



(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)



1-0052077

(51)^{2021.01} A61K 9/107; A61K 39/39; A61K 47/69; (13) B
A61P 37/06; A61P 29/00; A61P 37/02;
A61K 39/00; A61K 49/18

(21) 1-2022-05886

(22) 16/02/2021

(86) PCT/EP2021/053711 16/02/2021

(87) WO2021/165227 26/08/2021

(30) 20157797.0 17/02/2020 EP

(45) 25/09/2025 450

(43) 26/12/2022 417A

(73) TOPAS THERAPEUTICS GMBH (DE)

Falkenried 88, 20251 Hamburg, Germany

(72) DIGIGOW, Reinaldo (DE); MUNGALPARA, Disha (DE); POHLNER, Johannes (DE); SELECI, Muharrem (TR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) HẠT NANO CHỨA POLYME LƯỠNG TÍNH, DƯỢC PHẨM CHỨA HẠT NANO NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT HẠT NANO

(21) 1-2022-05886

(57) Sáng chế đề cập đến hạt nano chứa a) mixen chứa polyme lưỡng tính có khối lượng phân tử trung bình số (M_n) nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol, và b) ít nhất một peptit chứa ít nhất một epitop tế bào T. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa hạt nano này và phương pháp sản xuất hạt nano này.

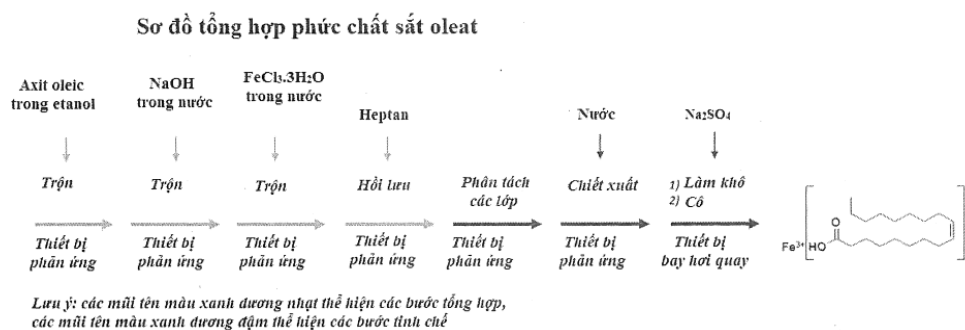


Fig.1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hạt nano để sử dụng trong phòng ngừa và điều trị bệnh tự miễn, tình trạng dị ứng hoặc các tình trạng viêm mãn tính khác, và sản sinh tế bào T điều hòa. Cụ thể, sáng chế đề cập đến hạt nano chứa mixen chứa polyme lưỡng tính có khối lượng phân tử trung bình số (M_n) nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol, tạo ra hạt nano hòa tan trong nước, và ít nhất một peptit chứa ít nhất một epitop tế bào T. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa hạt nano. Dược phẩm này có thể được sử dụng để sản sinh tế bào T điều hòa đặc hiệu ít nhất một epitop tế bào T ở đối tượng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh trong đó quá trình ức chế đáp ứng miễn dịch đặc hiệu là có lợi. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất hạt nano này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh tự miễn tạo ra gánh nặng đáng kể đối với đối tượng bị bệnh và các hệ thống chăm sóc sức khỏe. Các liệu pháp hiện nay chủ yếu dựa vào dược chất ức chế miễn dịch có các tác dụng không mong muốn đáng kể. Liệu pháp miễn dịch đặc hiệu tự kháng nguyên chủ yếu hướng đích tác nhân gây bệnh miễn dịch đặc hiệu bệnh dẫn đến tình trạng miễn dịch chung chưa được hoạt hóa thể hiện nhu cầu y tế chưa được đáp ứng.

Khả năng chống chịu tự kháng nguyên được duy trì bởi nhiều cơ chế kiểm soát tế bào lympho tự phản ứng có khả năng gây bệnh, bao gồm cơ chế loại bỏ, suy giảm hoặc ức chế dòng bởi tế bào T điều hòa. Do đó, bệnh tự miễn có thể do kiểm soát không đầy đủ tế bào lympho tự phản ứng, và mục đích chính của liệu pháp miễn dịch để điều trị bệnh tự miễn là cảm ứng khả năng chống chịu tự kháng nguyên bằng cách khôi phục quá trình điều hòa. Cách thức đặc biệt tiềm năng để khôi phục khả năng tự chống chịu có thể là cách thức tăng sinh tế bào T điều hòa $CD4+CD25+FOXP3+$ đặc hiệu tự kháng nguyên. Quá trình vận chuyển sinh dưỡng của tế bào này có thể phòng ngừa tình trạng tự miễn hoặc tình trạng viêm.

Gan đóng vai trò trung tâm trong quá trình ức chế đáp ứng miễn dịch không mong muốn chống lại kháng nguyên lây truyền qua đường máu, ví dụ kháng nguyên thực phẩm, thâm nhập vào hệ tuần hoàn. Cơ chế cơ bản này của gan có thể được sử dụng để

điều hòa giảm đặc hiệu đáp ứng miễn dịch bất lợi chống lại kháng nguyên hoặc tự kháng nguyên protein bên ngoài. Peptit kháng nguyên có nguồn gốc từ protein như vậy, khi được ghép cặp với chất mang có kích cỡ nano và sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch, kháng nguyên thực phẩm bất chức hoạt hóa hấp thu bởi tế bào gan đặc hiệu, tế bào tạo thành các xoang gan, sau đó bởi đáp ứng miễn dịch có khả năng chống chịu. Do đó, khả năng chống chịu đặc hiệu peptit có thể được cảm ứng đối với kháng nguyên gây bệnh miễn dịch xác định, dẫn đến cải thiện hoặc thậm chí loại bỏ phản ứng miễn dịch bất lợi. Do đó, cách tiếp cận này có thể được sử dụng để điều trị bệnh đang diễn ra và cũng có thể được sử dụng để phòng ngừa bệnh tương ứng trong chiến lược phòng ngừa.

Ví dụ, quá trình biểu hiện lệch vị trí của kháng nguyên thần kinh trong gan có thể phòng ngừa bệnh viêm thần kinh tự miễn ở các chuột nhất bị bệnh viêm não tủy tự miễn thử nghiệm (EAE), tức là mô hình động vật bị bệnh xơ cứng rải rác (MS). Phát hiện này có thể được giải thích bởi khả năng của gan để sản sinh tế bào T điều hòa đặc hiệu kháng nguyên thần kinh có khả năng kiểm soát tối ưu và ức chế đáp ứng miễn dịch tự miễn. Tế bào tạo thành các xoang gan đóng vai trò quan trọng để đạt được tác dụng này. Tế bào tạo thành các xoang gan biểu hiện phân tử MHC/HLA nhóm I và nhóm II trên bề mặt của nó, do đó có thể có khả năng trình diện peptit tương ứng với cả tế bào biểu hiện CD8 (thông qua quá trình trình diện chéo) và tế bào T biểu hiện CD4. Quá trình trình diện peptit kháng nguyên bởi tế bào tạo thành các xoang gan biến đổi tế bào T tác động và nguyên thể thành tế bào T điều hòa theo cơ chế đặc hiệu kháng nguyên *in vitro*. Đây rõ ràng là cơ chế sinh lý nhờ đó tế bào tạo thành các xoang gan có thể tạo ra khả năng chống chịu chống lại kháng nguyên lây truyền qua đường máu.

Hạt nano được tiếp hợp với peptit kháng nguyên đặc hiệu bệnh vào bề mặt hạt, như kháng nguyên lây truyền qua đường máu, hướng đích gan sau khi tiêm tĩnh mạch. Khi được hấp thu bởi tế bào tạo thành các xoang gan, có thể bởi quá trình ẩm bào, hạt nano tích tụ trong khoang endosom ở đó peptit kháng nguyên được giải phóng ra khỏi bề mặt của hạt. Điều này dẫn đến peptit kháng nguyên này được trình diện ở bề mặt của tế bào tạo thành các xoang gan, được điều hòa bởi phân tử MHC/HLA. Có bằng chứng cho thấy quá trình sản sinh tiếp theo của tế bào T điều hòa tạo ra khả năng chống chịu miễn dịch đặc hiệu tự kháng nguyên tương ứng trên cơ sở epitop peptit kháng nguyên của nó.

WO 2009/067349 đề cập đến được phẩm chứa hạt nano tương thích sinh học được liên kết với phối tử yếu tố phiên mã thụ thể aryl hydrocarbon để sử dụng trong điều trị rối loạn tự miễn bằng cách làm tăng số lượng và/hoặc hoạt tính của tế bào T điều hòa.

WO 2013/072051 đề cập đến được phẩm để sử dụng trong sản sinh tế bào T điều hòa đặc hiệu ít nhất một epitop tế bào T ở đối tượng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh trong đó quá trình ức chế đáp ứng miễn dịch đặc hiệu là có lợi. Hạt nano chứa mixen chứa polyme lưỡng tính tạo ra hạt nano hòa tan trong nước, và peptit chứa ít nhất một epitop tế bào T được liên kết với phía bên ngoài của mixen. Tài liệu này gợi ý sử dụng poly(maleic anhydrit-*alt*-1-octadecen) có bán trên thị trường làm polyme lưỡng tính có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 30000 đến 50000g/mol và độ tinh khiết khoảng 90%.

Tuy nhiên, trong các ứng dụng y tế nhất định, quan trọng là hạt nano có thể được sản xuất với độ tinh khiết rất cao bằng cách sử dụng các phương pháp tinh chế hiệu quả.

Vẫn cần có hạt nano được cải tiến để điều trị và phòng ngừa bệnh trong đó quá trình ức chế đáp ứng miễn dịch đặc hiệu là có lợi, ví dụ trong bệnh tự miễn, tình trạng dị ứng, cấy ghép, ức chế kháng thể kháng được chất (ADA) chống lại được chất điều trị bệnh hoặc vector gen, hoặc bệnh trong đó đáp ứng viêm là quá mức, mãn tính hoặc bất lợi, và trong đó được phẩm này thích hợp để sử dụng trên đối tượng là người.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để giải quyết các vấn đề nêu trên, sáng chế đề cập đến hạt nano chứa a) mixen chứa polyme lưỡng tính có khối lượng phân tử trung bình số (M_n) nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol, và b) ít nhất một peptit chứa ít nhất một epitop tế bào T.

Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện thấy rằng hạt nano chứa polyme lưỡng tính có khối lượng phân tử trung bình số (M_n) nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol có thể được sản xuất dễ dàng đến độ tinh khiết cao hơn.

Không bị giới hạn bởi lý thuyết bất kỳ về tác dụng của hạt nano theo sáng chế, được hiểu rằng khi hạt nano được hấp thu bởi bởi tế bào tạo thành các xoang gan, ít nhất một peptit được liên kết với phía bên ngoài của mixen được giải phóng, bởi hoạt tính thủy phân, phân giải protein hoặc các hoạt tính khác trong endosom, xử lý như thể peptit này là kháng nguyên lây truyền qua đường máu, và trình diện với tế bào T trong môi

trường dung nạp. Polyme lưỡng tính khối lượng phân tử thấp cho phép bài tiết các phân tử polyme riêng lẻ khi giải phóng *in vivo*. Điều này cung cấp cho quá trình bài tiết của gan mật, dường như là quá trình bài tiết ưu tiên cho hạt nano.

Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện thấy rằng polyme lưỡng tính khối lượng phân tử thấp có khối lượng phân tử trung bình số (M_n) nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol có thể được bài tiết dễ dàng. Cũng được mong đợi rằng polyme lưỡng tính khối lượng phân tử thấp và các chất chuyển hóa của nó được thải trừ nhanh ra khỏi cơ thể sau khi điều trị.

Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện thấy rằng polyme lưỡng tính khối lượng phân tử thấp có các đặc tính có lợi trong sản xuất hạt nano theo sáng chế. Polyme lưỡng tính khối lượng phân tử thấp sản sinh ít chất kết tụ hơn trong quá trình bao lõi dạng rắn so với polyme lưỡng tính khối lượng phân tử cao. Ngoài ra, polyme lưỡng tính khối lượng phân tử thấp có thể được tinh chế hiệu quả hơn so với polyme lưỡng tính khối lượng phân tử cao. Cụ thể, polyme chưa liên kết có thể được phân tách hiệu quả hơn khi polyme lưỡng tính khối lượng phân tử thấp được sử dụng trong hạt nano theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm chứa hạt nano.

Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm chứa hạt nano để sử dụng trong sản sinh tế bào T điều hòa đặc hiệu ít nhất một epitop tế bào T ở đối tượng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh trong đó quá trình ức chế đáp ứng miễn dịch đặc hiệu là có lợi.

Cuối cùng, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất hạt nano, bao gồm các bước sau: i) điều chế polyme lưỡng tính có khối lượng phân tử trung bình số (M_n) nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol, ii) tùy ý tinh chế polyme lưỡng tính, iii) điều chế mixen chứa polyme lưỡng tính, iv) bổ sung ít nhất một peptit để thu được hạt nano.

Mô tả văn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ thể hiện sơ đồ tổng hợp phức chất sắt oleat.

Fig.2 là hình vẽ thể hiện sơ đồ tổng hợp hạt nano sắt oxit siêu thuận từ (SPION).

Fig.3 là hình vẽ thể hiện sơ đồ tổng hợp poly(maleic anhydrit-alt-1-octadecen) khối lượng phân tử thấp (LM-PMAOD).

Fig.4 là hình vẽ thể hiện sơ đồ tổng hợp poly(axit maleic-alt-1-octadecen) khối lượng phân tử thấp (LM-PMaOD).

Fig.5 là hình vẽ thể hiện sơ đồ bao SPION bằng polyme.

Fig.6 là hình vẽ thể hiện sơ đồ ghép cặp peptit với hạt nano theo sáng chế.

Fig.7 là hình vẽ thể hiện ảnh chụp kính hiển vi điện tử truyền qua của hạt nano theo sáng chế (độ phóng đại 100 lần).

Fig.8 là hình vẽ thể hiện phân bố khối lượng phân tử của LM-PMaOD như được xác định bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký thẩm gel và chuẩn hiệu chỉnh là polystyren.

Fig.9-Fig.11 là hình vẽ thể hiện sắc ký đồ SEC tinh chế của các mẫu HM-PMaOD-SPION.

Fig.12 là hình vẽ thể hiện kết quả phân tích sắc ký loại cỡ tinh chế các mẫu LM-PMaOD-SPION.

Fig.13 là hình vẽ thể hiện sắc ký đồ SEC của các sản phẩm sau khi bao.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến hạt nano chứa mixen chứa polyme lưỡng tính có khối lượng phân tử trung bình số (M_n) nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol tạo ra hạt nano hòa tan trong nước, và ít nhất một peptit chứa ít nhất một epitop tế bào T. Hạt nano có thể cũng chứa lõi kỵ nước dạng rắn được bao bởi mixen.

