với nước cất để thu được dung dịch có nồng độ 0,01-10% (khối lượng).

Phối trộn dung dịch FA hòa tan trong dung môi với dung dịch EDC, đồng thời khuấy đều trong môi trường có nitơ trong khoảng thời gian từ 1 đến 2 giờ tại điều kiện pH axit, thu được dung dịch FA hoạt hóa.

Phối trộn dung dịch FA hoạt hóa vào dung dịch NH₂-PEG-NH₂, đồng thời khuấy đều trong 24 giờ trong điều kiện tránh ánh sáng. Tiếp đó thực hiện đông khô trong máy đông khô -45°C, thu sản phẩm FA-PEG-NH₂;

Giai đoạn điều chế FA-PEG-NH₂ chính là giai đoạn thứ 3 (gắn nhóm chức phản ứng) trong điều chế PEG-FA. NH₂-PEG-NH₂ được cho phản ứng với FA đã hoạt hóa bằng EDC trong 24 giờ để thu sản phẩm là FA-PEG-NH₂. Tỷ lệ NH₂-PEG-NH₂ được cho phản ứng với FA đã hoạt hóa ít nhất là 10:1.

(iv) Điều chế FA-PEG-COOH:

Hòa tan FA-PEG-NH₂ thu được từ bước (iii) với nước cất để thu được dung dịch có nồng độ 0,01-10% (khối lượng).

Bổ sung axit succinic vào dung dịch FA-PEG-NH₂, khuấy đều trong 1 giờ và tiếp đó đông khô trong máy đông khô -45°C, thu được FA-PEG-COOH.

Việc điều chế FA-PEG-COOH để tạo cho một đầu có NH₂ và một đầu có COOH để phản ứng gắn vào gelatin.

(v) Tổng hợp Gel-PEG-FA:

Hòa tan FA-PEG-COOH trong nước cất có pH axit để thu được dung dịch có nồng độ 0,01-10% (khối lượng), bổ sung lượng EDC còn lại, khuấy đều đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất, thu được dung dịch FA-PEG-COOH.

Hòa tan gelatin (Gel) với nước cất để thu được dung dịch có nồng độ 0,01-10% (khối lượng).

Hòa tan dung dịch FA-PEG-COOH với dung dịch gelatin, đồng thời khuấy đều cho đến khi tan hoàn toàn thu được dung dịch Gel-PEG-FA.

Vì gelatin có một đầu $-NH_2$ và một đầu $-COOH$, vì vậy nếu cho phản ứng trực tiếp với FA-PEG- NH_2 thì vì FA-PEG- NH_2 khá dài nên gelatin sẽ tự gắn vào nhau làm giảm hiệu suất phản ứng. Nếu gelatin được phản ứng với FA-PEG-COOH có một đầu có $-NH_2$ và một đầu có $-COOH$ thì đầu $-COOH$ của FA-PEG-COOH sẽ cạnh tranh gắn vào đầu $-NH_2$ của gelatin và tương tự với đầu $-NH_2$ của gelatin của FA-PEG-COOH sẽ gắn vào đầu $-COOH$ của gelatin vì vậy mà phản ứng tổng hợp Gel-PEG-FA sẽ có hiệu suất phản ứng cao hơn.

(vi) Đông khô thu vật liệu Gel-PEG-FA:

Thực hiện đông khô dung dịch Gel-PEG-FA thu được từ bước (v) trong máy đông khô $-45^\circ C$, thu được vật liệu Gel-PEG-FA.

Vật liệu Gel-PEG-FA thu được theo sáng chế không mùi, không vị, dạng sợi, màu vàng nhạt và tan trong nước. Vật liệu Gel-PEG-FA thu được là những polyme tương thích sinh học cao và khả năng hướng đích tốt, do đó khi sử dụng vật liệu này để phủ lên bề mặt liposom mang dược chất sẽ giúp tập trung dược chất tại tế bào đích và làm tăng hiệu quả gây độc tế bào. Bên cạnh đó, vật liệu có PEG giúp hệ liposom tuần hoàn lâu hơn trong máu, có FA giúp hướng đích và việc kết hợp gelatin giúp vật liệu thu được khi biến tính liposom có đặc tính nhạy pH. Với đặc tính này, việc phóng thích thuốc sẽ được kiểm soát một cách dễ dàng nhờ vào sự thay đổi pH và đặc tính này hết sức phù hợp cho việc ứng dụng vào sản xuất thuốc điều trị ung thư hướng đích.

Quy trình tổng hợp liposom được biến tính bề mặt bằng vật liệu Gel-PEG-FA thu được từ quy trình tổng hợp vật liệu Gel-PEG-FA dùng trong hệ tổng hợp nano hướng đích nêu trên bao gồm các bước cụ thể như sau:

- chuẩn bị hỗn hợp lecithin đậu nành, cholesterol và etyltrimetylamonium bromua (CTAB) theo tỷ lệ khối lượng như sau:

Lecithin đậu nành: 70% đến 90%,

Cholesterol: 5% đến 15%, và

CTAB là 0,1% đến 5%.

- hòa tan hỗn hợp lecithin đậu nành, cholesterol và CTAB trong clorofom, lượng clorofom được sử dụng đủ để hòa tan hoàn toàn hỗn hợp lecithin đậu nành, cholesterol và CTAB. Lượng clorofom được sử dụng trong quy trình không ảnh hưởng đến khối lượng sản phẩm thu được vì clorofom sẽ bay hơi hết trong quá trình cô quay phía sau, thông thường tỷ lệ lecithin đậu nành gấp từ 2 đến 4 lần clorofom;

- dược chất được hòa tan trong dung môi, tùy vào độ tan của dược chất trong dung môi mà chọn loại dung môi thích hợp để hòa tan dược chất. Tỷ lệ dược chất được sử dụng từ 10% đến 20% lecithin đậu nành. Lượng dung môi được sử dụng để hòa tan dược chất phụ thuộc vào độ tan của dược chất đó trong dung môi, lượng dung môi được sử dụng không ảnh hưởng đến khối lượng sản phẩm thu được vì dung môi sẽ bay hơi hết trong quá trình cô quay phía sau. Dược chất được sử dụng là dược chất cần gắn vào hệ liposom và được lựa chọn bất kỳ tùy theo nhu cầu;

- trộn hỗn hợp lecithin đậu nành, cholesterol và CTAB đã hòa tan trong clorofom và dược chất đã hòa tan trong dung môi thu được hỗn hợp phản ứng.

- tiến hành cô quay hỗn hợp thu được ở nhiệt độ 45°C, điều chỉnh áp suất chân không để dung môi bay hơi từ từ để tạo lớp màng lipit mỏng bám xung quanh thành bình;

- tiếp tục để yên trong chân không qua đêm để bay hơi hết dung môi;

- tiến hành hydrat hóa lớp màng lipit bằng nước cất ở nhiệt độ 60°C đến khi lớp màng lipit bong ra hết khỏi thành bình;

- siêu âm với tần số sóng siêu âm 37kHz trong khoảng thời gian từ 15 đến 30 phút kết hợp đồng hóa áp lực cao để thu được liposom;

- hòa tan vật liệu Gel-PEG-FA trong nước cất tạo dung dịch vật liệu Gel-PEG-FA có nồng độ 0,01-10% (khối lượng);

- tiến hành cho từ từ liposom vào dung dịch vật liệu Gel-PEG-FA trong điều kiện tránh ánh sáng với tỷ lệ liposom và dung dịch Gel-PEG-FA là 1:1;

- khuấy đều trong 24 giờ và thu chế phẩm liposom được biến tính bề mặt bằng vật liệu Gel-PEG-FA.