Thuật ngữ “hạt nano” và “hạt có kích cỡ nano” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả. Các hạt như vậy có đường kính nằm trong khoảng từ 1nm đến 999nm, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 2nm đến 600nm, nằm trong khoảng từ 5nm đến 500nm, nằm trong khoảng từ 10nm đến 300nm, nằm trong khoảng từ 30nm đến 100nm hoặc nằm trong khoảng từ 40nm đến 50nm.

Theo sáng chế, hạt nano là cấu trúc được tạo ra bởi ít nhất một mixen và peptit được liên kết với mixen này. Peptit này có thể được liên kết với phía bên ngoài của mixen hoặc được bao nang bên trong mixen.

Theo một phương án của sáng chế, hạt nano theo sáng chế chứa lõi kỵ nước dạng rắn, mixen bao lõi này chứa polyme lưỡng tính có khối lượng phân tử trung bình số (M_n)

nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol tạo ra hạt nano hòa tan trong nước, và ít nhất một peptit chứa ít nhất một epitop tế bào T.

Mixen

Thuật ngữ “mixin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ thể kết tụ của các phân tử lưỡng tính được phân tán trong dung dịch nước. Các phần thân nước của các phân tử lưỡng tính tiếp xúc với dung môi xung quanh, ngăn cách các vùng “tận cùng” kỵ nước của các phân tử lưỡng tính ở phía bên trong của mixen, do đó tạo ra hạt nano hòa tan trong nước. Loại mixen này cũng được gọi là mixen pha thuận (hoặc mixen dầu trong nước).

Mixen có thể được tạo ra bởi một, nhưng cũng có thể nhiều hơn một, ví dụ hai, ba hoặc bốn phân tử polyme lưỡng tính. Mixen có thể được tạo ra bởi các phân tử polyme lưỡng tính giống hoặc khác nhau. Nhìn chung, thuật ngữ “a” hoặc “the” được sử dụng trong bản mô tả không nhằm mục đích giới hạn ở “một”, trừ khi có quy định khác.

Theo phương án ưu tiên, mixen được tạo ra bởi lớp đơn của các polyme lưỡng tính.

Mixen như vậy có thể khác biệt về mặt cấu trúc với lớp kép hoặc liposom được tạo ra bởi polyme lưỡng tính. Trong trường hợp này, các cấu trúc không, hoặc không chiếm tỷ lệ phần trăm đáng kể (ví dụ không nhiều hơn 10%, nhiều hơn 5%, hoặc tốt hơn nếu, nhiều hơn 1%), được chứa trong hạt nano theo sáng chế.

Theo một phương án của sáng chế, polyme lưỡng tính được sử dụng để sản xuất ít nhất 70%, tốt hơn nếu ít nhất 90% mixen. Theo phương án ưu tiên, mixen cấu thành từ polyme lưỡng tính.

Theo một số phương án của sáng chế, hạt nano không chứa lõi kỵ nước dạng rắn. Theo các phương án khác, hạt nano chứa mixen và lõi kỵ nước dạng rắn.

Phương pháp sản xuất hạt nano theo sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây.

Polyme lưỡng tính

Polyme lưỡng tính theo sáng chế thường chứa vùng kỵ nước chứa chuỗi béo kỵ nước có chiều dài chứa từ 8 đến 23, tốt hơn nếu 8 đến 21, tốt nhất nếu 16 đến 18 nguyên tử cacbon.

Vùng thân nước của polyme lưỡng tính có thể mang điện âm trong dung dịch nước.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, polyme lưỡng tính tạo ra một cách tự nhiên các mixen trong dung dịch. Khi lõi kỵ nước dạng rắn có mặt, polyme lưỡng tính tạo ra các mixen xung quanh lõi dạng rắn, tạo ra hạt nano hòa tan trong nước.

Khối lượng phân tử trung bình số (M_n) của polyme lưỡng tính nằm trong khoảng từ 1000 đến 6000g/mol. Khối lượng phân tử trung bình số có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký thẩm gel, tốt hơn nếu sử dụng chuẩn hiệu chỉnh là polystyren.

Theo phương án ưu tiên khối lượng phân tử trung bình số được xác định bằng cách sử dụng cột PL-gel hỗn hợp D ở nhiệt độ 40°C, pha động cấu thành từ tetrahydrofuran/axit axetic 90/10% (thể tích/thể tích), tốc độ dòng bằng 1,0mL/phút, kết hợp với bộ phận phát hiện chỉ số khúc xạ ở nhiệt độ 35°C và chuẩn hiệu chỉnh là polystyren.

Theo phương án ưu tiên nhất, khối lượng phân tử trung bình số được xác định bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký thẩm gel và các điều kiện đo sau:

Chuẩn tham chiếu	Chuẩn polystyren (MW (Mp định danh); 1000g/mol đến 130000g/mol)
Cột	Agilent PL-gel hỗn hợp-D, 300 x 7,5mm ID, 5 μ m
Nhiệt độ cột	40°C
Bộ phận phát hiện	Bộ phận phát hiện chỉ số khúc xạ ở nhiệt độ 35°C
Tốc độ dòng	1,0mL/phút
Thể tích tiêm	20 μ L
Nhiệt độ bộ phận lấy mẫu tự động	Môi trường xung quanh
Thời gian chạy	15 phút
Pha động	Tetrahydrofuran/axit axetic [90/10]%(thể tích/thể tích)
Chương trình pha động	Đẳng dòng

Polyme lưỡng tính có thể copolyme đan xen. Copolyme đan xen là copolyme chứa hai gốc của các đơn vị monome được phân bố theo trình tự đan xen.

Theo một phương án của sáng chế, polyme lưỡng tính là copolyme của maleic anhydrit và ít nhất một alken.

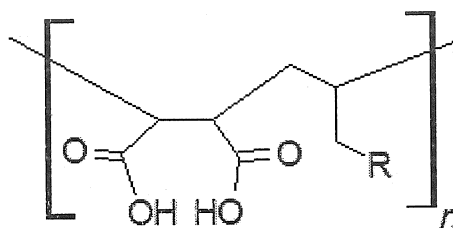
Alken được sử dụng trong sản xuất polyme lưỡng tính có thể được chọn từ một hoặc nhiều 1-decen, 1-undecen, 1-dodecen, 1-tridecen, 1-tetradecen, 1-pentadecen, 1-

hexadecen, 1-heptadecen, 1-octadecen, 1-nonadecen hoặc 1-eicosen, tốt hơn nếu alken này là 1-octadecen.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, polyme lưỡng tính là copolyme của maleic anhydrit và alken.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, polyme lưỡng tính có khung poly-maleic anhydrit thân nước chính có các chuỗi bên alkyl kỵ nước. Thông thường, chuỗi bên này có thể có từ 5 đến 23 nguyên tử cacbon, cụ thể từ 9 đến 21 nguyên tử cacbon. Theo phương án ưu tiên nhất, các chuỗi bên này là chuỗi mạch thẳng và có từ 10 đến 18 nguyên tử cacbon.

Polyme lưỡng tính có thể chứa khối cấu trúc sau



trong đó R là nhóm hydrocarbyl hoặc nhóm hydrocarbyl được thế. Theo phương án ưu tiên của sáng chế, R là nhóm C₄-C₂₂ alkyl, như nhóm C₇-C₁₉ alkyl.

Theo phương án thậm chí ưu tiên hơn, R là nhóm alkyl mạch thẳng, tốt hơn nếu nhóm C₇-C₁₇ alkyl mạch thẳng, tốt nhất nếu R là nhóm pentadecyl mạch thẳng hoặc nhóm nonyl mạch thẳng.

Polyme lưỡng tính có thể cấu thành từ khối cấu trúc được định nghĩa nêu trên.

Theo các phương án khác theo sáng chế, polyme lưỡng tính chứa ít nhất 50%, tốt hơn nếu ít nhất 70%, tốt nhất nếu nhiều hơn 90% khối cấu trúc được định nghĩa nêu trên.

Theo phương án ưu tiên, polyme lưỡng tính được chọn từ nhóm bao gồm poly(axit maleic-1-octadecen), poly(axit maleic-1-tetradecen) hoặc poly(axit maleic-1-dodecen), tốt hơn nếu polyme này là poly(axit maleic-1-octadecen) và khối lượng phân tử trung bình số của polyme này nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol.

Theo phương án đặc biệt ưu tiên, polyme lưỡng tính được chọn từ nhóm bao gồm poly(axit maleic-*alt*-1-octadecen), poly(axit maleic-*alt*-1-dodecen) và poly(axit maleic-*alt*-1-tetradecen), tốt hơn nếu polyme này là poly(axit maleic-*alt*-1-octadecen) và khối lượng phân tử trung bình số của polyme này là từ 5000 đến 1000g/mol.

Phương pháp sản xuất polyme lưỡng tính theo sáng chế cũng được mô tả chi tiết dưới đây.

Peptit

Hạt nano theo sáng chế còn chứa ít nhất một peptit chứa ít nhất một epitop tế bào T. Peptit này có thể được liên kết với phía bên ngoài của mixen hoặc được bao nang bên trong mixen (theo các phương án ở đó lõi kỵ nước dạng rắn không có mặt trong hạt nano theo sáng chế). Theo đó, peptit này có thể được bố trí ở phía bên ngoài của mixen hoặc phía bên trong mixen.

Peptit này có thể được liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị với mixen, tốt hơn nếu được liên kết cộng hóa trị với mixen.

Theo phương án ưu tiên, peptit được liên kết cộng hóa trị với mixen bằng cách sử dụng phương pháp ghép cặp cộng hóa trị peptit đã biết trong lĩnh vực này như phương pháp ghép cặp carbodiimite hoặc succinimite. Tốt hơn nếu, peptit được liên kết cộng hóa trị với mixen bằng cách sử dụng 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimite (EDC).

Thuật ngữ “peptit” được sử dụng trong bản mô tả không nhằm mục đích giới hạn kích cỡ, cụ thể, peptit có thể chứa protein toàn phần hoặc từ 8 đến 2000 axit amin, tốt hơn nếu, 8 đến 200 axit amin, 8 đến 100 axit amin, 9 đến 60 axit amin, hoặc 10 đến 20 axit amin. Thuật ngữ này cũng bao gồm tổ hợp của các peptit khác nhau, which có thể được liên kết với nhau dưới dạng polypeptit dung hợp.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, peptit này chứa 10 đến 20, như 13 đến 17 axit amin.

Theo phương án đặc biệt ưu tiên, peptit này chứa 15 axit amin.

Peptit chứa ít nhất một epitop tế bào T. Phương pháp xác định epitop tế bào T và chọn lọc epitop tế bào T là đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả trong các tài liệu Rammenxem et al., 1999 (Immunogenetics 50 213-219) và Sanchez-Trincado et al. 2017 (J Immunol Res. 2017:2680160. doi: 10.1155/2017/2680160. Epub 2017 Dec 28). Theo

sáng chế, epitop tế bào T là trình tự peptit cảm ứng tế bào T điều hòa. Ít nhất một epitop cần phải có khả năng được trình diện bởi các tế bào của đối tượng được sử dụng hạt nano. Tốt hơn nữa, peptit chứa một số epitop cho phép peptit này được trình diện trong nhiều loại phức hợp tương thích mô chính.

Do tế bào T điều hòa chủ yếu là tế bào T biểu hiện CD4, nên quá trình trình diện trên MHC nhóm II là mối quan tâm chính. Loại HLA của đối tượng này, ví dụ đối tượng là người, và có thể dễ dàng được thử nghiệm dưới dạng một phần của quá trình chọn lọc các epitop. Các epitop của peptit đặc hiệu có thể được trình diện trên các phân tử MHC đặc hiệu là đã biết và/hoặc có thể được chọn lọc bằng phần mềm thích hợp.

Peptit được thiết kế trên cơ sở dữ liệu đã được công bố để đảm bảo rằng peptit này - trong quá trình liên kết với yếu tố hạn chế HLA đặc hiệu - gắn kết MHC/HLA với ái lực cao và kích thích và hoạt hóa tối ưu tế bào T. Một cách lý tưởng, peptit được chọn được suy ra từ peptit được xử lý tự nhiên và được đặc trưng dưới dạng yếu tố quyết định miễn dịch.

Peptit có thể được tổng hợp, biểu hiện tái tổ hợp hoặc phân lập hoặc cải biến từ các nguồn tự nhiên. Peptit, hoặc ít nhất một epitop mà tế bào T điều hòa cần được sản sinh chống lại, tốt hơn nếu có nguồn gốc từ peptit/protein mà đáp ứng miễn dịch viêm cần được ức chế chống lại, ví dụ trong phạm vi điều trị hoặc phòng ngừa bệnh tự miễn hoặc tình trạng dị ứng. Peptit này có thể là kháng nguyên dị ứng, kháng nguyên tự miễn đã biết, hoặc mảnh chức năng hoặc dẫn xuất của chúng. Peptit có thể kết hợp các epitop khác nhau từ các kháng nguyên khác nhau.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, peptit là peptit kháng nguyên có nguồn gốc từ Desmoglein-3 (Dsg3). Ví dụ, peptit có thể là một hoặc nhiều hơn một peptit Desmoglein-3 được đặc trưng bởi SEQ ID NO.1-SEQ ID NO.3.

Theo một phương án của sáng chế, hạt nano chỉ chứa một loại peptit chứa ít nhất một epitop tế bào T.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa các hạt nano khác nhau, trong đó mỗi hạt nano chứa một số peptit có cùng trình tự axit amin nhưng chế phẩm chứa các hỗn hợp của các hạt nano khác nhau về trình tự peptit. Chế phẩm này có thể chứa các hạt nano khác nhau chứa từ 2 đến 6 peptit khác nhau. Theo một khía cạnh,

chế phẩm chứa các hạt nano khác nhau này có thể chứa ba loại khác nhau của các hạt nano, mỗi hạt nano này được đặc trưng bởi một trong số các trình tự SEQ ID NO.1-SEQ ID NO.3.

Lõi kỵ nước dạng rắn

Theo một phương án của sáng chế, hạt nano chứa lõi kỵ nước dạng rắn được bao ít nhất một phần bởi mixen.

Lõi này có thể là lõi vô cơ, tốt hơn nếu chứa sắt oxit, CdSe, bạc hoặc vàng.

Đường kính của lõi này có thể nằm trong khoảng từ 2nm đến 500nm, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 3nm đến 25nm, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 5nm đến 15nm. Đường kính của lõi này có thể được xác định bằng sử dụng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) hoặc phương pháp tán xạ tia X góc nhỏ (SAXS).

Các lõi vô cơ cụ thể là hạt nano sắt oxit được làm ổn định bằng axit oleic hoặc một axit carboxylic khác (C_{14} - C_{22} , tốt hơn nếu, C_{16} - C_{18}), chấm lượng tử (CdSe/CdS/ZnS được làm ổn định, ví dụ bằng trioctyloxinphosphinoxit), vàng hạt nano, ví dụ được làm ổn định bằng hợp chất sulfonic.

Bản thân các lõi vô cơ như vậy thường không ổn định trong dung môi chứa nước như nước, nhưng nhúng các lõi này trong các mixen polyme làm cho các lõi này hòa tan trong nước. Các phần kỵ nước của polyme lưỡng tính tương tác với lõi kỵ nước của hạt nano, dẫn đến hình thành lớp bao đơn của polyme xung quanh lõi này. Trong quy trình bao, polyme lưỡng tính có thể thay thế phần kỵ nước của lõi này bằng cách trao đổi phối tử, do đó mixen lớp kép được tạo ra xung quanh lõi này. Theo một phương án của sáng chế, polyme ít nhất một phần thay thế axit oleic trên bề mặt của hạt lõi này và phần thân nước của polyme tương tác với bề mặt của lõi sắt oxit và phần kỵ nước của polyme tương tác với nhau tạo ra mixen lớp kép xung quanh lõi sắt oxit, dẫn đến sắt oxit được bao bởi polyme.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, lõi này là siêu thuận từ.

Theo một phương án đặc biệt ưu tiên của sáng chế, lõi này là hạt nano sắt oxit siêu thuận từ (SPION), có thể được làm ổn định bằng axit oleic.

Tốt hơn nếu lõi này tạo ra hạt nano theo sáng chế có thể theo dõi qua dấu vết, ví dụ bằng đặc tính huỳnh quang của nó, kính hiển vi điện tử hoặc các phương pháp phát hiện khác.

Hạt nano

Các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng hạt nano để sử dụng trong sáng chế thích hợp để vận chuyển peptit vào tế bào tạo thành các xoang gan của đối tượng *in vivo*.

Hạt nano có thể còn chứa gốc, ví dụ carbohydrat hoặc protein hướng đích hạt nano này, hoặc tăng cường hướng đích đến tế bào đặc hiệu như tế bào tạo thành các xoang gan và/hoặc tế bào Kupffer. Gốc như vậy có thể tăng cường hoặc tăng tốc quá trình hấp thu từ hệ tuần hoàn thông qua quá trình nhập bào qua trung gian thụ thể. Ví dụ về gốc cải biến thích hợp là carbohydrat như manozơ.

Do chứa polyme tạo ra mixen, nên hạt nano theo sáng chế có thể mang điện âm hoặc không mang điện; tốt hơn nếu, hạt nano này mang điện âm ở độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 7. Polyme bao có thể chứa axit, ví dụ axit carboxylic, các nhóm, dẫn đến điện tích âm của hạt nano.

Hạt nano theo sáng chế có thể có thế zeta nằm trong khoảng từ -20 đến -50 mV, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ -25 đến -45 mV, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ -28 đến -42 mV ở độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 7 (độ pH trong quá trình đo). Thế zeta có thể được đo bằng cách sử dụng thiết bị Malvern Zetasizer Nano ZS.

Hạt nano theo sáng chế có thể có đường kính thủy động lực học (trị số trung bình theo phương z) nằm trong khoảng từ 10nm đến 100nm hoặc nằm trong khoảng từ 10nm đến 70nm, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 10nm đến 50nm, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 20nm đến 40nm, tốt nhất nếu nằm trong khoảng từ 22nm đến 32nm, như được đo bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động (DLS).

Hạt nano theo sáng chế có thể có chỉ số đa phân tán nhỏ hơn 0,50, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,45, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 0,10 đến 0,40, như được đo bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động (DLS).

Đường kính thủy động lực học và chỉ số đa phân tán được xác định bằng cách sử dụng phương pháp phân tích tán xạ ánh sáng điện di, tốt hơn nếu Malvern Zetasizer. Theo một phương án, phương pháp xác định đường kính thủy động lực học và chỉ số đa

phân tán được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp phân tích tán xạ ánh sáng điện di, cốc đo polystyren dùng một lần, phần mềm Zetasizer 7.12, nước milli-Q. Các chuẩn dạng hạt hình cầu có kích cỡ nano bằng 20nm và 100nm (NIST chứng nhận hoặc tương đương) được pha loãng trong dung dịch nước natri clorua 0,9% và các mẫu thử nghiệm được pha loãng trong nước. Toàn bộ các chất phản ứng chứa nước được lọc qua màng 0,22 μ m trước khi sử dụng. Theo phương án ưu tiên nhất theo sáng chế, phương pháp xác định đường kính thủy động lực học và chỉ số đa phân tán được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp phân tích tán xạ ánh sáng điện di kết hợp với các điều kiện phân tích sau:

Tổng quan các điều kiện phân tích:

Thông số	Thiết lập
Chất phân tán	Nước
RI chất phân tán	1,33
Độ nhớt (cP ở nhiệt độ 25,0°C)	0,8872
RI vật liệu (mẫu)	2,42
RI vật liệu (chuẩn)	1,333
Độ hấp thụ vật liệu	0,05
Nhiệt độ (°C)	25
Vị trí đo (mm)	4,65
Cốc đo	Cốc đo định cỡ dùng một lần
Bộ suy giảm	Tự động
Thời gian đo	Tự động

Dữ liệu được đánh giá trên cơ sở đường kính trung bình (trị số trung bình theo phương z, nm theo cường độ), là thông số cũng được biết đến trong DLS dưới dạng trị số trung bình nửa bất biến và chỉ số đa phân tán (PDI), được sử dụng làm đại lượng đo phân bố kích cỡ.

Hơn nữa, hạt nano theo sáng chế có thể có hàm lượng polyme tổng số nằm trong khoảng từ 0,1 đến 5mg/mL, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,5 đến 4mg/mL, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 1 đến 3mg/mL. Hàm lượng polyme tổng số được xác định bằng phương pháp sắc ký thẩm gel. Để đo hàm lượng polyme tổng số, peptit được thủy phân, và hạt được phân hủy (ví dụ sử dụng dung dịch HCl 6M). Polyme được chiết xuất sau khi bổ sung EDTA. Sau khi làm bay hơi dung môi, phần cặn được tái hòa tan và hàm lượng polyme được xác định bằng phương pháp sắc ký thẩm gel.

Tốt hơn nếu hàm lượng polyme tổng số được xác định bằng cách sử dụng các chất phản ứng và nước chuẩn tham chiếu sau (cấp độ HPLC), axetonitril (cấp độ HPLC), tetrahydrofuran chứa BHT (cấp độ THF-HPLC), axit axetic 100% (cấp độ phân tích), axit hydrochloric 37% (cấp độ phân tích), axit etylendiamintetraaxetic dinatri salt dihydrat (cấp độ phân tích), etyl axetat (cấp độ phân tích), natri hydroxit (cấp độ phân tích) và poly(axit maleic-alt-1-octadecen) là chất đối chiếu.

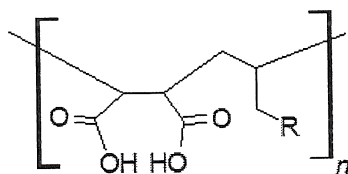
Các điều kiện sắc ký để xác định hàm lượng polyme tổng số là:

Cột	Agilent PL-gel Hỗn hợp-D, 300+75 mm ID, 5 μ m
Nhiệt độ cột	40°C
Tốc độ dòng	1,0mL/phút
Bộ phận phát hiện	Bộ phận phát hiện chỉ số khúc xạ ở nhiệt độ 35°C
Tỷ lệ mẫu	2,31 Hz hoặc tương đương
Thể tích tiêm	20 μ L
Nhiệt độ bộ phận lấy mẫu tự động	Môi trường xung quanh
Thời gian chạy	15 phút
Pha động	THF/axit axetic [90/10]%(thể tích/thể tích)
Chương trình pha động	Đẳng dòng

Theo một phương án đặc biệt ưu tiên của sáng chế, hạt nano chứa lõi sắt oxit được bao nang bởi màng bao chứa poly(axit maleic-alt-1-octadecen) có khối lượng phân tử trung bình số nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol hoặc nhỏ hơn và peptit chứa ít nhất một epitop tế bào T, tốt hơn nếu peptit này được liên kết cộng hóa trị với mixen.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến hạt nano chứa

a) mixen chứa polyme lưỡng tính chứa khối cấu trúc sau



trong đó R là nhóm hydrocarbyl hoặc nhóm hydrocarbyl được thế, tốt hơn nếu R là nhóm alkyl mạch thẳng, tốt hơn nếu nhóm C₁₁-C₁₇ alkyl mạch thẳng, và trong đó polyme này có khối lượng phân tử trung bình số (M_n) của nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol, và

b) ít nhất một peptit chứa ít nhất một epitop tế bào T; và

c) lõi kỵ nước dạng rắn được bao ít nhất một phần bởi mixen, trong đó lõi này chứa vật liệu vô cơ có thể theo dõi qua dấu vết được chọn từ nhóm bao gồm sắt oxit, CdSe/CdS/ZnS, bạc và vàng.

Tốt hơn nếu khối lượng phân tử trung bình số của polyme này nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol.

Tốt hơn nếu hạt nano theo sáng chế có đường kính thủy động lực học nằm trong khoảng từ 50nm đến 10nm như được đo bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động.

Dược phẩm

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa hạt nano theo sáng chế.

Peptit được sử dụng có thể có mặt trong dược phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01mM đến 2mM, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,1mM đến 1mM, tốt nhất nếu nằm trong khoảng từ 0,45mM đến 1mM.

Theo phương án ưu tiên, lượng của polyme tự do (chưa liên kết) trong dược phẩm này nhỏ hơn 10%, tốt hơn nếu nhỏ hơn 5%, tốt nhất nếu nhỏ hơn 2% tổng lượng của polyme.

Dược phẩm theo sáng chế có thể cũng chứa ít nhất một tá dược và/hoặc tá dược pha loãng thích hợp. Tốt hơn nếu tá dược pha loãng là nước hoặc trên cơ sở nước, ví dụ dung dịch đệm như dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS), dung dịch Ringer, dung dịch đệm TRIS hoặc dung dịch natri clorua. Các chất bảo quản thích hợp có thể được chứa hoặc không được chứa.

Rõ ràng là, cụ thể để sử dụng cho đối tượng là người, tốt hơn nếu dược phẩm này là vô trùng và tương thích sinh học.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, dược phẩm chứa hạt nano theo sáng chế được phân tán trong D-manitol, TRIS và/hoặc axit L-lactic.

Theo một phương án của sáng chế, dược phẩm chứa hạt nano theo sáng chế không chứa lõi kỵ nước dạng rắn, hạt nano này được phân tán trong D-manitol, TRIS và/hoặc axit L-lactic. Việc sử dụng dung dịch đệm này có lợi ở chỗ hạt rất ổn định trong dung dịch đệm này và có thể được đông khô sau đó.

Hơn nữa, dược phẩm có thể chứa nhiều hơn một loại hạt nano theo sáng chế, trong đó các loại khác nhau của các hạt nano có các peptit khác nhau được liên kết với phía bên ngoài của mixen. Bằng cách sử dụng hỗn hợp của các hạt nano, khả năng chống chịu miễn dịch rộng hơn có thể được cảm ứng đồng thời bởi một số tự nguyên peptit. Các peptit này có thể có nguồn gốc từ một protein sinh miễn dịch duy nhất, hoặc từ các protein khác nhau.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, dược phẩm chứa từ 2 đến 6 loại hạt nano khác nhau, trong đó tốt hơn nếu toàn bộ các peptit được liên kết của các loại hạt nano khác nhau chứa ít nhất một epitop tế bào T.

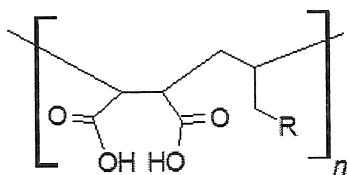
Theo một phương án đặc biệt ưu tiên của sáng chế, dược phẩm chứa từ 3 đến 4 loại hạt nano khác nhau, trong đó toàn bộ các peptit được liên kết của các loại hạt nano khác nhau chứa ít nhất một epitop tế bào T. Cụ thể, mỗi hạt nano có thể được liên kết với một peptit kháng nguyên khác có nguồn gốc từ Dsg3.

Dược phẩm có thể chứa hạt nano ở nồng độ nhỏ hơn $100\mu\text{M}$, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ $0,5\mu\text{M}$ đến $80\mu\text{M}$, tốt nhất nếu nằm trong khoảng từ $1\mu\text{M}$ đến $50\mu\text{M}$. Khi nhiều hơn một hạt nano có mặt trong dược phẩm, mỗi hạt nano này có thể có mặt ở nồng độ nhỏ hơn $100\mu\text{M}$, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ $0,5\mu\text{M}$ đến $80\mu\text{M}$, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ $1\mu\text{M}$ đến $50\mu\text{M}$.

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa các loại hạt nano khác nhau ở nồng độ đẳng mol.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa hạt nano chứa

a) mixen chứa polyme lưỡng tính chứa khối cấu trúc sau



trong đó R là nhóm hydrocarbyl hoặc nhóm hydrocarbyl được thế, tốt hơn nếu R là nhóm alkyl mạch thẳng, tốt hơn nếu nhóm $\text{C}_{11}\text{-C}_{17}$ alkyl mạch thẳng, và trong đó polyme này có khối lượng phân tử trung bình số (M_n) nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol, và

b) ít nhất một peptit chứa ít nhất một epitop tế bào T; và

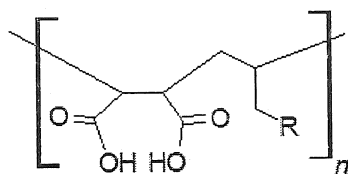
c) lõi kỵ nước dạng rắn được bao ít nhất một phần bởi mixen, trong đó lõi này chứa vật liệu vô cơ có thể theo dõi qua dấu vết được chọn từ nhóm bao gồm sắt oxit, CdSe/CdS/ZnS, bạc và vàng.

Tốt hơn nếu khối lượng phân tử trung bình số của polyme trong được phẩm nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol.

Tốt hơn nếu hạt nano trong được phẩm theo sáng chế có đường kính thủy động lực học nằm trong khoảng từ 50nm đến 10nm như được đo bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động.