Liposom thu được từ quy trình này dạng bột, màu vàng và tan trong nước.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tổng hợp vật liệu Gel-PEG-FA

Chuẩn bị các hợp chất theo tỷ lệ khối lượng như sau:

polyetylen glycol (PEG): 15.000 phần

p-nitrophenyl chloroformat (NPC): 1000 phần

tetrahydrofuran (THF): 12 phần

ethylenediamin (EDA): 1000 phần

axit folic (FA): 1500 phần

dimethyl sulfoxit (DMSO): 100 phần

etylen diclorua (EDC): 50 phần

axit succinic: 100 phần

gelatin (Gel): 20 phần

PEG được sử dụng có khối lượng phân tử 6000 Da.

NPC, THF, EDA, FA, DMSO, EDC, axit succinic được sử dụng là các hợp chất tinh khiết (>96%). Gel được sử dụng là Gel loại A. Các hợp chất nêu trên đều đạt kết quả phân tích kiểm nghiệm của nhà sản xuất.

Hòa tan PEG với NPC vào dung dịch THF trong môi trường có nitơ, khuấy đều trong 12-24 giờ.

Nhỏ dung dịch thu được vào EDA trong môi trường có nitơ, khuấy đều trong 24 giờ tại nhiệt độ phòng.

Thực hiện đông khô trong máy đông khô -45°C, thu được NH₂-PEG-NH₂.

Hòa tan NH₂-PEG-NH₂ thu được trong nước cất để thu được dung dịch NH₂-PEG-NH₂ có nồng độ 1,1% (khối lượng).

Hòa tan FA trong dung môi DMSO thu được dung dịch FA hòa tan trong dung môi.

Hòa tan một nửa lượng EDC đã chuẩn bị với nước cất để thu được dung dịch có nồng độ 0,25% (khối lượng).

Phối trộn dung dịch FA hòa tan trong dung môi với dung dịch EDC, đồng thời khuấy đều trong môi trường có nitơ trong khoảng thời gian 1 giờ tại điều kiện pH axit, thu được dung dịch FA hoạt hóa.

Phối trộn dung dịch FA hoạt hóa vào dung dịch $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$, đồng thời khuấy đều trong 24 giờ trong điều kiện tránh ánh sáng. Tiếp đó thực hiện đông khô trong máy đông khô -45°C , thu sản phẩm FA-PEG- NH_2 ;

Hòa tan FA-PEG- NH_2 thu được với nước cất để thu được dung dịch có nồng độ 0,8% (khối lượng).

Bổ sung axit succinic vào dung dịch FA-PEG- NH_2 , khuấy đều trong 1 giờ và tiếp đó đông khô trong máy đông khô -45°C , thu được FA-PEG-COOH.

Hòa tan FA-PEG-COOH trong nước cất có pH axit để thu được dung dịch có nồng độ 0,4% (khối lượng), bổ sung lượng EDC còn lại, khuấy đều đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất, thu được dung dịch FA-PEG-COOH.

Hòa tan gelatin (Gel) với nước cất để thu được dung dịch có nồng độ 0,12% (khối lượng).

Hòa tan dung dịch FA-PEG-COOH với dung dịch gelatin, đồng thời khuấy đều cho đến khi tan hoàn toàn thu được dung dịch Gel-PEG-FA.

Thực hiện đông khô dung dịch Gel-PEG-FA thu được trong máy đông khô -45°C , thu được vật liệu Gel-PEG-FA.

Vật liệu Gel-PEG-FA thu được theo sáng chế không mùi, không vị, dạng sợi, màu vàng nhạt và tan trong nước.

- Kết quả phân tích phổ FT-IR của vật liệu Gel-PEG-FA:

Kết quả từ phổ hồng ngoại của các hợp chất được tổng hợp có thể kết luận một phần về kết quả của quá trình tổng hợp nên vật liệu gắn tác nhân hướng đích. Kết quả ở Hình 1 cho thấy phổ đặc trưng của quy trình gắn FA vào PEG được thể hiện tại vị trí 1485 cm^{-1} , 1605 cm^{-1} và 1693 cm^{-1} , tương ứng với vị trí của lần lượt các nhóm là vòng phenyl, nhóm N-H (N-H bend) và C=O trong amit. Khi được gắn vào PEG qua phản ứng hóa học ở

nhóm carboxylic α -COOH của FA, liên kết amit được tạo thành. Với 3 đỉnh đặc trưng trên, FA và PEG có thể được xác nhận là được gắn thành công bằng liên kết amit.

Kết quả phổ FT-IR của Gel-PEG-FA cho các khoảng đỉnh sóng đặc trưng có thể quan sát (các đỉnh khó thể hiện rõ và riêng biệt do các đỉnh sóng của gelatin bị trùng lặp với phổ của PEG) gồm các đỉnh ở khoảng $1240\text{-}670\text{ cm}^{-1}$, $1560\text{-}1335\text{ cm}^{-1}$ và thuộc khoảng $1656\text{-}1644\text{ cm}^{-1}$. Với các khoảng quan sát được này, $1240\text{-}670\text{ cm}^{-1}$ tương ứng với nhóm amit 1, khoảng $1560\text{-}1335\text{ cm}^{-1}$ ứng với nhóm amit 2 và $1656\text{-}1644\text{ cm}^{-1}$ thuộc nhóm amit 3. Với đặc trưng là tạo thành từ nhiều nhóm amino axit, gelatin qua phổ hồng ngoại có thể được nhận biết thông qua một vài liên kết amit đặc trưng. Nhóm amit 1 như được quy định ở trên có thể xem là nhóm đặc trưng nhất để nhận biết gelatin từ phổ hồng ngoại. Trong khi đó amit 2 là nhóm bắt nguồn từ dao động N-H kết hợp cùng với dao động C-N. Còn amit 3 đại diện cho dao động của nhóm C-N và N-H, hoặc dao động của nhóm CH_2 . Cả 3 nhóm amit 1, 2, 3 trên đều có thể đi kèm với đặc trưng của liên kết amit giữa PEG và gelatin trong phản ứng tổng hợp. Với khoảng đỉnh thu được ở $3500\text{-}2300\text{ cm}^{-1}$, các đỉnh này cho thấy dao động cộng hóa trị N-H thường đi kèm với liên kết hydrogen của nhóm OH tự do, một phần cho thấy các nhóm prolin cùng các liên kết amit trong cấu trúc.