Theo khía cạnh ưu tiên, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa ít nhất ba loại hạt nano khác nhau, trong đó mỗi hạt nano này chứa

a) mixen chứa polyme lưỡng tính chứa khối cấu trúc sau



trong đó R là nhóm hydrocarbyl hoặc nhóm hydrocarbyl được thế, tốt hơn nếu R là nhóm alkyl mạch thẳng, tốt hơn nếu nhóm C₁₁-C₁₇ alkyl mạch thẳng, và trong đó polyme này có khối lượng phân tử trung bình số (Mn) nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol, và

b) một peptit chứa ít nhất một epitop tế bào T; và

c) lõi kỵ nước dạng rắn được bao ít nhất một phần bởi mixen, trong đó lõi này chứa vật liệu vô cơ có thể theo dõi qua dấu vết được chọn từ nhóm bao gồm sắt oxit, CdSe/CdS/ZnS, bạc và vàng; và

trong đó ba loại hạt nano khác nhau này khác nhau về trình tự peptit, trong đó loại hạt nano thứ nhất chứa peptit có SEQ ID NO.1, loại hạt nano thứ hai chứa peptit có SEQ ID NO.2 và loại hạt nano thứ ba chứa peptit có SEQ ID NO.3.

Sử dụng trong y tế

Dược phẩm theo sáng chế được dự định để sử dụng trong và bào chế để sử dụng cho đối tượng có bệnh trong đó quá trình ức chế đáp ứng miễn dịch đặc hiệu là có lợi.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cho đối tượng cần điều trị.

Liều lượng và nồng độ cần thiết để sử dụng cho đối tượng có thể được xác định bởi nhân viên y tế có trách nhiệm theo tình huống thực tế và cụ thể của ca bệnh. An exemplary dose phải chứa 0,03 μ mol đến 0,90 μ mol/khối lượng cơ thể của đối tượng bị bệnh, ví dụ đối tượng là người.

Bước sử dụng có thể được lặp lại, ví dụ hai lần, ba lần hoặc bốn lần, ví dụ trong 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 hoặc 14 ngày giữa các lần sử dụng.

Tốt hơn nữa, dược phẩm theo sáng chế là để sử dụng trong ức chế đáp ứng miễn dịch đặc hiệu, như điều trị hoặc phòng ngừa bệnh trong đó quá trình ức chế đáp ứng miễn dịch đặc hiệu là có lợi. Tốt hơn nữa nếu, dược phẩm theo sáng chế là để sử dụng trong sản sinh tế bào T điều hòa đặc hiệu ít nhất một epitop tế bào T ở đối tượng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh trong đó quá trình ức chế đáp ứng miễn dịch đặc hiệu là có lợi.

Bệnh có thể là bệnh tự miễn liên quan đến tự kháng nguyên xác định. Theo sáng chế, thuật ngữ “bệnh tự miễn” được hiểu và xác định bởi Hayter et. al. (Autoimmunity Reviews 11 (2012) 754-765). Theo phương án ưu tiên, bệnh tự miễn được chọn từ nhóm bao gồm bệnh bọng nước, bệnh bọng nước vảy lá, bệnh da bóng nước dưới biểu bì, bệnh da bọng nước toàn thân, bệnh da bọng nước tự miễn mạn tính dưới thượng bì, hội chứng Goodpasture, bệnh viêm đa vi mạch, bệnh u hạt đi kèm viêm đa mạch (bệnh u hạt Wegener), ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối, ban xuất huyết giảm tiểu cầu miễn dịch, bệnh viêm màng bồ đào, bệnh viêm màng bồ đào trước cấp tính liên quan đến HLA-B27, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh viêm tủy thị thần kinh, bệnh đái tháo đường typ I, chứng ngủ rũ có hoặc không có mất đột ngột trương lực cơ, bệnh không dung nạp gluten, bệnh viêm da herpetiformis, bệnh đường hô hấp dị ứng/bệnh hen phế quản, bệnh nhược cơ, bệnh viêm tuyến giáp hashimoto, bệnh tuyến giáp tự miễn, bệnh Graves, bệnh tuyến giáp tự miễn, bệnh suy tuyến cận giáp tự miễn, bệnh tuyến giáp tự miễn, hội chứng kháng phospholipit, bệnh Addison tự miễn, bệnh thiếu máu tán huyết tự miễn, bệnh viêm dây thần kinh hủy myelin mãn tính, bệnh đa dây thần kinh, hội chứng Guillain-Barré, bệnh giảm bạch cầu trung tính tự miễn, bệnh xơ cứng bì thể dải, bệnh Batten, bệnh máu khó đông mắc phải typ A, bệnh viêm đa sụn tái diễn, hội chứng Isaac (bệnh tăng trương lực

cơ thần kinh mắc phải), bệnh viêm não Rasmussen, hội chứng Morvan, hội chứng Stiff-person, bệnh thiếu máu ác tính, hội chứng Vogt-Koyanagi-Harada, bệnh xơ gan mật nguyên phát, bệnh viêm gan tự miễn typ I, bệnh viêm gan tự miễn typ II, bệnh lupus ban đỏ hệ thống, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm đa cơ/bệnh viêm da cơ, hội chứng Sjögren, bệnh xơ cứng bì, bệnh bạch biến và rụng tóc từng mảng.

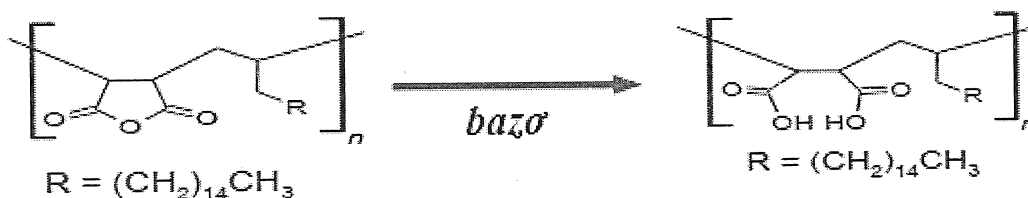
Tốt hơn nữa nếu, bệnh tự miễn được chọn từ nhóm bao gồm bệnh bọng nước, hội chứng Goodpasture, bệnh viêm đa vi mạch, ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh viêm tủy thị thần kinh, bệnh đái tháo đường typ I, chứng ngủ rũ có hoặc không có mất đột ngột trương lực cơ, bệnh không dung nạp gluten, bệnh Addison tự miễn, bệnh thiếu máu tán huyết tự miễn và bệnh máu khó đông mắc phải typ A.

Thuật ngữ “điều trị” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ biện pháp làm giảm các triệu chứng của bệnh cụ thể ở đối tượng, và/hoặc cải thiện thông số đo có thể xác định liên quan đến rối loạn cụ thể.

Phương pháp sản xuất polyme lưỡng tính và hạt nano

Phương pháp sản xuất polyme lưỡng tính và hạt nano chứa polyme này được mô tả trong các ví dụ 1-4.

Một phương pháp điều chế polyme lưỡng tính có khối lượng phân tử trung bình số (M_n) nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol là phương pháp hai bước, bao gồm bước điều chế polyme của anhydrit và bước thủy phân anhydrit để thu được axit. Bước thủy phân dạng anhydrit của polyme để thu được dạng axit có thể được mô tả như sau:



Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất hạt nano, bao gồm các bước sau: i) điều chế polyme lưỡng tính có khối lượng phân tử trung bình số (M_n) nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol, ii) tùy ý tinh chế polyme lưỡng tính, iii) điều chế mixen chứa polyme lưỡng tính, và iv) bổ sung ít nhất một peptit để thu được hạt nano.

Theo các phương án của sáng chế trong đó các peptit được bao nang bởi mixen, bước iv) được thực hiện trước bước iii). Theo các phương án này, các peptit được bổ sung vào polyme lưỡng tính trước khi tạo mixen.

Polyme lưỡng tính được sử dụng trong hạt nano theo sáng chế có thể được điều chế (bước i) bằng bước tổng hợp copolyme hóa gốc bằng cách sử dụng chất hoạt hóa gốc.

Khối lượng phân tử của polyme có thể được kiểm soát bằng cách điều chỉnh nồng độ của các chất phản ứng hoặc lượng của chất hoạt hóa gốc. Khối lượng phân tử của polyme có thể được phân tích bằng phương pháp sắc ký thẩm gel.

Bước tổng hợp copolyme hóa có thể được thực hiện trong dung môi hữu cơ như 1,4 dioxan, xylen hoặc clobenzen.

Nhiều chất hoạt hóa gốc là đã biết trong lĩnh vực này; các chất hoạt hóa gốc này bao gồm các peroxit và các hợp chất loại azo khác nhau. Ví dụ về các peroxit thích hợp bao gồm benzoyl peroxit, lauryl peroxit, di-t-butyl peroxit, 2,4-diclobenzyl peroxit, t-butyl hydroperoxit, cumen hydroperoxit, diaxetyl peroxit, dietyl peroxy carbonat, t-butyl perbenzoat và perborat. Các hợp chất loại azo thích hợp bao gồm 2,2'-azobis(2-metylpropionitril), p-brombenzendiazoni fluoborat, p-tolyldiazoaminobenzen, p-brombenzendiazoni hydroxit, azometan và phenyl-diazoni halogenua. Tốt hơn nếu, chất hoạt hóa gốc là 2,2'-azobis(2-metylpropionitril).

Bước tổng hợp copolyme hóa có thể được thực hiện ở nhiệt độ cao như nằm trong khoảng từ 70°C đến 120°C, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 90°C đến 110°C.

Tốt hơn nếu, bước tổng hợp copolyme hóa được hoạt hóa bằng cách gia nhiệt hỗn hợp đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 120°C, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 90°C đến 110°C.

Theo phương án ưu tiên của phương pháp theo sáng chế, bước i) bao gồm các bước trộn các chất phản ứng, khử oxy hỗn hợp, gia nhiệt hỗn hợp, sau đó làm nguội hỗn hợp. Sau đó, polyme có thể được hòa tan và khuấy qua đêm. Chất rắn được tạo ra có thể được thu nhận, tốt hơn nếu bằng cách sử dụng phương pháp ly tâm.

Theo phương án ưu tiên của phương pháp theo sáng chế, bước ii) bao gồm bước bổ sung bazơ vào polyme (ví dụ NaOH). Tốt hơn nếu, bazơ được cho phản ứng với polyme ở nhiệt độ cao, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 50°C đến 70°C, như 60°C cho

đến khi hầu như toàn bộ các chất rắn được hòa tan. Hỗn dịch thu được có thể được axit hóa (ví dụ độ pH <2). Sau đó, hỗn hợp phản ứng có thể được chiết xuất bằng dung môi hữu cơ như etyl axetat. Lớp hữu cơ có thể được chiết xuất bằng dung dịch natri hydroxit. Dung dịch nước có thể được chiết xuất một lần nữa bằng dung môi hữu cơ như etyl axetat, sau đó làm khô để thu được polyme lưỡng tính tinh chế.

Polyme có thể cũng được tinh chế (bước iii). Tốt hơn nếu, polyme này cũng được tinh chế bằng cách chiết xuất polyme bằng n-hexan hoặc n-heptan. Bước chiết xuất có thể được thực hiện ở nồng độ lớn hơn 10g/L, tốt hơn nếu 100g/l.

Hơn nữa, bước tinh chế bổ sung polyme lưỡng tính có thể được thực hiện bổ sung ở giữa bước i) và bước ii). Trong bước tinh chế bổ sung này, sản phẩm phản ứng thô của phản ứng polyme hóa được hòa tan và kết tủa. Theo phương án ưu tiên, dung môi là diclometan và polyme này được kết tủa bằng cách sử dụng hỗn hợp của metanol/heptan hoặc axetonitril/iso-propanol. Các hỗn hợp được sử dụng có thể chứa 95/5% (% thể tích/thể tích) metanol/heptan, 10/90 (% thể tích/thể tích) axetonitril/iso-propanol hoặc 5/95 (% thể tích/thể tích) axetonitril/iso-propanol. Theo phương án ưu tiên, hỗn hợp kết tủa được bổ sung ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -10°C đến 10°C, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ -5°C đến 5°C.

Độ tinh khiết của polyme lưỡng tính sau khi thủy phân và điều chế có thể được đo bằng phương pháp ^1H NMR.

Trong phương pháp theo sáng chế, mixen được tạo ra bằng cách điều chế dung dịch chứa polyme lưỡng tính. Tốt hơn nếu, mixen được tạo ra trong dung dịch nước. Các chất đồng ổn định có thể được bổ sung vào polyme lưỡng tính để tăng cường hình thành mixen.

Peptit được sử dụng trong bước iv) có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp pha rắn.

Peptit này có thể được liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị với mixen.

Theo phương án ưu tiên của phương pháp theo sáng chế, peptit được ghép cặp với bề mặt của hạt nano bằng cách sử dụng phương pháp ghép cặp peptit đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ phương pháp ghép cặp carbodiimite hoặc succinimite.

Theo phương án đặc biệt ưu tiên của phương pháp theo sáng chế, peptit được ghép cặp với bề mặt của hạt nano thông qua 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide trong pha nước.

Hạt nano thu được có thể được tinh chế bằng cách sử dụng bước lọc và rửa tốc độ cao để loại bỏ các chất phản ứng ghép cặp và các thành phần có khối lượng phân tử thấp bất kỳ.

Theo phương án ưu tiên, phương pháp sản xuất hạt nano bao gồm các bước sau: a) điều chế hạt nano chứa lõi kỵ nước, b) điều chế polyme lưỡng tính có khối lượng phân tử trung bình số (M_n) nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol, tốt hơn nếu bằng cách sử dụng bước tổng hợp copolyme hóa gốc, c) tùy ý tinh chế polyme lưỡng tính, d) trộn hạt nano chứa lõi kỵ nước và polyme lưỡng tính để thu được các mixen, e) bổ sung ít nhất một peptit để thu được hạt nano.

Phần mô tả của các bước i) đến iii) và iv) nêu trên cũng được áp dụng tương ứng cho các bước b) đến d) và e).

Lõi kỵ nước ở bước a) có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các chất phản ứng thích hợp trong dung dịch. Theo phương án ưu tiên của phương pháp theo sáng chế, lõi kỵ nước có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các chất phản ứng là muối kim loại và muối của axit carboxylic trong sự có mặt của dung môi hữu cơ. Tốt hơn nếu, phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ cao trong điều kiện hạn chế oxy.

Mixen có thể được tạo ra bằng cách bố trí copolyme lưỡng tính xung quanh lõi ở bước e). Tốt hơn nếu, bước d) bao gồm các bước phụ là bước hòa tan polyme lưỡng tính và hạt lõi, loại bỏ dung môi cho đến khi màng mỏng được tạo ra, bổ sung dung dịch nước bazơ ở nhiệt độ tăng và áp suất môi trường xung quanh để thu được thể phân tán keo dạng nước, pha loãng dung dịch thu được và tùy ý lọc dung dịch này. Sau đó, một số bước rửa có thể được áp dụng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ sau, mà mô tả chi tiết phương pháp tổng hợp hạt nano theo sáng chế. Các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Điều chế lõi tinh thể sắt oxit siêu thuận từ (SPION)

Sơ đồ tổng hợp phức chất sắt oleat được thể hiện trên Fig.1.

Trong bước thứ nhất, phức chất sắt oleat được tổng hợp bằng cách trộn axit oleic, natri hydroxit và sắt clorua trong điều kiện hồi lưu ở nhiệt độ 70°C. Sản phẩm được tinh chế bằng một số bước rửa trong phễu phân tách, sau đó làm khô bằng natri sulphat và cô trong thiết bị bay hơi quay để thu được lõi sắt oxit tinh thể (Fig.1).

Trong bước thứ hai (Fig.2), phức chất sắt oleat được hòa tan trong 1-octadecen ở nhiệt độ phòng và khuấy cho đến khi hòa tan hoàn toàn. Sau đó, axit oleic được bổ sung vào, khử oxy và gia nhiệt trong 3 giờ ở nhiệt độ 300°C để tạo ra tinh thể nano sắt oxit.

Sau khi làm nguội, sản phẩm được tinh chế bằng một số bước rửa bằng cách sử dụng phương pháp phân tách từ và axeton/tetrahydrofuran (THF). SPION được tinh chế được pha loãng trong clorofom và cô trong thiết bị bay hơi quay để thu được SPION có phân bố kích cỡ hẹp và độ kết tinh tốt.

Ví dụ 2: Điều chế poly(axit maleic-alt-1-octadecen) khối lượng phân tử thấp (LM-PMaOD)

Sơ đồ tổng hợp poly(axit maleic-alt-1-octadecen) khối lượng phân tử thấp (LM-PMaOD) là quy trình hai bước được thể hiện trên Fig.3 và Fig.4.

Trong bước thứ nhất, maleic anhydrit (48.9mmol) và 1-octadecen (48.2mmol) được hòa tan trong 1,4 dioxan (10mL) (chất ức chế 1,4-dioxan được loại bỏ trước đó bằng cách lọc hợp chất này qua nhôm oxit (3g)). Sau đó, AIBN (5,79mmol, 2,2'-azobis(2-metylpropionitril)) được bổ sung vào. Bình phản ứng được trang bị bộ làm nguội, sau đó được súc với nitơ và duy trì ở điều kiện quá áp nitơ. Hỗn hợp được gia nhiệt đến nhiệt độ 100°C kết hợp khuấy. Sau 1 giờ bước gia nhiệt được bắt đầu, tám gia nhiệt được tháo ra cùng với các nút đáy; hỗn hợp phản ứng được tiếp xúc với không khí. Hỗn hợp được làm nguội đến nhiệt độ phòng trong 2 ngày kết hợp khuấy. Sản phẩm được tinh chế bằng cách đồng bay hơi với diclometan và kết tủa với isopropanol và axetonitril để thu được poly(maleic anhydrit-alt-1-octadecen) khối lượng phân tử thấp (LM-PMAOD) có khối lượng phân tử trung bình số (M_n) nằm trong khoảng từ 2500 đến 4000g/mol.

Trong bước thứ hai, LM-PMAOD được thủy phân thành poly(axit maleic-alt-1-octadecen) (LM-PMaOD) trong dung dịch natri hydroxit. Bước chiết xuất axit-bazo

bằng H_2SO_4 , etylaxetat, và NaOH được thực hiện để tinh chế sản phẩm và loại bỏ các tạp chất như 1-octadecen còn dư. Sản phẩm được làm khô trên magie sulphat, đồng bay hơi với clorofom và cuối cùng được tinh chế bằng phương pháp chiết xuất rắn-lỏng trong n-heptan (Fig.4).

Khối lượng mol trung bình số (M_n) và khối lượng mol trung bình khối (M_w) của polyme thu được được xác định bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký thẩm gel.

Mẫu chứa LM-PMaOD (1,5mg) được hòa tan trong THF (1,0mL) (không chứa chất ổn định) và cấp vào hệ thống sắc ký thẩm gel. Polystyren được sử dụng làm chuẩn hiệu chỉnh. Tetrahydrofuran được sử dụng làm dung môi rửa giải và tốc độ dòng bằng 1mL/phút. Nhiệt độ được thiết lập đến 30°C.

Khối lượng mol trung bình số (M_n) của LM-PMaOD thu được bằng 1540g/mol và khối lượng mol trung bình khối (M_w) bằng 2410g/mol. Do đó, chỉ số đa phân tán bằng 1,56 như được tính toán for the mẫu, which is characteristic for a polyme produced via non-controlled free radical phản ứng polyme hóa (xem Fig.8).

Ví dụ 3: Bao SPION bằng polyme

Bước bao SPION bằng polyme được thể hiện trên Fig.5.

Ví dụ 3a: LM-PMaOD (100mg) được sản xuất theo ví dụ 2 được hòa tan trong clorofom (4mL) trong bình phản ứng đáy tròn dung tích 100mL. Hỗn hợp được gia nhiệt cho đến khi polyme được hòa tan hoàn toàn. Dung dịch chứa oleat-SPION (3,3mL) được sản xuất theo ví dụ 1 được bổ sung vào hỗn hợp, sau đó bay hơi ở áp suất <10 mbar trong 15 phút ở nhiệt độ 40°C trên thiết bị bay hơi quay ở tốc độ bằng 280 vòng/phút. Sau đó, NaOH 5mM (10mL) được bổ sung vào hỗn hợp và khuấy trên thiết bị bay hơi quay trong 15 phút ở nhiệt độ 50°C cho đến khi toàn bộ các chất rắn màu đen được hòa tan. Dung dịch được pha loãng 8 lần bằng cách sử dụng NaOH 25mM (70mL) để hòa tan toàn bộ polyme. Dung dịch thu được được khuấy trên thiết bị bay hơi quay trong 15 phút, để thu được dung dịch màu nâu.

Sản phẩm được lọc qua bộ lọc PES 0,45 μm và 0,2 μm . Sau đó, sản phẩm lọc được tinh chế bằng phương pháp lọc dòng tiếp tuyến (TFF).

Ví dụ 3b: Quy trình tương tự được thực hiện với polyme có bán trên thị trường có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 30 đến 50 kDa (#419117 Merck) sau khi thủy

phân theo ví dụ 2. Do việc loại bỏ polyme chưa liên kết ra khỏi các SPION được bao bởi polyme bằng phương pháp TFF là không hiệu quả, nên phương pháp phân tách từ bổ sung được thực hiện bằng cách cột Miltenyi để tinh chế mề PMAcOD-SPION MX0194.

Ví dụ 4: Peptit và ghép cặp peptit

Sơ đồ ghép cặp peptit và tổng hợp hạt nano được thể hiện trên Fig.6.

Các peptit được tổng hợp bằng phương pháp Fmoc từ hướng C đến hướng N bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp peptit pha rắn (SPPS). Nhóm amin alpha của mỗi axit amin được bảo vệ bằng nhóm fluoren-9-ylmethoxycarbonyl (Fmoc), trong khi các nhóm chức ở chuỗi bên cũng được bảo vệ bằng các nhóm bảo vệ thích hợp khác nhau.

Nhìn chung, phương pháp tổng hợp peptit pha rắn bao gồm các chu trình khử bảo vệ đầu tận cùng N được lặp lại, tiếp theo là các phản ứng ghép cặp. Axit amin được bảo vệ bằng nhóm Fmoc thứ nhất được ghép cặp với nhựa. Sau đó, nhóm amin được khử bảo vệ bằng hỗn hợp của piperidin trong dimethylformamit (DMF), sau đó ghép cặp với axit tự do của axit amin được bảo vệ bằng nhóm Fmoc thứ hai. Chu trình này được lặp lại cho đến khi thu được trình tự mong muốn. Nhựa được rửa ở giữa mỗi bước. Thời điểm kết thúc của mỗi phản ứng ghép cặp được theo dõi bằng thử nghiệm ninhydrin định tính. Trong bước cuối cùng của quy trình tổng hợp, peptit thô-nhựa được rửa liên tiếp bằng DMF và metanol, và làm khô. Sau đó, các nhóm bảo vệ được loại bỏ ra khỏi peptit và peptit được phân cắt ra khỏi nhựa bằng cách sử dụng axit trifloaxetic (TFA). Peptit thô thu được được phân lập bằng cách kết tủa bằng ete từ hỗn hợp phân cắt.

Hơn nữa, peptit được tinh chế bằng phương pháp HPLC điều chế để đạt được các yêu cầu về độ tinh khiết, và ion đối TFA được thay thế bằng clorua bằng cách sử dụng hệ dung môi-dung dịch đệm thích hợp. Cuối cùng, peptit được tinh chế được đông khô.

Các peptit được sử dụng có axit amin ở đầu tận cùng N và axit tự do (muối HCl) ở đầu tận cùng C và có chiều dài chứa 15 axit amin.

Các peptit tự do (các vật liệu ban đầu) được xác định đặc tính bằng phương pháp LC-MS.

Các trình tự peptit và khối lượng đơn đồng vị tính toán được sử dụng trong các ví dụ của sáng chế được thể hiện trên Bảng 1.

Bảng 1: Các trình tự peptit và khối lượng đơn đồng vị

SEQ ID NO.	Trình tự	Công thức phân tử	Khối lượng đơn đồng vị (lý thuyết) (Da)
1	LNSKIAFKIVSQEPA	$C_{75}H_{125}N_{19}O_{22}$	1643,9
2	TPMFLLSRNTGEVRT	$C_{74}H_{124}N_{22}O_{23}S$	1720,9
3	REGIAFRPASKTFTV	$C_{76}H_{122}N_{22}O_{21}$	1678,9

Khối lượng phân tử của peptit được đo bằng phương pháp khối phổ ion hóa hóa học áp suất khí quyển tia điện đa chế độ.

Các peptit được ghép cặp với bề mặt của mixen được sản xuất theo ví dụ 3a bằng cách sử dụng 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) trong dung dịch đệm axit boric/natri tetraborat decahydrat (SBB).

EDC trong dung dịch đệm SBB được bổ sung vào mixen được sản xuất theo ví dụ 3. Sau 15 phút ở nhiệt độ phòng, các peptit được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 2 giờ và 15 phút ở nhiệt độ phòng.

Dung dịch hạt nano thu được được lọc và tinh chế bằng bước tinh chế bằng phương pháp lọc dòng tiếp tuyến (TFF).

Ví dụ 5: Xác định đặc tính của hạt nano

Hạt nano được sản xuất theo ví dụ 4 cũng được xác định đặc tính bằng cách sử dụng nhiều phương pháp phân tích.

Lõi sắt oxit được xác định đặc tính bằng cách sử dụng kính hiển vi điện tử truyền qua và SAXS. Các phân tích bằng kính hiển vi điện tử truyền qua được thực hiện trên hạt nano được phân tán trong 5% (khối lượng/thể tích) D-manitol, 5mM TRIS và 6mM axit L-lactic. Các kết quả tính toán kích cỡ hạt của các hạt nano được sản xuất theo ví dụ 4 trên cơ sở phân tích bằng kính hiển vi điện tử truyền qua được thể hiện trên Bảng 2. Các ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử truyền qua được thể hiện trên Fig.7.

Bảng 2: Các kết quả tính toán kích cỡ trung bình của lõi sắt oxit trên cơ sở phân tích bằng kính hiển vi điện tử truyền qua

TPC	Kích cỡ trung bình của lõi sắt oxit (nm)	Độ lệch chuẩn (%)
TPC0002 SEQ ID NO.1	9,74	1,04
TPC0003 SEQ ID NO.2	9,45	0,92
TPC0005 SEQ ID NO.3	9,80	0,96

Các phép đo SAXS được thực hiện trên hạt nano được phân tán trong 5% (khối lượng/thể tích) D-manitol, 5mM TRIS và 6mM axit L-lactic.

Các kết quả tính toán kích cỡ hạt của các hạt nano được sản xuất theo ví dụ 4 trên cơ sở phân tích SAXS được thể hiện trên Bảng 3.

Bảng 3: Các kết quả tính toán kích cỡ trung bình của lõi sắt oxit trên cơ sở SAXS analysis

TPC SEQ ID NO.	Kích cỡ trung bình của lõi sắt oxit (nm)	Độ lệch chuẩn (%)
TPC0002 SEQ ID NO.1	9,8	1,1
TPC0003 SEQ ID NO.2	10,0	1,1
TPC0005 SEQ ID NO.3	9,8	1,1

Kích cỡ hạt và phân bố kích cỡ hạt được xác định bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động (DLS). Đường kính thủy động lực học (trị số trung bình theo phương z) và chỉ số đa phân tán được xác định bằng cách sử dụng thiết bị Malvern Zetasizer Nano ZS hoặc thiết bị tương tự theo chế độ đơn phương thức.

Các phép đo này được thực hiện trên hạt nano được sản xuất theo ví dụ 4 được phân tán trong 5% (khối lượng/thể tích) D-manitol, 5mM TRIS và 6mM axit L-lactic.

Các kết quả được thể hiện trên Bảng 4. Các kết quả này cho thấy rằng công thức này làm ổn định hạt và có thể làm giảm tỷ lệ phân rã của các hạt kích cỡ lớn.

Bảng 4: Các kết quả phân bố kích cỡ trên cơ sở phân tích DLS

TPC SEQ ID NO.	Trị số trung bình theo phương z (nm)	D ₁₀ (nm)	D ₅₀ (nm)	D ₉₀ (nm)	Chỉ số đa phân tán (%)
TPC0002 SEQ ID NO.1	23	15,8	24,0	37,6	0,13
TPC0003 SEQ ID NO.2	25	16,8	25,1	39,3	0,17
TPC0005 SEQ ID NO.3	26	16,4	24,9	53,9	0,25

Diện tích bề mặt của hạt được phân tích bằng cách đo thế zeta ở độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 7 (độ pH trong quá trình đo) sử dụng thiết bị Malvern Zetasizer Nano ZS. Các phép đo này được thực hiện trên hạt nano được sản xuất theo ví dụ 4 được phân tán trong 5% (khối lượng/thể tích) D-manitol, 5mM TRIS và 6mM axit L-lactic.

Các kết quả được thể hiện trên Bảng 4.

Bảng 4: Các kết quả đo thế zeta

TPC SEQ ID NO.	Thế zeta (mV)	Độ lệch thế zeta (mV)	Độ dẫn điện (mS/cm)	Chất lượng kết quả
TPC0002 SEQ ID NO.1	-39,5	5,38	1,30	Tốt
TPC0003 SEQ ID NO.2	-39,1	5,95	1,44	Tốt
TPC0005 SEQ ID NO.3	-30,1	4,63	1,42	Tốt

Hàm lượng polyme tổng số được xác định bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký thẩm gel. Peptit được thủy phân, và hạt được phân hủy trong HCl 6M. PMAcOD được chiết xuất bằng etyl axetat sau khi bổ sung EDTA. Sau khi làm bay hơi dung môi, phần cặn được hòa tan lại trong hỗn hợp THF/axit axetic trước khi phân tích.