Bảng 1. Kết quả phổ FT-IR của Gel, FA, PEG, PEG-NPC, PEG-NH₂, PEG-FA và Gel-PEG-FA

Vị trí	Nhóm chức	Số sóng (cm^{-1})						
		Gel	FA	PEG	PEG-NPC	PEG-NH ₂	PEG-FA	Gel-PEG-FA
a	-CH ₂	2900	2899	2917	2875	2885	2917	2885
b	-C-O-C	1122	1120	1016	1112	1112	1103	1109
c	-C=C- (benzen)	1692	1650		1653		1648	1606
d	-NH ₂	3501	3415			3629	3399	3544
e	-N-C=O (amit)	1650	1652	1654	1592	1644	1458	1675
f	-NHCOO- (carbamat)						1744	1788

Qua bảng thống kê dữ liệu phổ của các chất (Bảng 1), có sự lặp lại các tín hiệu dao động đặc trưng trên phân tử PEG ở vị trí a, b và cũng luôn xuất hiện các phân tử sau khi tổng hợp. Sự dịch chuyển tín hiệu dao động ở về vị trí e và f, cùng với sự xuất hiện của phổ đặc trưng của FA cho thấy sự hình thành liên kết carbamat từ phản ứng giữa FA và PEG cũng như gelatin.

- Kết quả phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$ của vật liệu Gel-PEG-FA:

Cấu trúc hóa học và thành phần của hệ polyme Gel-PEG-FA được xác định bằng cách sử dụng quang phổ $^1\text{H-NMR}$ (Hình 2). Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{S} = \text{O}$) của mPEG trong Gel-PEG-FA xuất hiện tín hiệu ở độ dịch chuyển hóa học $\delta_{\text{H}} = 3,00 - 3,80$ là tín hiệu proton của nhóm $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $\delta_{\text{H}} = 3,21$ ppm là tín hiệu proton của nhóm $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của FA trong Gel-PEG-FA xuất hiện tín hiệu ở độ dịch chuyển hóa học $\delta_{\text{H}} = 6,50 - 8,50$ là tín hiệu proton của nhóm para-aminobenzoic axit và $\delta_{\text{H}} = 8,3$ ppm là tín hiệu proton của nhóm pteridin. Sự xuất hiện của hai tín hiệu ở $\delta_{\text{H}} = 1,01$ ppm và $\delta_{\text{H}} = 3,35$ ppm là tín hiệu proton của nhóm metyl của amino axit và nhóm amin của lysin. Tín hiệu $\delta_{\text{H}} = 2,50$ ppm là tín hiệu proton của nhóm carbon anomeric của gelatin, và $\delta_{\text{H}} = 0,85 - 4,50$ ppm là tín hiệu proton của nhóm alkyl của gelatin.

Kết quả phân tích trên cho thấy vật liệu Gel-PEG-FA đã được tổng hợp thành công.

Ví dụ 2: Tổng hợp liposom được biến tính bề mặt bằng vật liệu Gel-PEG-FA

Chuẩn bị hỗn hợp lecithin đậu nành, cholesterol và etyltrimetylamonium bromua (CTAB) theo tỷ lệ khối lượng như sau:

Lecithin đậu nành: 82%,

Cholesterol: 8,2%, và

CTAB: 0,8%.

Hòa tan hỗn hợp lecithin đậu nành, cholesterol và CTAB trong clorofom, lượng clorofom được sử dụng đủ để hòa tan hoàn toàn hỗn hợp lecithin đậu nành, cholesterol và CTAB.

Dược chất được sử dụng là quercetin. Quercetin được hòa tan hoàn toàn trong dung môi metanol. Tỷ lệ dược chất được sử dụng là 10% lecithin đậu nành.

Trộn hỗn hợp lecithin đậu nành, cholesterol và CTAB đã hòa tan trong clorofom và quercetin đã hòa tan trong metanol thu được hỗn hợp phản ứng.

Tiến hành cô quay hỗn hợp thu được ở nhiệt độ 45°C, điều chỉnh áp suất chân không để dung môi bay hơi từ từ để tạo lớp màng lipid mỏng bám xung quanh thành bình. Tiếp tục để yên trong chân không qua đêm để bay hơi hết dung môi. Tiến hành hydrat hóa lớp màng lipid bằng nước cất ở nhiệt độ 60°C đến khi lớp màng lipid bong ra hết khỏi thành bình. Siêu âm với tần số sóng siêu âm 37kHz trong khoảng thời gian 25 phút kết hợp đồng hóa áp lực cao để thu được liposom.

Hòa tan vật liệu Gel-PEG-FA trong nước cất tạo dung dịch vật liệu Gel-PEG-FA 8,2%.

Tiến hành cho từ từ liposom vào dung dịch vật liệu Gel-PEG-FA trong điều kiện tránh ánh sáng với tỷ lệ liposom và dung dịch Gel-PEG-FA là 1:1, khuấy đều trong 24 giờ và thu chế phẩm liposom được biến tính bề mặt bằng vật liệu Gel-PEG-FA.

Đánh giá các đặc tính của liposom thu được:

- Kết quả phân tích phổ FT-IR của liposom được biến tính bề mặt bằng vật liệu Gel-PEG-FA:

Kết quả phân tích phổ FT-IR của liposom được biến tính bề mặt bằng vật liệu Gel-PEG-FA cho thấy các dao động xuất hiện ở 1500 cm⁻¹ đến 1000 cm⁻¹ và 3500 cm⁻¹ đến 3900 cm⁻¹ là dao động đặc trưng cho các nhóm phospholipit của lecithin (Hình 3). 2965 cm⁻¹ là dao động liên kết cộng hóa trị C-H của chuỗi axit béo trên lecithin, ở 2900 cm⁻¹ là các dao động liên kết cộng hóa trị C-H của nhóm -CH₂, ở 1760 cm⁻¹ là dao động liên kết cộng hóa trị C-H của nhóm -NHCOO- (liên kết amit và/ hoặc liên kết carbamat); ở 1415 cm⁻¹ là dao động liên kết cộng hóa trị C-O-C. Sự xuất hiện của khoảng dao động đặc trưng cho PEG (1100 cm⁻¹ đến 1300 cm⁻¹) trên phổ FT-IR cho thấy đã biến tính thành công vật liệu Gel-PEG-FA lên bề mặt liposom.

Bảng 2. Kết quả phổ FT-IR của Gel, FA, PEG, Gel-PEG-FA và liposom biến tính Gel-PEG-FA (Lip@Gel-PEG-FA)

Vị trí	Nhóm chức	Số sóng (cm ⁻¹)				
		Gel	FA	PEG	Gel-PEG-FA	Lip@Gel-PEG-FA
a	-NH ₂		3415		3629	3542
b	-CH ₂	2921	2899	2917	2898	2885
c	-C=C- (benzen)	1648	1650		1603	1607
d	-C=O					
e	-N-C=O (amit)	1650	1652	1654	1675	1697
f	-NHCOO- (carbamat)				1788	1697
g	-C-O-C		1120	1016	1244	1242
h	-C-C-	1016			1112	1109

Qua bảng thống kê dữ liệu phổ FT-IR (Bảng 2) của liposom biến tính Gel-PEG-FA cho thấy sự xuất hiện các dao động đặc trưng của liposom, gelatin, PEG và FA. Các dao động đặc trưng của gelatin được thấy ở vị trí b, c, e và h, trong khi các dao động đặc trưng của PEG được thể hiện qua các dao động tại vùng xung quanh g và h. FA được xác nhận sự xuất hiện thông qua tín hiệu tại a, c, f. Những tín hiệu lặp lại của liên kết carbamat thuộc vị trí f cho thấy liên kết của các polyme với nhau trong vật liệu. Kết quả phổ FTIR cho thấy đã biến tính thành công vật liệu Gel-PEG-FA lên liposom.