Các kết quả được thể hiện trên Bảng 5.

Bảng 5: Hàm lượng polyme tổng số

TPC SEQ ID NO.	Hàm lượng polyme tổng số (mg/mL)
TPC0002 SEQ ID NO.1	1,62
TPC0003 SEQ ID NO.2	1,42
TPC0005 SEQ ID NO.3	1,36

Đặc tính quang phổ của hạt nano được xác định bằng phương pháp quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR).

Các thông số được thiết lập của các băng hấp thụ chính được thể hiện trên Bảng 6.

Bảng 6: Mô tả các chế độ dao động hồng ngoại đối với hạt nano

Tần số của các băng hấp thụ (cm^{-1})	Mô tả các chế độ dao động hồng ngoại
3500 - 3000	Rộng, axit carboxylic O-H kéo giãn
2920-2919, 2851-2850	Alkan C-H kéo giãn
1646-1642	C=O kéo giãn, C-N kéo giãn được ghép cặp yếu và N-H kéo giãn
1534-1544	C-N kéo giãn, được ghép cặp mạnh với N-H uốn cong
1402-1395	Axit carboxylic O-H uốn cong
574-569	Liên kết Fe-O

Ví dụ 6: Ảnh hưởng của các kích cỡ khác nhau của polyme lưỡng tính

Ảnh hưởng của các kích cỡ khác nhau của polyme lưỡng tính trong hạt nano theo sáng chế được nghiên cứu. Các SPION được bao bởi các polyme PMAcOD có khối lượng phân tử trung bình số bằng 3100, 4800 và 5900g/mol.

Các polyme này được tổng hợp, tinh chế và xác định đặc tính, sau đó các polyme này được sử dụng trong phản ứng bao các oleat-SPION. Sau khi bao, polyme còn dư được loại bỏ bằng cách sử dụng TFF tinh chế.

a) Tổng hợp poly(axit maleic-*alt*-1-octadecen) (PMAcOD) with khối lượng phân tử khác nhau

Ba chiều dài khác nhau của poly(axit maleic-*alt*-1-octadecen) được tổng hợp bằng phản ứng polyme hóa gốc tự do maleic anhydrit và 1-octadecen. Phản ứng được thực hiện trong 1,4-dioxan bằng cách sử dụng chất hoạt hóa là 2,2'-azobis(2-methylpropionitril). Phản ứng polyme hóa được hoạt hóa bằng cách gia nhiệt hỗn hợp đến nhiệt độ 100°C. Thứ hai, sau khi tinh chế, polyme được thủy phân bằng cách sử dụng dung dịch natri hydroxit để thu được PMAcOD.

Các polyme có khối lượng phân tử cao hơn được tổng hợp bằng cách thực hiện phản ứng polyme hóa trong các điều kiện đậm đặc hơn và/hoặc thực hiện phản ứng polyme hóa với lượng giảm của chất hoạt hóa.

Lượng của các chất phản ứng được sử dụng trong tổng hợp ba polyme này được thể hiện trong Bảng 7.

Bảng 7: Lượng của các chất phản ứng

	Chiều dài (g/mol)	Maleic anhydrit (g)	1-octadecen (g)	AIBN (g)	1,4-dioxan (mL)
PMAcOD3100	3100	4,8	12,36	1,004	40,8
PMAcOD4800	4800	4,8	12,18	0,950	10,0
PMAcOD5900	5900	4,8	12,18	0,500	10,0

Độ tinh khiết của polyme sau khi thủy phân maleic anhydrits và thực hiện phản ứng được đo bằng $^1\text{H-NMR}$ (400 Hz, 30mg mẫu, 10mg chuẩn axit benzoic, 700 μL D-clorofom) và chiều dài của polyme được phân tích bằng phương pháp sắc ký thẩm gel (Agilent PL-gel hỗn hợp-D, 300 x 7,5mm ID, 5 μm , 2mg/mL trong THF/axit axetic (90/10), thời gian chạy mẫu là 15 phút).

b) Ảnh hưởng của các chiều dài khác nhau của polyme lưỡng tính

PMAcOD có các chiều dài khác nhau được sử dụng để bao oleat-SPION.

Thứ nhất, các bước bao được thực hiện bằng cách sử dụng cùng tỷ lệ khối lượng polyme và SPION. Để xác định được các điều kiện bao tốt nhất, tỷ lệ mol polyme và SPION được duy trì không đổi. Lượng của chất kết tụ được so sánh. Phương pháp có ít chất kết tụ nhất được lặp lại, sau đó được tinh chế bằng cách sử dụng phương pháp TFF. Việc loại bỏ polyme và lượng của chất kết tụ được theo dõi trong quy trình TFF bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký loại cỡ (SEC).

Oleat-SPION được bao bởi PMAcOD3100, PMAcOD4800 và PMAcOD5900) để xác định tỷ lệ polyme/SPION tối ưu.

Để bao oleat-SPION, polyme và hạt nano được hòa tan trong clorofom. Sau đó, clorofom được bay hơi. Trong bước cuối cùng của quy trình bao, dung dịch nước natri hydroxit được bổ sung vào bình phản ứng và trộn ở nhiệt độ 50°C. Đối với PMAcOD3100, 100mg polyme được sử dụng. Đối với PMAcOD4800, các bước bao bằng 100mg polyme và 145mg polyme được so sánh. Đối với PMAcOD5900, các bước bao bằng 100mg polyme và 177mg polyme được so sánh. Theo cách thức này, các lượng tương đương của monome được so sánh với các lượng tương đương của các chuỗi polyme so với PMAcOD3100.

Điều kiện dẫn đến lượng của chất kết tụ ít nhất được xác định bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký loại cỡ.

Các kết quả được thể hiện trên Bảng 8.

Bảng 8: Tổng quan các chất kết tụ được sản sinh bởi bước bao các SPION bằng các polyme khác nhau

	Chiều dài (g/mol)	Lượng của polyme (mg)	Đương lượng của polyme so với PMAcOD3100	Chất kết tụ (%)
PMAcOD3100	3100	100	1	5,9
PMAcOD4800	4800	100	0,65	5,2
		145	0,93	5,9
PMAcOD5900	5900	100	0,53	16,0
		177	0,93	7,8

c) Ảnh hưởng các chiều dài polyme khác nhau sau khi tinh chế

Các oleat-SPION được bao bằng cách sử dụng quy trình tương tự như được sử dụng trước đó. Đối với toàn bộ các polyme, lượng tương đương của các chuỗi polyme

được sử dụng. Sau khi bao, các PMAcOD-SPION được tinh chế bằng phương pháp TFF. Do khó loại bỏ các lượng cuối cùng của polyme PMAcOD5900, nên bước bao này bằng 0,15 g polyme (0,79 đương lượng so với thử nghiệm chuẩn bằng PMAcOD3100) cũng được thử nghiệm.

Lượng của chất kết tụ và lượng polyme còn lại trong mẫu được xác định bằng phương pháp sắc ký loại cỡ (SEC). Sau khi bao, PMAcOD3100 chứa 5,9% chất kết tụ, PMAcOD4800 chứa 6,2% chất kết tụ và PMAcOD5900 chứa 10,7% chất kết tụ. Điều này phù hợp với dữ liệu được mô tả trong phần trước đó.

Tiếp theo, các PMAcOD-SPION được tinh chế bằng TFF. Các hạt được nạp lên màng, sau đó các hạt này được rửa bằng 5mM NaOH/45mM NaCl. Mỗi 10 DV (đối với PMAcOD3100) hoặc 20 DV (đối với PMAcO4800 và PMAcOD5900) (DV = thể tích lọc tuần hoàn có pha loãng bằng dung môi trong quy trình tinh chế TFF), mẫu được lấy và đo bằng phương pháp SEC (sau đó). Trong quy trình tinh chế TFF, các mẫu trong quy trình cũng được lấy để theo dõi mức độ giảm lượng của polyme và mức độ tăng lượng của chất kết tụ.

Các kết quả được thể hiện trên Bảng 9.

Bảng 9: Tổng quan các thử nghiệm TFF

Lần chạy mẫu		Lượng của polyme (mg)	Chất kết tụ ở thời điểm bắt đầu (%)	Chất kết tụ sau khi TFF (%)	DV được sử dụng
1	PMAcOD3100	100	5,9	7,0	160
2	PMAcOD4800	100	6,2	7,3	160
3	PMAcOD5900	177	10,7	10,7	150
4		150	10,9	10,4	110

Các sản phẩm TFF của các lần chạy mẫu thứ 1, 2 và 4 được lọc qua bộ lọc 0,2 μ m. Các sản phẩm TFF của lần chạy mẫu thứ 1 cũng được lọc qua bộ lọc 0,1 μ m để giảm lượng của chất kết tụ.

Trước và sau khi lọc các mẫu, các phép đo bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động (DLS) được thực hiện để xác định trị số đường kính trung bình theo phương z và chỉ số đa phân tán (PDI). Toàn bộ các mẻ chứa các SPION được bao bởi PMAcOD thể hiện trị số đường kính trung bình theo phương z nằm trong khoảng từ 26nm đến 28nm và chỉ số đa phân tán nằm trong khoảng từ 0,25 đến 0,33 (xem Bảng 11).

Lượng của sắt được xác định bằng cách sử dụng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS) nằm trong khoảng từ 38mg đến 50mg sau khi lọc, tương ứng với tỷ lệ thu hồi sắt nằm trong khoảng từ 83% đến 110%.

Các kết quả được thể hiện trên Bảng 10.

Bảng 10: Dữ liệu DLS; trước và sau khi lọc.

Lần chạy mẫu	Sản phẩm	Không được lọc		Được lọc			
		Trị số trung bình theo phương z (nm)	PDI	Trị số trung bình theo phương z (nm)	PDI	Hàm lượng sắt (mg)	Tỷ lệ Thu hồi sắt (%)
1	PMAcOD3100 - SPION	31,7	0,382	26,8	0,256	38	83
2	PMAcOD4800 - SPION	28,8	0,360	27,0	0,325	50	110
3	PMAcOD5900 - SPION	32,1	0,367	27,6	0,251	46	101

Ví dụ 7: So sánh hiệu suất tinh chế các PMAcOD-SPION được bao bởi các polyme có khối lượng phân tử khác nhau

Các SPION được bao bởi PMAcOD khối lượng phân tử cao có bán trên thị trường (Mn nằm trong khoảng từ 30000 đến 50000g/mol) và PMAcOD khối lượng phân tử thấp (Mn nằm trong khoảng từ 3000 đến 5000g/mol) được sản xuất như được mô tả trong các ví dụ 1-4. Sau đó, bước tinh chế bằng phương pháp lọc dòng tiếp tuyến (TFF) được sử dụng để loại bỏ vật liệu chưa liên kết. TFF là phương pháp được chọn để tinh chế các SPION được bao do phương pháp này có thể được định quy mô dễ dàng. Phân tích sắc ký loại cỡ (SEC) đối với các mẫu thấm qua màng và các mẫu không thấm qua màng được thực hiện để theo dõi quy trình tinh chế TFF. Hiệu suất tinh chế các SPION được bao bởi polyme khối lượng phân tử cao và polyme khối lượng phân tử thấp bằng cách sử dụng phương pháp TFF được so sánh.

a) Tinh chế PMAcOD-SPION khối lượng phân tử cao

Trong bước thứ nhất, mẫu chứa HM-PMAcOD-SPION thô được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp SEC trước khi tinh chế bằng phương pháp TFF (mẫu thô, xem Fig.9). Mẻ chứa HM-PMAcOD-SPION thô thể hiện phần vai bên trái nhỏ của pic HM-PMAcOD-SPION chính (RT: 15.541), cho thấy rằng mẻ này chứa lượng cực tiểu của

chất kết tụ lớn, chứa 21,2% (a/a) polyme chưa liên kết tự do (RT: 16,698) trong thể phân tán.

Sau đó, mẫu PMAcOD-SPION khối lượng phân tử cao được lọc bằng phương pháp TFF sử dụng màng TFF 300 kDa để phân tách HM-PMAcOD-SPION sau khi polyme bao ra khỏi các phân tử polyme chưa liên kết. Như được thể hiện trên Fig.9 và Fig.10, quá trình phân tách không đạt được nhưng cả HM-PMAcOD-SPION và polyme HM-PMAcOD được chứa trong sản phẩm thấm qua màng sau khi lọc.

Do đó, một số tùy chọn đã được thử nghiệm để đánh giá xem hiệu ứng này có thể được giảm hay không. Tuy nhiên, không thành công. Mức độ lưu giữ của HM-PMAcOD-SPION là quá thấp để thu được quá trình phân tách tốt giữa SPION và polyme mà không làm mất quá nhiều sản phẩm. Màng có kích cỡ lỗ giảm bằng 100 kDa cho phép lưu giữ SPION được bao bởi polyme nhưng đồng thời dẫn đến lưu giữ và tập trung polyme (được thể hiện trên Fig.11).

Tóm lại, đã phát hiện thấy rằng phương pháp lọc bằng màng TFF 300 kDa và phương pháp lọc bằng màng TFF 100 kDa đều cho phép tinh chế HM-PMAcOD-SPION ra khỏi vật liệu HM-PMAcOD chưa liên kết.

b) Tinh chế SPION được bao bởi PMAcOD khối lượng phân tử thấp

Trong phương pháp thứ hai, SPION được bao bởi PMAcOD khối lượng phân tử thấp được tinh chế bằng cách sử dụng phương pháp TFF (màng lọc 100 kDa). Một lần nữa, phân tích sắc ký loại cỡ đối với các mẫu thấm qua màng và các mẫu không thấm qua màng được thực hiện để theo dõi quy trình tinh chế TFF. Các kết quả được thể hiện trên Fig.12 đối với 2 mẻ (các mẻ MX0373A và MX0374A).

Việc sử dụng LM-PMAcOD (M_n nằm trong khoảng từ 3000 đến 5000g/mol) thể hiện quá trình khuếch tán hiệu quả của polyme chưa liên kết qua màng TFF 100 kDa và loại bỏ nhiều hơn 90% polyme chưa liên kết ra khỏi LM-PMAcOD-SPION.

Sắc ký đồ SEC của các sản phẩm sau khi bao (MX0373A và MX0374A), tinh chế bằng phương pháp TFF (màng 100 kDa) (MX0373E và MX0374E) và phương pháp lọc 0,1 μ m cuối cùng (MX0373F và MX0374F) được thể hiện trên Fig.13.

Hơn nữa, dữ liệu SEC của các mẫu sau khi tinh chế bằng phương pháp TFF (màng lọc 100 kDa; các mẻ MX0373E và MX0374E) và sau khi tinh chế bằng phương pháp

TFF, sau đó bằng phương pháp lọc 0,1 μ m (các mẻ MX0373F và MX0374F) được thể hiện trong Bảng 12.