- Kết quả phân tích nhiệt trọng lượng (TGA) và phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) của liposom biến tính Gel-PEG-FA:

Phân tích TGA sử dụng sự thay đổi về khối lượng của mẫu khi nhiệt độ thay đổi theo thời gian. Phân tích phổ TGA cho biết thông tin về sự chuyển pha của mẫu và một số thông tin khác như sự thay đổi về tính chất vật lý/hóa học của mẫu khi nhiệt độ thay đổi. Kết hợp kết quả từ phân tích DSC và TGA sẽ giúp thể hiện vừa tổng quát vừa cụ thể sự biến đổi của vật liệu Gel-PEG-FA khi nhiệt độ thay đổi, từ đó giúp so sánh và phân tích thành phần của hệ liposom biến tính.

Liposom được biến tính bằng Gel-PEG-FA sẽ có tính chất nhiệt khác với liposom do sự thay đổi tính chất vật lý khi nhiệt độ thay đổi của vật liệu biến tính. Các polyme trên mẫu phân tích sẽ làm tăng lượng nhiệt cần thiết này dẫn đến sự khác biệt thể hiện ở

phổ, gelatin và PEG sẽ làm gia tăng lượng nhiệt cần thiết để tăng nhiệt độ chung của hệ (so với hệ liposom chưa biến tính).

Kết quả phân tích TGA cho thấy các đỉnh nhiệt đặc trưng của liposom, gelatin và sự dịch chuyển khi so sánh giữa 2 phổ DSC của liposom biến tính Gel-PEG-FA (Hình 4). Sự có mặt của PEG được xác nhận một phần do tương tác giữa các polyme làm cho các đỉnh nhiệt thay đổi vị trí. Cụ thể là các loại PEG ở nhiều phân tử khối khác nhau đều có cùng khoảng nhiệt để thay đổi là ở khoảng 60°C. Điều này có nghĩa là mẫu có PEG khi đạt được nhiệt độ phân tích ở khoảng này sẽ tạo ra đỉnh tín hiệu trên phổ dữ liệu. Hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA cho thấy có đỉnh chuyển nhiệt tại 64,88°C. Liposom biến tính Gel-PEG-FA có đỉnh chuyển nhiệt gần với mốc cơ bản của PEG (60°C) cho thấy sự có mặt của PEG trong hệ. Gelatin được ghi nhận là có đỉnh chuyển nhiệt tại khoảng gần dưới 100°C và mức 83,52°C của liposom biến tính Gel-PEG-FA cho thấy ảnh hưởng của khối lượng phân tử chất và thành phần khác của liposom (lipit, cholesterol, CTAB,...) tạo ra khoảng cách nhỏ đối với đỉnh chuyển nhiệt chuẩn.

- Kết quả độ tan của bột liposom đông khô trong nước:

Tính tan của bột đông khô liposom khi hòa tan lại trong nước là một trong những đặc tính hạn chế tính ứng dụng của các sản phẩm dạng bột có nguồn gốc từ liposom, điển hình là các dạng thuốc tiêm đông khô. Hầu hết các sản phẩm liposom truyền thống chưa được biến tính bề mặt hoặc được biến tính bề mặt bằng các vật liệu khác rất khó hòa tan lại trong nước khi ở dạng bột đông khô. Trong khi đó, vật liệu Gel-FA-PEG theo sáng chế đã khắc phục được hạn chế này. Sau những khoảng thời gian nhất định, tiến hành đánh giá độ ổn định của dung dịch pha lại bằng cách hòa tan 1 mg sản phẩm liposom đông khô với 10 ml nước cất ở nhiệt độ phòng (35-36°C). Kết quả cho thấy sản phẩm liposom được phủ Gel-PEG-FA theo sáng chế có thời gian hòa tan bột đông khô là ngắn nhất so với vật liệu liposom chưa biến tính, liposom biến tính bề mặt bằng vật liệu gelatin, chitosan, folic axit, polyetylen glycol.

Bảng 3. Ảnh hưởng của vật liệu biến tính đến thời gian hòa tan (giây) của bột liposom đông khô ở nhiệt độ phòng (35-36°C)

Vật liệu biến tính	Ban đầu	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng
-	-	-	-	-	-
Gelatin	-	-	-	-	-
Chitosan	-	-	-	-	-
Folic axit	-	-	-	-	-
Polyetylen glycol	300-360	400-460	-	-	-
Gel-PEG-FA	50-60	50-60	50-60	50-60	50-60

(-): không tan

- Liposom biến tính Gel-PEG-FA theo sáng chế thu được có hình cầu và có kích thước $271,5 \pm 1,8$ nm.

- Độ ổn định về kích thước của hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA được đánh giá thông qua sự thay đổi về kích thước được đo bằng máy DLS trong thời gian 9 tuần bảo quản trong nhiệt độ từ 12-14°C. Kết quả đánh giá độ ổn định cho thấy hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA không bị tụ và đóng lắng sau 9 tuần bảo quản. Hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA cho sự thay đổi về kích thước trong 9 tuần dao động ở một khoảng nhất định và không có sự khác biệt về mặt thống kê. Hệ liposom chưa biến tính có kích thước ở tuần đầu và cuối của thời gian khảo sát là $150,4 \pm 2,0$ nm và $147,4 \pm 4,5$ nm. Tương tự thì ở hệ liposome biến tính Gel-PEG-FA, các kích thước tương ứng đo được là $271,5 \pm 1,8$ nm và $286,7 \pm 3,6$ nm.

Bảng 4. Thế zeta của các hệ liposom theo sáng chế

	Liposom	Liposom mang quercetin	Liposom Gel-PEG-FA	Liposom Gel-PEG-FA mang quercetin
Thế zeta (mV)	$-68,3 \pm 1,8$	$-67,6 \pm 0,5$	$29,1 \pm 0,7$	$28,3 \pm 0,7$

- Hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA theo sáng chế mang thuốc quercetin thu được có dạng hình cầu và có kích thước là $270,7 \pm 1,2$ nm.

- Hệ liposom được biến đổi bề mặt bằng vật liệu hướng đích theo sáng chế cho hiệu suất mang thuốc quercetin là 96,1% và khả năng mang thuốc quercetin là 9,3%. Kết quả này cao hơn so với các nghiên cứu khác trên liposom.

- Kết quả đánh giá độ ổn định về kích thước của hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA trong điều kiện bảo quản ở nhiệt độ từ 12-14°C cho thấy hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA sau khi mang thuốc không có khác biệt nhiều so với hệ khi chưa mang. Đối với hệ biến tính Gel-PEG-FA, kích thước tăng từ $270,7 \pm 1,2$ nm đến $292,9 \pm 22,3$ nm. Sự gia tăng này tương tự với hệ chưa mang thuốc và có thể được giải thích bằng sự căng công kênh của vật liệu Gel-PEG-FA trên bề mặt liposom.

- Khả năng phóng thích quercetin của hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA (Hình 5):

Kết quả đánh giá khả năng phóng thích thuốc được thực hiện ở 2 môi trường pH là 7,4 (pH tự nhiên trong hệ tuần hoàn) và 5,5 (pH môi trường xung quanh khối u). Kết quả cho thấy hệ liposom và thuốc tự do đều được phóng thích chậm hơn trong môi trường pH thấp. Sự khác biệt này là do độ hòa tan quercetin trong nước (quercetin ít tan trong môi trường pH axit, $\text{pH} < 4,5$) dẫn đến cả thuốc tự do và hệ liposom mang thuốc đều phóng thích thuốc ít trong điều kiện pH 5,5.

Hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA cho xu hướng phóng thích thuốc từ hệ ở cả hai môi trường pH theo hai giai đoạn: giai đoạn đầu phóng thích nhanh, giai đoạn sau phóng thích chậm và ổn định. Ở môi trường pH 7,4, hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA ghi nhận được $61,6 \pm 3,7\%$ thuốc quercetin được phóng thích sau 2 giờ đầu tiên, và đạt $70,4 \pm 3,1\%$ sau 12 giờ. Và sau 96 giờ thì tổng lượng thuốc được phóng thích từ hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA mới là $69,9 \pm 2,1\%$. Trong khi đó, lượng thuốc tự do phóng thích gần như là toàn bộ sau 96 giờ. Kết quả trên cho thấy hệ liposom được biến tính bề mặt bằng polyme sinh học phóng thích thuốc chậm hơn so với thuốc tự do trong cùng khoảng thời gian khảo sát khi đánh giá ở môi trường pH 7,4 (mô phỏng môi trường cơ thể). Liposom được biến tính bằng vật liệu Gel-PEG-FA cho khả năng làm chậm lượng thuốc khó tan trong nước như quercetin được phóng thích, từ đó đề xuất khả năng kéo dài thời gian lưu thông và phóng thích có kiểm soát của thuốc được mang trong hệ liposom này. Đối với kết quả ở pH 5,5, hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA cho kết quả phóng thích thuốc ở mức dưới 50%. Môi trường pH 5,5 là môi trường mô phỏng môi trường pH xung quanh khối u, kết quả phóng thích thuốc cho thấy tại pH thấp liposom biến tính Gel-PEG-FA

phóng thích thuốc quercetin thấp hơn so với môi trường pH 7,4, từ đó cho thấy khả năng kéo dài thời gian lưu thông và phóng thích thuốc được mang trong hệ liposom này tại mô ung thư.

- Kết quả đánh giá độ ổn định trong huyết thanh của hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA cho thấy rằng độ hấp thu của hệ có sự thay đổi nhỏ trong 8 giờ đầu với độ truyền qua biến động trong khoảng 79 – 82%. Biên độ dao động trong độ truyền qua này vẫn ổn định và mở rộng lên đến 8% đến mốc 72 giờ (Hình 6). Hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA cho thấy việc thay đổi độ truyền qua với biên độ lớn hơn khi đạt 85% vào 24 giờ và xuống khoảng 78% từ 48 giờ trở đi. Trong khi đó, hệ liposom chưa biến tính cho thấy sự ít ổn định nhất và dẫn đến làm giảm độ truyền qua đến mức thấp nhất ở mốc 72 giờ. Kết quả này cho thấy liposom được biến tính bằng vật liệu Gel-PEG-FA làm tăng tính ổn định của hệ liposom trong huyết thanh so với liposom chưa biến tính. Việc so sánh thực nghiệm với các nghiên cứu khác cũng giúp củng cố thêm giả thuyết về việc gelatin và PEG có thể làm tăng độ ổn định của hệ liposom. Giol và nhóm nghiên cứu thực hiện biến tính bề mặt vật liệu bằng gelatin, và cho thấy độ ổn định của chất mang protein bên trong lên đến 24 ngày, so với vật liệu cơ bản ổn định trong khoảng 72 giờ. Nghiên cứu khác của Battogtokh và cộng sự cũng cho thấy sự ổn định của nhóm vật liệu cụ thể là liposom, khi được biến tính với PEG và gelatin, cho kết quả hệ ổn định trong các điều kiện bảo quản 4°C và 25°C lên đến 8 tuần.

- Kết quả đánh giá độ độc tế bào của hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA theo sáng chế cho thấy hệ liposom không gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư vú ở bất kỳ nồng độ nào được thử nghiệm sau 48 giờ ủ (Hình 7). Kết quả này cho thấy rằng vật liệu Gel-PEG-FA được tổng hợp theo sáng chế là vật liệu tương thích sinh học và có tiềm năng ứng dụng trong y sinh, cụ thể là trong các liệu pháp điều trị hướng đích. Trong khi đó, tỷ lệ sống của tế bào sau khi ủ với thuốc quercetin và biến tính Gel-PEG-FA mang thuốc quercetin trong 48 giờ dẫn đến sự ức chế tăng trưởng tế bào theo cách phụ thuộc vào nồng độ thuốc. Kết quả cho thấy hệ liposom được biến đổi bề mặt mang thuốc giúp tăng hiệu quả gây độc của thuốc quercetin ở nồng độ 200 µg/ml sau 48 giờ ủ. Hiện tượng

được giải thích bằng tác dụng của lớp vật liệu biến tính trên bề mặt liposom giúp phóng thích thuốc có kiểm soát và tăng cường thuốc tại tế bào ung thư. Kết đánh giá độc tính tế bào trên dòng tế bào ung thư vú cho thấy tiềm năng của hệ liposom hướng đích theo sáng chế trong phân phối thuốc, cụ thể là trong điều trị ung thư bằng liệu pháp hướng đích.

- Kết quả đánh giá sự hấp thu tế bào (cellular uptake) và khả năng hướng đích của hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA (Hình 8):

Kính hiển vi đồng tiêu (Confocal microscopy) hay phương pháp tế bào dòng chảy (flow cytometry) được sử dụng phổ biến để nghiên cứu cellular uptake của các hệ nano mang thuốc. Trong nghiên cứu này, hệ liposom được đánh dấu huỳnh quang bằng thuốc nhuộm DiO ($\text{DiOC}_{18}(3)$) và confocal microscopy được sử dụng phổ biến để đánh giá cellular uptake của các hệ liposom mang thuốc quercetin trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7. Phương pháp dùng kính hiển vi đồng tiêu (confocal microscopy) là phương pháp đơn giản và dễ thực hiện, phương pháp này giúp xác định vị trí của hạt nano trong tế bào.

Kết quả đánh giá sự hấp thu tế bào (cellular uptake) cho thấy liposom khi được biến tính bề mặt bằng Gel-PEG-FA giúp cải thiện sự hấp thu tế bào so với liposom được biến tính bằng các vật liệu khác. Hình ảnh được chụp bằng kính hiển vi đồng tiêu đã cho thấy được vị trí của liposom trong tế bào MCF-7. Trong đó, liposom Gel-PEG-FA được quan sát là hấp thu tế bào tốt hơn so với liposom được biến tính bằng các vật liệu khác. Kết quả này cho thấy vai trò của vật liệu Gel-PEG-FA của sáng chế. Theo đó vật liệu bào ung thư hướng đích theo sáng chế giúp tập trung thuốc tại tế bào đích và làm tăng hiệu quả gây độc tế bào ung thư của thuốc, từ đó cho thấy tiềm năng trong việc tăng hiệu quả điều trị trên lâm sàng.

Sáng chế đã đánh giá được hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư của hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA so với hệ liposom chưa biến tính ở thử nghiệm trên tế bào ung thư, thử nghiệm apoptosis và trên mô hình nuôi cấy khối cầu. Kết quả cho thấy hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA có tác dụng tăng cường rõ rệt khả năng gây độc tế bào ung thư trên dòng tế bào ung thư vú so với các hệ liposom chưa biến tính. So sánh với hệ

liposom chưa biến tính, hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA theo sáng chế có xu hướng gây chết tế bào nhiều hơn ở cùng một nồng độ đánh giá. Số lượng tế bào chết theo chu trình apoptosis cũng tăng hơn so với hệ liposom chưa biến tính. Từ các kết quả của sáng chế cho thấy hệ liposom biến tính Gel-PEG-FA có nhiều tiềm năng ứng dụng trong điều trị ung thư đặc biệt là trong điều trị hướng đích.

Mặc dù, sáng chế được mô tả tham chiếu đến các phương án cụ thể, nhưng cần hiểu rằng, nhiều thay đổi, cải tiến và phương án có thể được thực hiện và do đó, tất cả các thay đổi, cải biến và phương án đó đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Vật liệu Gel-PEG-FA được tổng hợp theo sáng chế là những polyme tương thích sinh học cao và khả năng hướng đích tốt, do đó khi sử dụng vật liệu này để phủ lên bề mặt liposom mang dược chất sẽ giúp tập trung dược chất tại tế bào đích và làm tăng hiệu quả gây độc tế bào. Bên cạnh đó, vật liệu có PEG giúp hệ liposom tuần hoàn lâu hơn trong máu và có FA giúp hướng đích tế bào tốt hơn. Vật liệu kết hợp Gel-PEG-FA khi được biến tính lên bề mặt liposom giúp hệ liposom sau đông khô dễ hoà tan trong nước hơn so với biến tính bằng các vật liệu khác. Ngoài ra, liposom được biến tính bề mặt bằng vật liệu Gel-PEG-FA này có khả năng hoạt động được ở cả độ pH thấp. Chế phẩm liposom hướng đích thu được từ quy trình theo sáng chế có thể sản xuất rộng rãi với số lượng lớn, dễ dàng vì lecithin đậu nành là nguồn nguyên liệu tương đối dễ kiếm và có giá thành rẻ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tổng hợp vật liệu gelatin-polyetylen glycol-axit folic (Gel-PEG-FA) dùng trong hệ tổng hợp nano hướng đích bao gồm các bước:

(i) Chuẩn bị nguyên liệu:

Chuẩn bị các hợp chất theo tỷ lệ khối lượng như sau:

polyetylen glycol (PEG): 10.000-20.000 phần

p-nitrophenyl chloroformat (NPC): 1-2.000 phần

tetrahydrofuran (THF): 1-20 phần

ethylenediamin (EDA): 1-2.000 phần

axit folic (FA): 1-2.000 phần

dimethyl sulfoxit (DMSO): 1-2.000 phần

etylen diclorua (EDC): 1-200 phần

axit succinic: 1-1.000 phần

gelatin (Gel): 1-100 phần

trong đó, PEG có khối lượng phân tử từ 4000 Da trở lên, NPC, THF, EDA, FA, DMSO, EDC, axit succinic là các hợp chất tinh khiết (>96%), Gel là gelatin loại A hoặc B, tỷ lệ PEG gấp ít nhất 10 lần NPC và tỷ lệ PEG gấp ít nhất 10 lần EDA;

(ii) Điều chế $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$:

Hòa tan PEG với NPC vào dung dịch THF trong môi trường có nitor, khuấy đều trong 12-24 giờ;

Nhỏ dung dịch thu được vào EDA trong môi trường có nitor, khuấy đều trong 24 giờ tại nhiệt độ phòng;

Thực hiện đông khô trong máy đông khô -45°C , thu được $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$;

(iii) Điều chế FA-PEG- NH_2 :

Hòa tan $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ thu được từ bước (ii) trong nước cất để thu được dung dịch $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ có nồng độ 0,01-20% (khối lượng);

Hòa tan FA trong dung môi DMSO thu được dung dịch FA hòa tan trong dung môi;

Hòa tan một nửa lượng EDC đã chuẩn bị với nước cất để thu được dung dịch có nồng độ 0,01-10% (khối lượng);

Phối trộn dung dịch FA hòa tan trong dung môi với dung dịch EDC, đồng thời khuấy đều trong môi trường có nitơ trong khoảng thời gian từ 1 đến 2 giờ tại điều kiện pH axit, thu được dung dịch FA hoạt hóa;

Phối trộn dung dịch FA hoạt hóa vào dung dịch $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$, đồng thời khuấy đều trong 24 giờ trong điều kiện tránh ánh sáng;

Thực hiện đông khô trong máy đông khô -45°C , thu sản phẩm FA-PEG- NH_2 ;

(iv) Điều chế FA-PEG-COOH:

Hòa tan FA-PEG- NH_2 thu được từ bước (iii) với nước cất để thu được dung dịch có nồng độ 0,01-10% (khối lượng);

Bổ sung axit succinic vào dung dịch FA-PEG- NH_2 , khuấy đều trong 1 giờ và tiếp đó đông khô trong máy đông khô -45°C , thu được FA-PEG-COOH;

(v) Tổng hợp Gel-PEG-FA:

Hòa tan FA-PEG-COOH trong nước cất có pH axit để thu được dung dịch có nồng độ 0,01-10% (khối lượng), bổ sung lượng EDC còn lại, khuấy đều đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất, thu được dung dịch FA-PEG-COOH;

Hòa tan gelatin (Gel) với nước cất để thu được dung dịch có nồng độ 0,01-10% (khối lượng);

Hòa tan dung dịch FA-PEG-COOH với dung dịch gelatin, đồng thời khuấy đều cho đến khi tan hoàn toàn thu được dung dịch Gel-PEG-FA; và

(vi) Đông khô thu vật liệu Gel-PEG-FA:

Thực hiện đông khô dung dịch Gel-PEG-FA thu được từ bước (v) trong máy đông khô -45°C , thu được vật liệu Gel-PEG-FA.

2. Vật liệu gelatin-polyetylen glycol-axit folic (Gel-PEG-FA) dùng trong hệ tổng hợp nano hướng đích thu được từ quy trình theo điểm 1.

3. Quy trình tổng hợp liposom được biến tính bề mặt bằng vật liệu gelatin-polyetylen glycol-axit folic (Gel-PEG-FA) thu được từ quy trình theo điểm 1 bao gồm các bước:

- chuẩn bị hỗn hợp lecithin đậu nành, cholesterol và etyltrimetylamonium bromua (CTAB) theo tỷ lệ khối lượng như sau:

Lecithin đậu nành: 70% đến 90%,

Cholesterol: 5% đến 15%, và

CTAB là 0,1% đến 5%;

- hòa tan hỗn hợp lecithin đậu nành, cholesterol và CTAB trong clorofom, lượng clorofom được sử dụng đủ để hòa tan hoàn toàn hỗn hợp lecithin đậu nành, cholesterol và CTAB;

- dược chất được hòa tan trong dung môi, tùy vào độ tan của dược chất trong dung môi mà chọn loại dung môi thích hợp để hòa tan dược chất và lượng dung môi được sử dụng để hòa tan dược chất phụ thuộc vào độ tan của dược chất đó trong dung môi, trong đó tỷ lệ dược chất được sử dụng từ 10% đến 20% lecithin đậu nành và dược chất được sử dụng là dược chất cần gắn vào hệ liposom và được lựa chọn bất kỳ tùy theo nhu cầu;