Bảng 12

Sản phẩm	% SPION (a/a)	% Chất kết tụ (a/a)	% Polyme chưa liên kết được loại bỏ
MX0373E	89,0	11,0	80,4
MX0373F	89,5	10,5	
MX0374E	88,7	11,3	78,9
MX0374F	89,2	10,8	

Dữ liệu được cung cấp cho thấy rằng có thể tinh chế hiệu quả LM-PMaOD-SPION bằng phương pháp TFF, trong khi đó bước tinh chế HM- PMaOD-SPION không hiệu quả và không dẫn đến sản phẩm tinh khiết.

Ví dụ 8: Độ an toàn *in-vivo* của các mixen trên cơ sở polyme khối lượng phân tử thấp chứa lõi sắt oxit so với các mixen trên cơ sở polyme khối lượng phân tử cao chứa lõi sắt oxit sau khi tiêm tĩnh mạch vào các chuột nhắt

a) Mẻ MX0194 được sản xuất theo ví dụ 3b được tiêm tĩnh mạch vào các chuột nhắt cái CD1 ở liều lượng bằng 1mmol Fe/kg khối lượng cơ thể và 2mmol Fe/kg khối lượng cơ thể. Một chuột nhắt đã chết sau khi tiêm 2mmol Fe/kg được xác định là mẫu thử nghiệm liên quan. Các chuột nhắt bị giết chết 14 ngày sau khi tiêm. Mức độ gia tăng đáng kể về khối lượng tuyệt đối của cơ quan so với các đối chứng được hiệu chỉnh thích hợp được phát hiện thấy (xem bảng 13) được xác định là tác dụng không mong muốn của mẫu thử nghiệm được tiêm.

b) Mẻ PMaOD-SPION được sản xuất theo ví dụ 3a được tiêm tĩnh mạch vào các chuột nhắt cái CD1 3 lần ở liều lượng bằng 1mmol Fe/kg khối lượng cơ thể (3mmol Fe/kg khối lượng cơ thể tổng số) cách nhau 14 ngày giữa lần tiêm thứ 1 và lần tiêm thứ 2 và lần tiêm thứ 2 và lần tiêm thứ 3. Các chuột nhắt bị giết chết 24 giờ sau lần tiêm cuối cùng. Khối lượng gan chỉ gia tăng một chút nhưng ở mức độ không đáng kể được phát hiện thấy và khối lượng phổi không gia tăng (xem bảng 13).

Mức độ ảnh hưởng đến khối lượng cơ thể bởi hạt nano trên cơ sở polyme khối lượng phân tử cao liên quan đến tác dụng không mong muốn kéo dài của polyme khối lượng phân tử cao do thực tế là lõi sắt là tương tự nhau đối với các mẻ được sản xuất theo ví dụ 8a và ví dụ 8b.

Các kết quả của nghiên cứu so sánh được thể hiện trên Bảng 13.

Bảng 13

	Mức độ gia tăng khối lượng gan [% khối lượng]	Mức độ gia tăng khối lượng phổi [% khối lượng]
Ví dụ 8a 1mmol Fe/kg n=5	17,4*	2,9
Ví dụ 8a 2mmol Fe/kg n=4	25,0**	26,2**
Ví dụ 8b 3mmol Fe/kg n=12	5,7	0,7
Mức độ gia tăng khối lượng cơ quan được tính toán từ khối lượng tuyệt đối của cơ quan là khối lượng tuyệt đối của cơ quan của các động vật đáp ứng tiêu chuẩn khối lượng cơ thể được thể hiện dưới dạng 100%. *p<0,05; **p<0,01 Phân tích Anova một chiều kết hợp phép kiểm định Dunnett		

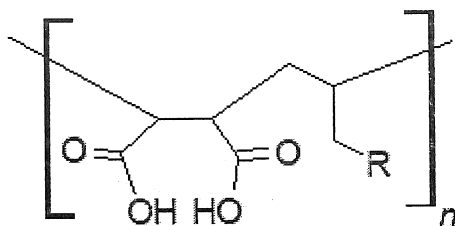
Do đó, polyme khối lượng phân tử thấp có độc tính thấp hơn polyme khối lượng phân tử cao.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> TOPAS THERAPEUTICS GMBH
 <120> HẠT NANO CHỨA POLYME LƯỢNG TÍNH, DƯỢC PHẨM CHỨA HẠT NANO NÀY VÀ PHƯƠNG
 PHÁP SẢN XUẤT HẠT NANO
 <130> P 107928
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Peptit chứa epitop tế bào T
 <400> 1
 Leu Asn Ser Lys Ile Ala Phe Lys Ile Val Ser Gln Glu Pro Ala
 1 5 10 15
 <210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Peptit chứa epitop tế bào T
 <400> 2
 Thr Pro Met Phe Leu Leu Ser Arg Asn Thr Gly Glu Val Arg Thr
 1 5 10 15
 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Peptit chứa epitop tế bào T
 <400> 3
 Arg Glu Gly Ile Ala Phe Arg Pro Ala Ser Lys Thr Phe Thr Val
 1 5 10 15

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hạt nano chứa a) mixen chứa polyme lưỡng tính có khối lượng phân tử trung bình số (M_n) nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol, và b) ít nhất một peptit chứa ít nhất một epitop tế bào T.
2. Hạt nano theo điểm 1, trong đó hạt nano còn chứa lõi kỵ nước dạng rắn được bao ít nhất một phần bởi mixen, trong đó lõi này chứa vật liệu vô cơ có thể theo dõi qua dấu vết được chọn từ nhóm bao gồm sắt oxit, CdSe/CdS/ZnS, bạc và vàng.
3. Hạt nano theo điểm 1 hoặc 2, trong đó peptit được liên kết với phía bên ngoài của mixen.
4. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó polyme lưỡng tính có khung poly-maleic anhydrit thân nước chính có các chuỗi bên alkyl kỵ nước.
5. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó polyme lưỡng tính chứa khối cấu trúc sau



trong đó R là nhóm hydrocarbyl hoặc nhóm hydrocarbyl được thế, tốt hơn nếu R là nhóm C₄-C₂₂ alkyl, tốt hơn nếu nhóm C₈-C₂₀ alkyl.

6. Hạt nano theo điểm 5, trong đó R là nhóm alkyl mạch thẳng, tốt hơn nếu nhóm C₁₁-C₁₇ alkyl mạch thẳng, tốt nhất nếu R là nhóm pentadecyl mạch thẳng.
7. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó polyme lưỡng tính được chọn từ nhóm bao gồm poly(axit maleic-alt-1-octadecen), poly(axit maleic-alt-1-dodecen) và poly(axit maleic-alt-1-tetradecen), tốt hơn nếu polyme này là poly(axit

maleic-alt-1-octadecen), và khối lượng phân tử trung bình số của polyme này nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol.

8. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó peptit được liên kết cộng hóa trị với mixen.

9. Hạt nano theo điểm 8, trong đó peptit được liên kết cộng hóa trị với mixen bằng cách sử dụng phương pháp ghép cặp carbodiimide hoặc succinimide.

10. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó peptit được liên kết không cộng hóa trị.

11. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó peptit chứa từ 9 đến 60 axit amin, tốt hơn nếu peptit chứa từ 10 đến 20 axit amin.

12. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó hạt nano này mang điện âm ở độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 7.

13. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó hạt nano này có đường kính thủy động lực học nằm trong khoảng từ 100nm đến 10nm, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 50nm đến 10nm, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 20nm đến 40nm như được đo bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động.

14. Dược phẩm chứa hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13.

15. Dược phẩm để sử dụng trong ức chế đáp ứng miễn dịch đặc hiệu chứa hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13.

16. Dược phẩm để sử dụng trong ức chế đáp ứng miễn dịch đặc hiệu chứa hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó đáp ứng này liên quan đến bệnh tự miễn, tốt hơn nếu bệnh tự miễn được chọn từ nhóm bao gồm bệnh bong nước, bệnh bong nước vảy lá, bệnh da bong nước dưới biểu bì, bệnh da bong nước toàn thân, bệnh da bong nước tự miễn mạn tính dưới thượng bì, hội chứng Goodpasture, bệnh viêm đa vi mạch, bệnh u hạt đi kèm viêm đa mạch (bệnh u hạt Wegener), ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối, ban xuất huyết giảm tiểu cầu miễn dịch, bệnh viêm màng bồ đào, bệnh viêm màng bồ đào trước cấp tính liên quan đến HLA-B27, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh viêm tủy thị thần kinh, bệnh đái tháo đường typ I, chứng ngủ rũ có hoặc không có mất đột ngột trương lực cơ, bệnh không dung nạp gluten, bệnh viêm da herpetiformis, bệnh đường hô hấp dị ứng/bệnh hen phế quản, bệnh nhược cơ, bệnh viêm tuyến giáp hashimoto, bệnh

tuyến giáp tự miễn, bệnh Graves, bệnh tuyến giáp tự miễn, bệnh suy tuyến cận giáp tự miễn, bệnh tuyến giáp tự miễn, hội chứng kháng phospholipid, bệnh Addison tự miễn, bệnh thiếu máu tán huyết tự miễn, bệnh viêm dây thần kinh hủy myelin mãn tính, bệnh đa dây thần kinh, hội chứng Guillain-Barré, bệnh giảm bạch cầu trung tính tự miễn, bệnh xơ cứng bì thể dải, bệnh Batten, bệnh máu khó đông mắc phải typ A, bệnh viêm đa sụn tái diễn, hội chứng Isaac (bệnh tăng trương lực cơ thần kinh mắc phải), bệnh viêm não Rasmussen, hội chứng Morvan, hội chứng Stiff-person, bệnh thiếu máu ác tính, hội chứng Vogt-Koyanagi-Harada, bệnh xơ gan mật nguyên phát, bệnh viêm gan tự miễn typ I, bệnh viêm gan tự miễn typ II, bệnh lupus ban đỏ hệ thống, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm đa cơ/bệnh viêm da cơ, hội chứng Sjögren, bệnh xơ cứng bì, bệnh bạch biến và rụng tóc từng mảng.

17. Phương pháp sản xuất hạt nano, bao gồm các bước sau: i) điều chế polyme lưỡng tính có khối lượng phân tử trung bình số (M_n) nằm trong khoảng từ 6000 đến 1000g/mol, ii) tùy ý tinh chế polyme lưỡng tính, iii) điều chế mixen chứa polyme lưỡng tính, và iv) bổ sung ít nhất một peptit để thu được hạt nano.

18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó bước i) là bước tổng hợp copolyme hóa gốc, tốt hơn nếu sử dụng chất hoạt hóa gốc là 2,2'-azobis(2-metylpropionitril).

Bao SPION bằng polyme

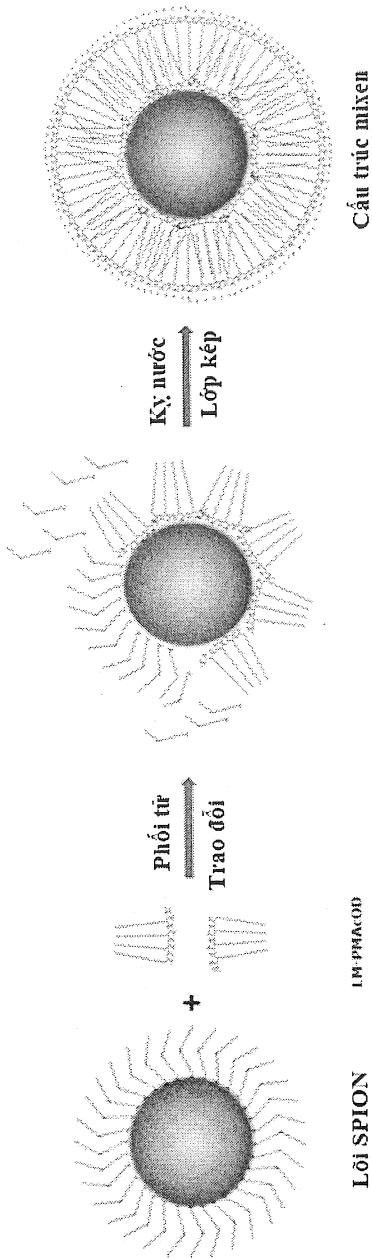
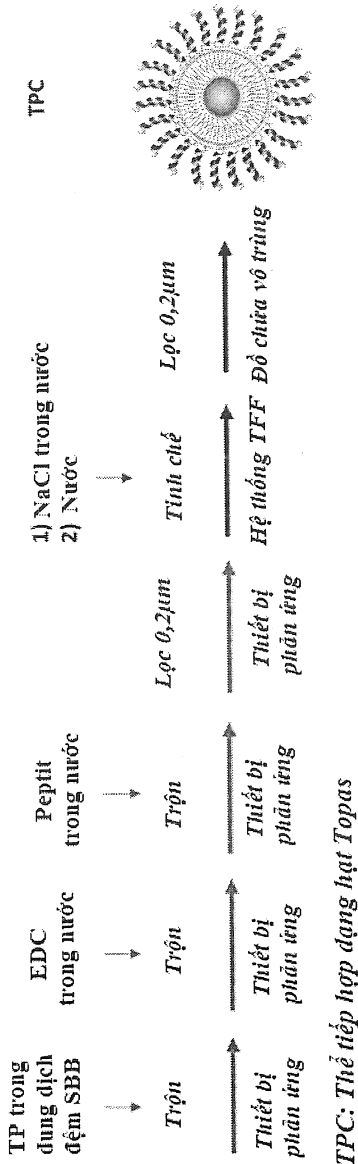