- trộn hỗn hợp lecithin đậu nành, cholesterol và CTAB đã hòa tan trong clorofom và dược chất đã hòa tan trong dung môi thu được hỗn hợp phản ứng;

- tiến hành cô quay hỗn hợp thu được ở nhiệt độ 45°C, điều chỉnh áp suất chân không để dung môi bay hơi từ từ để tạo lớp màng lipit mỏng bám xung quanh thành bình;

- tiếp tục để yên trong chân không qua đêm để bay hơi hết dung môi;

- tiến hành hydrat hóa lớp màng lipit bằng nước cất ở nhiệt độ 60°C đến khi lớp màng lipit bong ra hết khỏi thành bình;

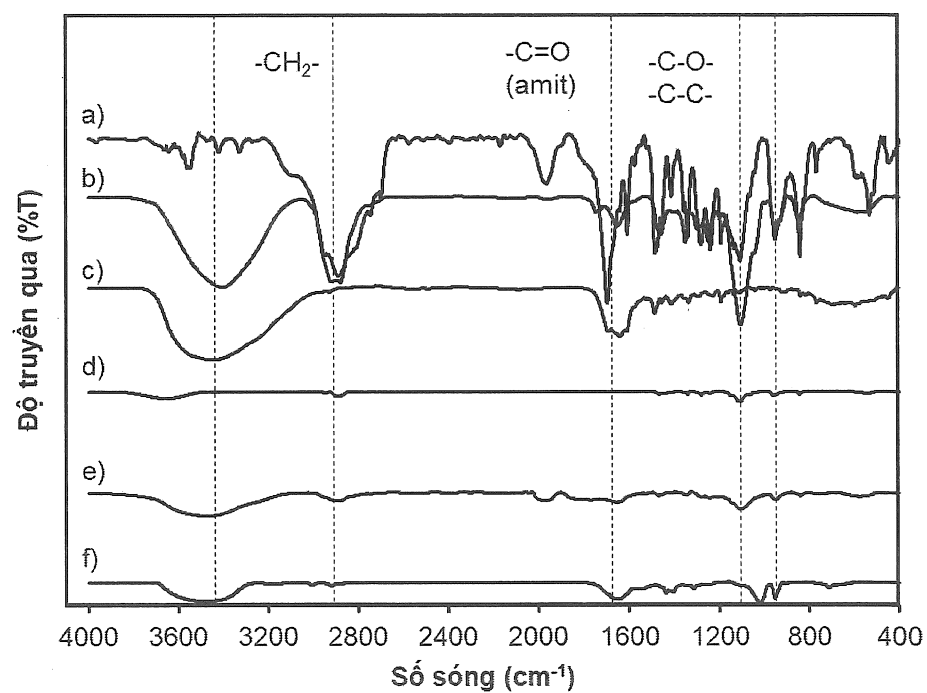
- siêu âm với tần số sóng siêu âm 37kHz trong khoảng thời gian từ 15 đến 30 phút kết hợp đồng hóa áp lực cao để thu được liposom;

- hòa tan vật liệu Gel-PEG-FA trong nước cất tạo dung dịch vật liệu Gel-PEG-FA, lượng nước cất được sử dụng đủ để hòa tan vật liệu Gel-PEG-FA;

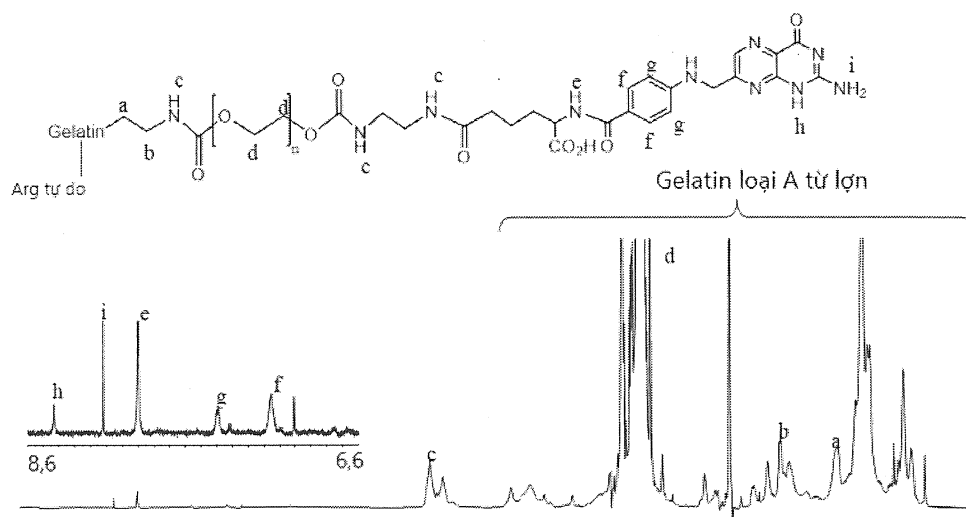
- tiến hành cho từ từ liposom vào dung dịch vật liệu Gel-PEG-FA trong điều kiện tránh ánh sáng với tỷ lệ liposom và dung dịch Gel-PEG-FA là 1:1;

- khuấy đều trong 24 giờ và thu chế phẩm liposom được biến tính bề mặt bằng vật liệu Gel-PEG-FA.