Fig.5

Sơ đồ ghép cặp peptit



TPC: Thẻ tiếp hợp dạng hạt Topas

Fig.6

Ảnh chụp kính hiển vi điện tử truyền qua của hạt nano ở độ phóng đại 100x

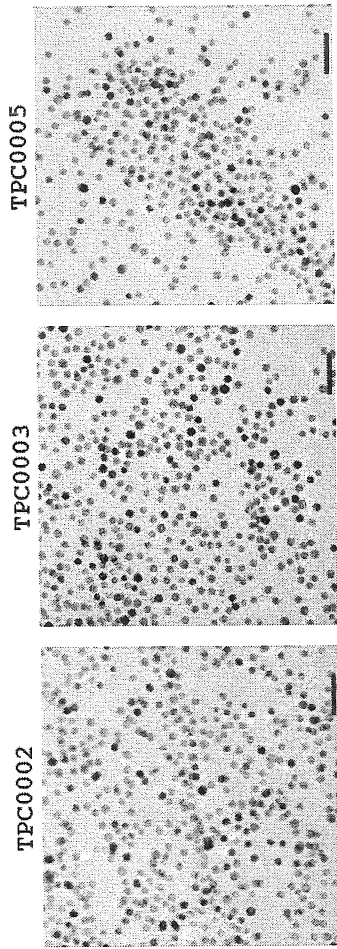


Fig.7

Phân bố khối lượng phân tử của LM-PMACOD

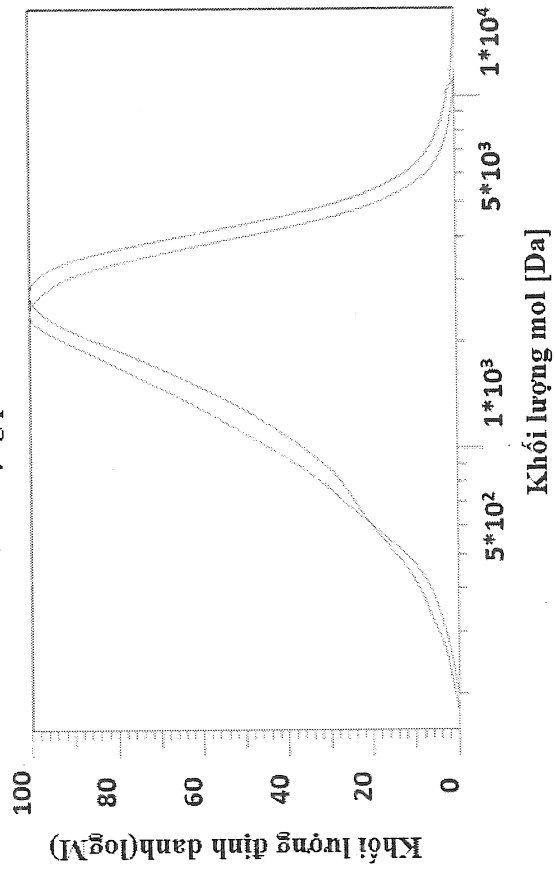


Fig.8

Sắc ký đồ SEC của HM-PMaOD-SPION trước khi tinh chế TFF

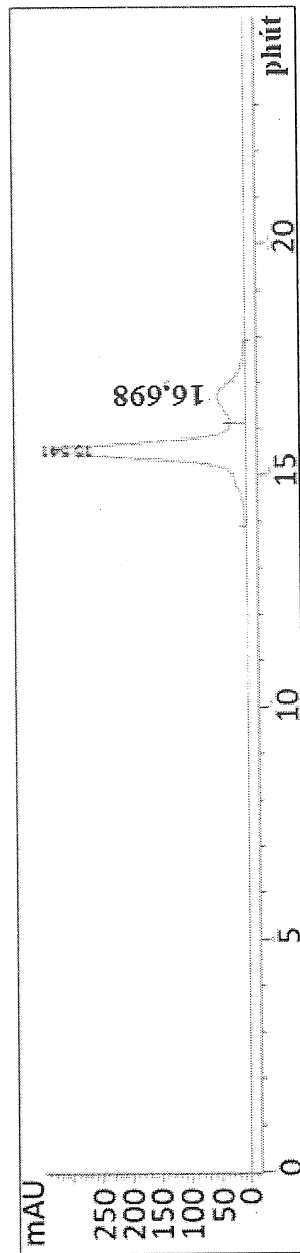


Fig.9

Sắc ký đồ SEC của HM-PMaOD-SPION thẩm qua màng-tinh chế TFF-lỗ màng 300 kDa

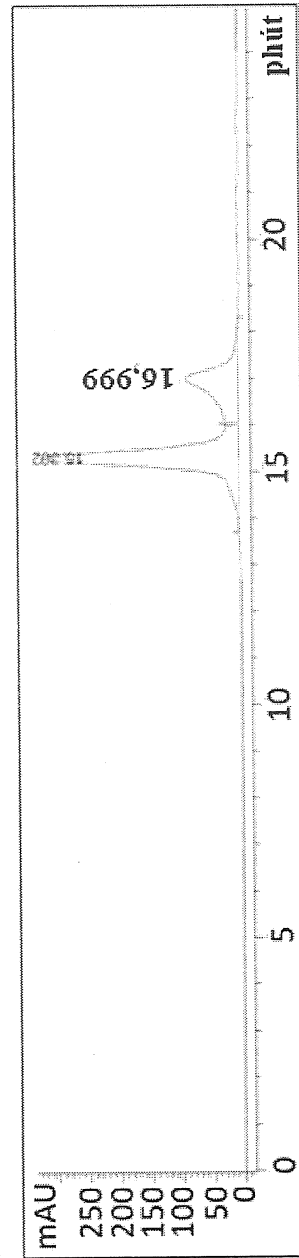


Fig.10

Sắc ký đồ SEC của HM-PMACOD-SPION không thấm qua màng-tinh chế TFF-lỗ màng 100 kDa

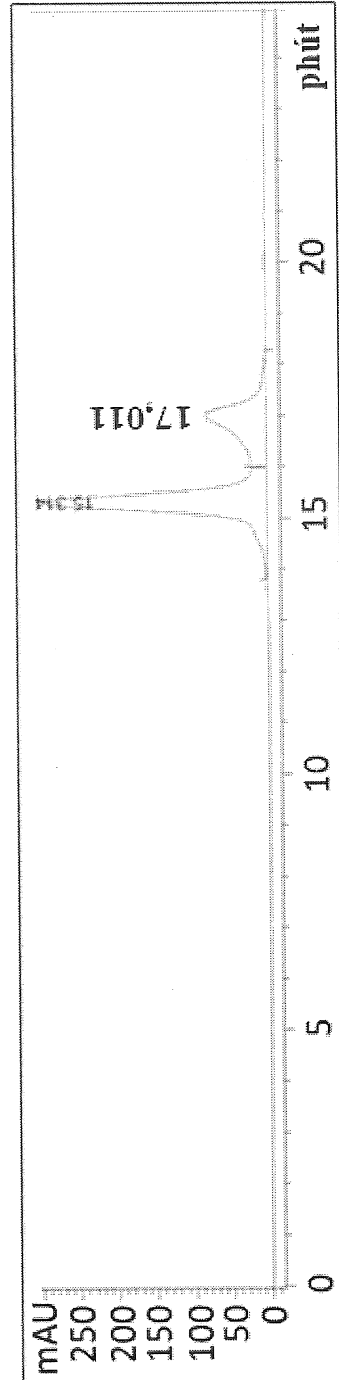


Fig.11

Kết quả phân tích sắc ký loại cỡ tinh chế
SPION được bao bởi PMAcOD khối lượng phân tử thấp

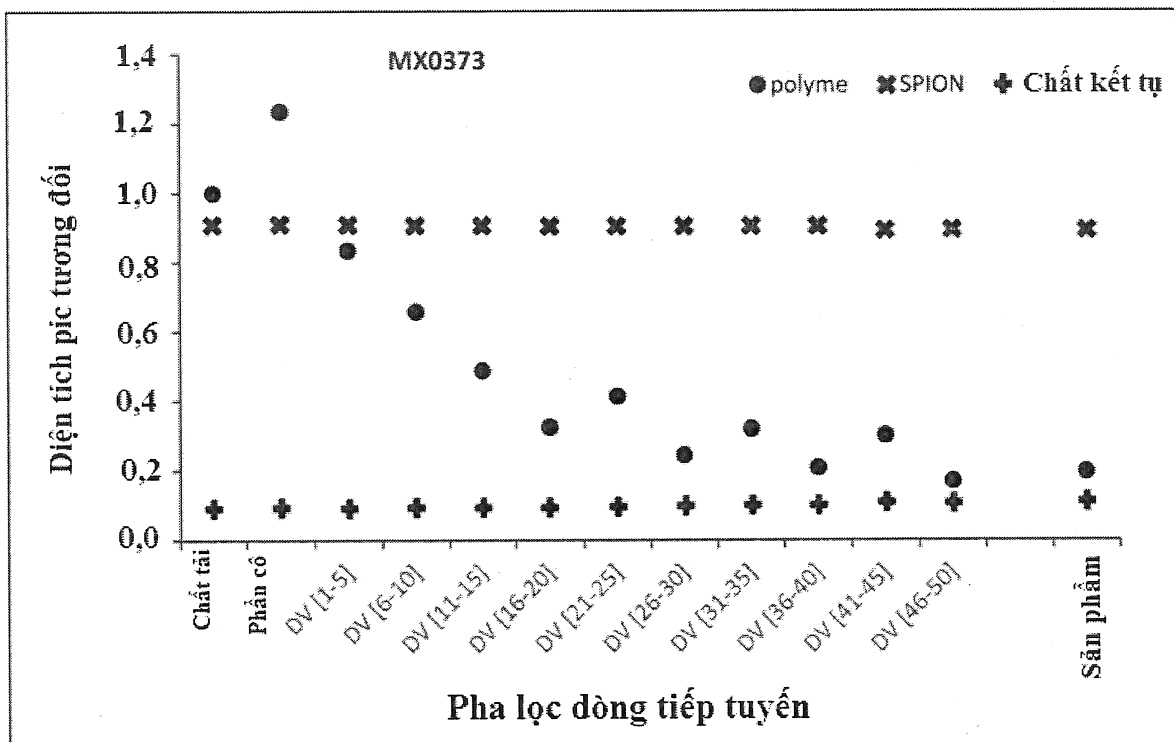
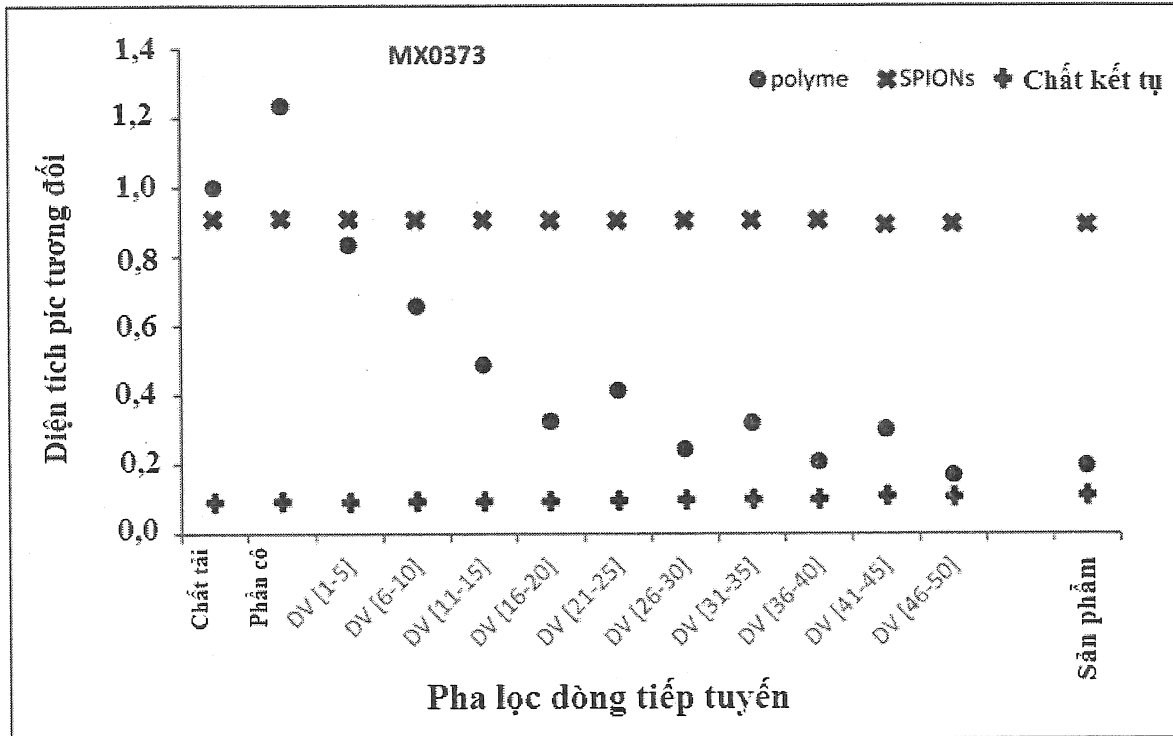


Fig.12

Sắc ký đồ SEC của các sản phẩm sau khi bao (MX0373A và MX0374A), tinh ch
TFF (màng 100 kDa) (MX0373E và MX0374E) và lọc 0,1 μ m cuối cùng
(MX0373F và MX0374F)

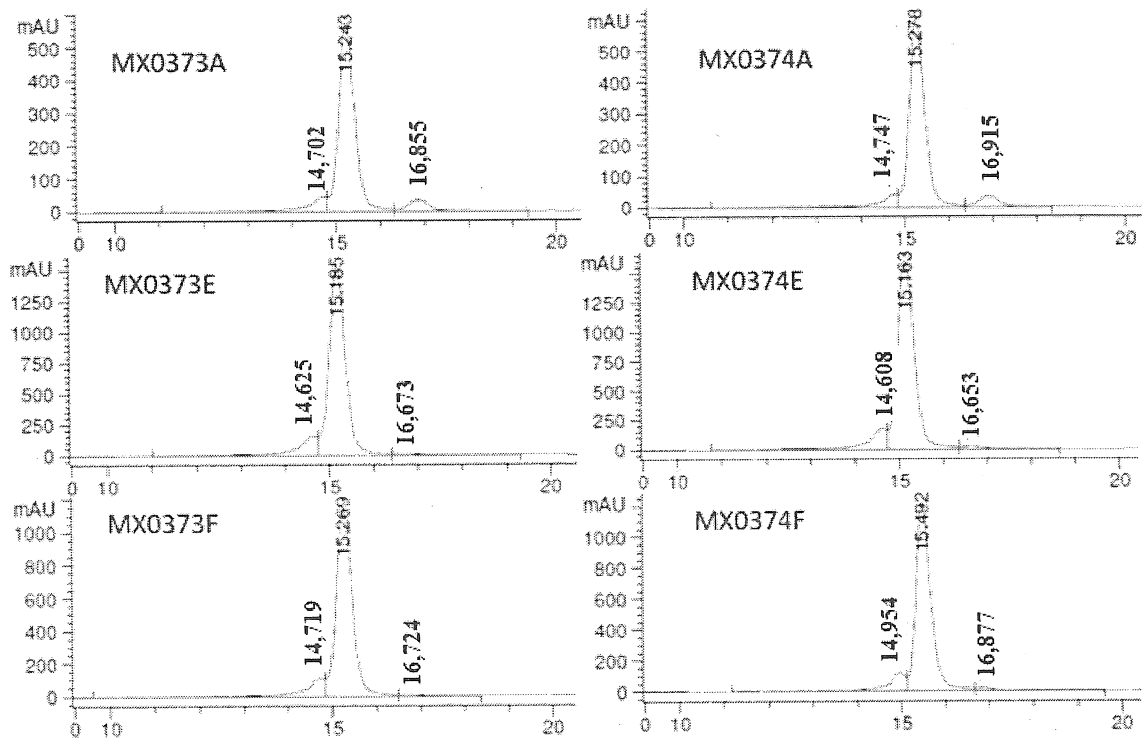


Fig.13