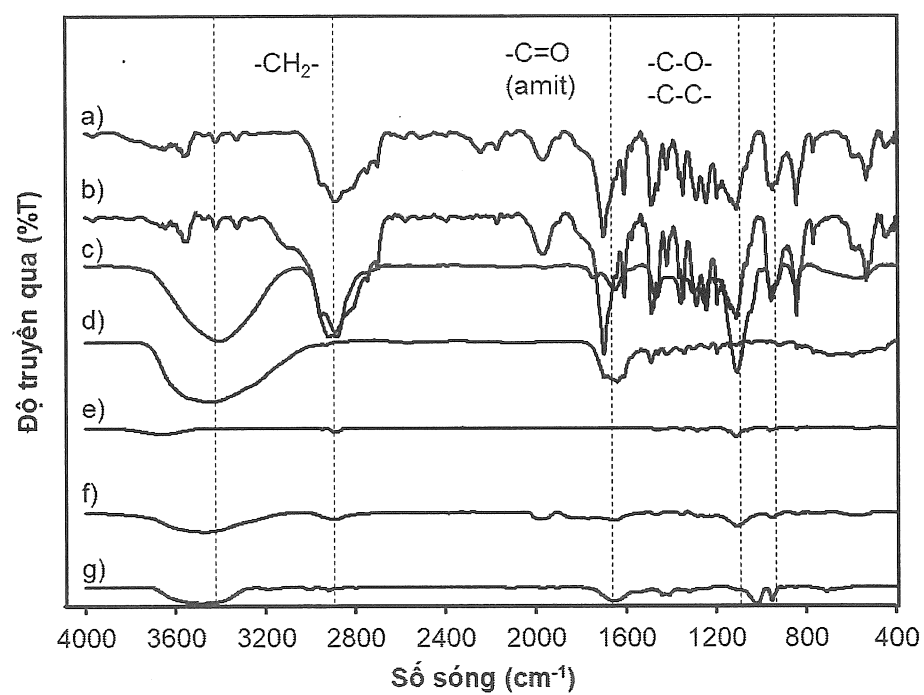
Hình 1



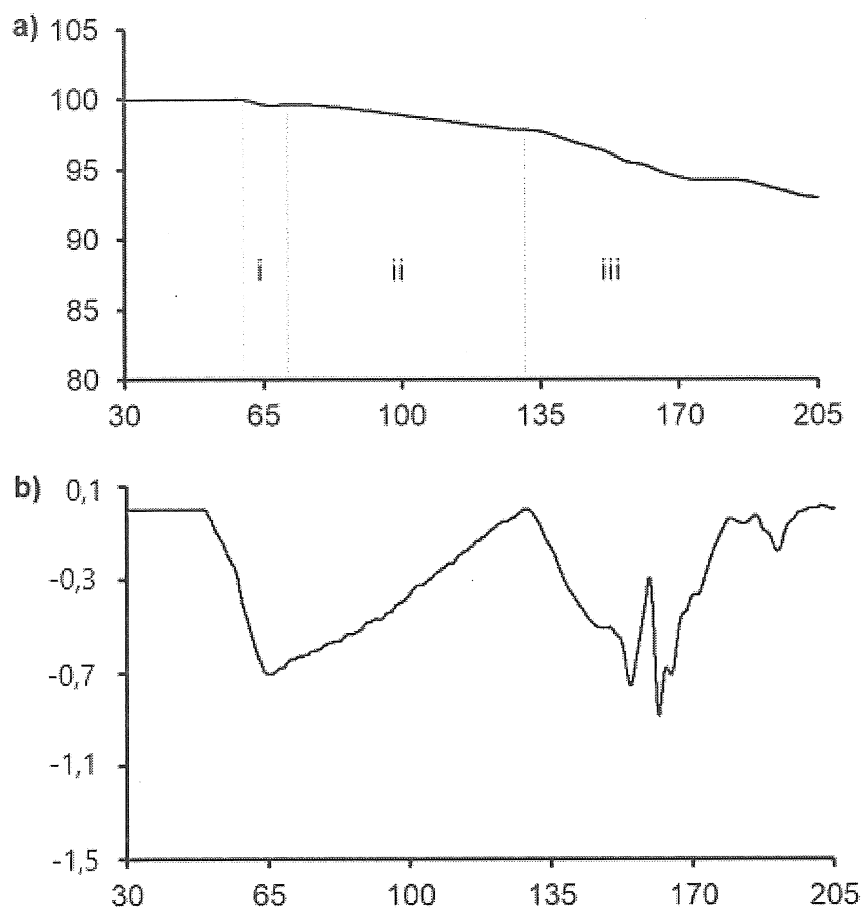
Hình 2



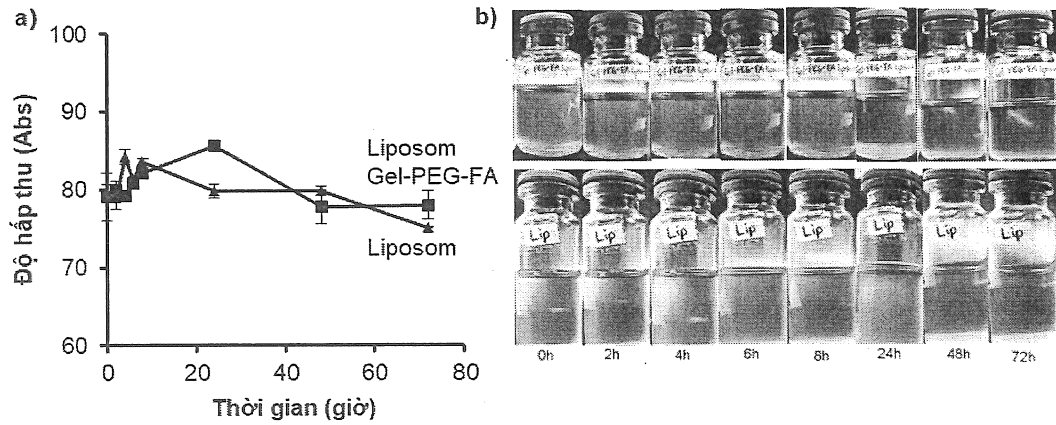
Hình 3



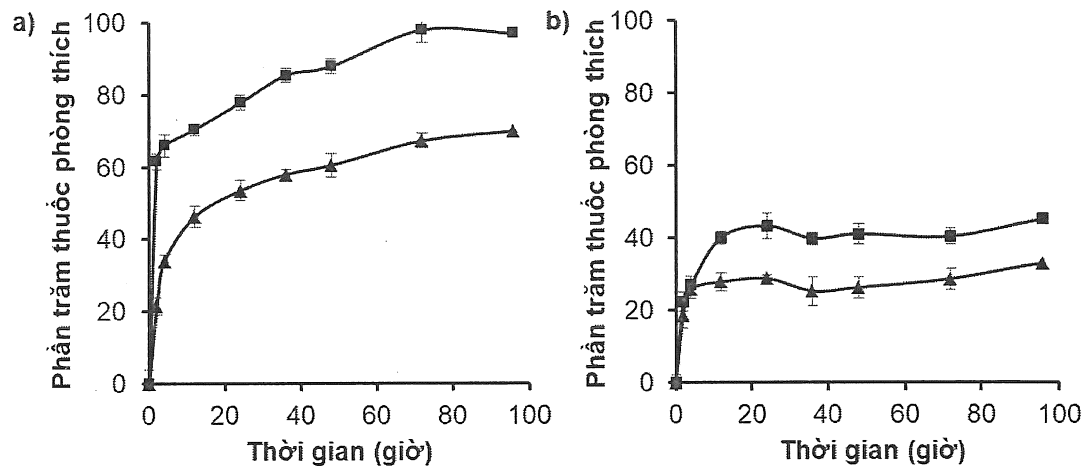
Hình 4



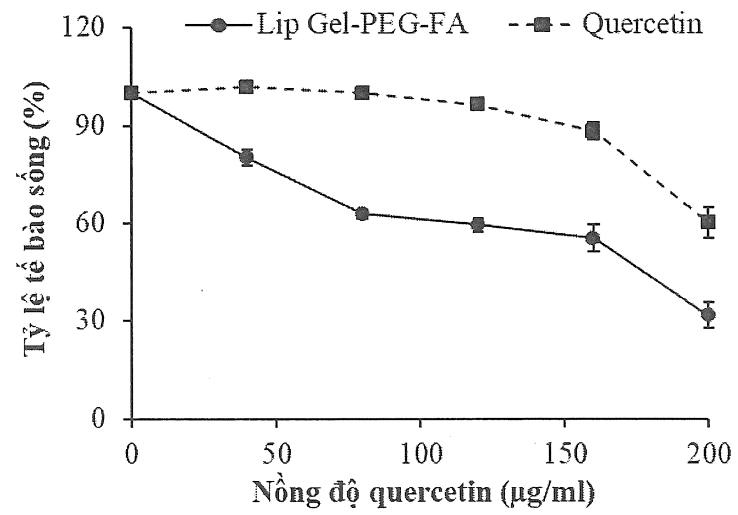
Hình 5



Hình 6



Hình 7



Hình 8

