



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11) 
2-0002104

(51)⁷ **A61K 9/51, 47/00**

(13) **Y**

(21) 2-2017-00238

(22) 14.08.2017

(45) 25.09.2019 378

(43) 27.11.2017 356

(73) **VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC - VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG
NGHỆ VIỆT NAM (VN)**

18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Mai Phương (VN), Trần Đại Lâm (VN), Tạ Thị Thu Mai (VN), Nguyễn
Thị Vân Anh (VN)

(54) **QUY TRÌNH CHẾ TẠO CHẾ PHẨM HẠT NANO BỌC ALPHA MANGOSTIN
PHÂN TÁN ĐƯỢC TRONG NƯỚC VÀ CHẾ PHẨM HẠT NANO THU ĐƯỢC TỪ
QUY TRÌNH NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình chế tạo chế phẩm hạt nano bọc alpha mangostin (AMG) bao gồm các bước: a) chuẩn bị pha phân tán có chứa AMG hòa tan trong dung môi thích hợp; b) chuẩn bị dung dịch chất mang: β -cyclodextrin trong nước được phân tán đều trên máy rung siêu âm; c) chuẩn bị dung dịch PEG 400 (polyetylen glycol) được phân tán đều trên máy rung siêu âm; d) tạo dung dịch nanomangostin: Dung dịch AMG/PEG400/ β -cyclodextrin /H₂O theo tỉ lệ xác định; và e) sản phẩm để qua đêm và ly tâm; sản phẩm là hỗn hợp đồng nhất ở dạng lỏng có màu vàng. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm hạt nano thu được từ quy trình này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ nano: chế tạo chế phẩm hạt nano bọc chất có hoạt tính sinh học tự nhiên nhằm tăng khả năng phân tán của chất này trong nước, nhờ đó tăng sinh khả dụng của chất. Cụ thể là đề cập đến quy trình chế tạo hạt nano bọc chất xanthon tự nhiên α -mangostin (AMG) phân tán tốt trong nước để ứng dụng trong điều trị các bệnh liên quan đến biofilm và ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

AMG tồn tại ở dạng bột, khó hòa tan trong nước. Tỷ lệ hòa tan chỉ đạt khoảng 2 μ g/ml (phải dùng dung môi hữu cơ làm chất dẫn). Do vậy khả năng khuếch tán qua màng biofilm hay xâm nhập vào tế bào bị hạn chế, khi xử lý các bệnh liên quan đến biofilm và tế bào như ung thư. Sáng chế này đề cập đến AMG ở dạng nano hóa sử dụng hệ chất mang đơn giản, có khả năng phân tán tốt trong nước, nâng cao khả năng hỗ trợ điều trị bệnh của chất này.

Chế phẩm tạo ra có chứa AMG đã được nano hóa với kích cỡ <200nm và có độ khuếch tán trong nước tăng lên từ 500 - 1000 lần (1-2mg/ml)

Các sáng chế và bài báo mới nhất về nano hóa các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học cao trong và ngoài nước giúp tăng độ tan trong nước có thể kể đến là:

Anitha Krishnan Nair và cộng sự trong US 2011/0229532 A1 đã nêu lên quy trình chế tạo hệ vi nhũ tương của hợp chất thuộc nhóm polyphenol thân dầu bằng cách sử dụng siêu âm với chất hoạt động bề mặt dạng không ion và một dung môi dạng không ion để tăng khả năng hòa tan trong nước.

Bakulesh Mafatlal Khamar và đồng sự trong US 2013/0225689 A1 nêu lên quy trình chế tạo nano curcumin ở dạng lỏng, dạng muối được dùng và các dẫn xuất của curcumin nhằm tăng sinh khả dụng hoặc khả năng ức chế tế bào. Từ đó, khẳng định tác dụng của nano hóa với độ tan của curcumin trong hiệu quả hỗ trợ điều trị.

Pan-In và cộng sự đã tổng hợp thành công hạt nano mang AMG trên chất nền ethyl xenluloza và methyl xenluloza (ECMC) để xử lý *Helicobacter pylori* và *Propionibacterium acnes*. Mặc dù các tác giả đã thu được hạt với hoạt tính sinh học mong muốn nhưng kích thước hạt vẫn tương đối lớn (>500nm) và độ bền của hạt cũng cần được cải thiện để có thể có ứng dụng hiệu quả hơn trong thực tế (Pan-In P et al., 2015, *J Pharmacol Sci.* 129(4): 226-232)

Yao và cộng sự đã thông báo tạo được hạt nano mang AMG sử dụng chất mang là polyethylen glycol– axit polylactic (PEG-PLA) để xử lý bệnh Alzheimer. Các tác giả đã tạo được hạt nano PEG-PLA có kích thước $94,26 \pm 4,54\text{nm}$ và có thế zeta là $-32 \pm 0,43\text{mV}$ với khả năng phân tán đến các cơ quan như não và gan được cải thiện. Các tác giả cho rằng tổng hợp hạt nano mang AMG có thể là cách hữu hiệu cho việc ứng dụng của AMG để xử lý bệnh Alzheimer (Yao L, et al. , 2016, *J Control Release*. 226: 1-14).

Qiu và cộng sự đã tạo được một hệ dẫn nano mới dựa trên hạt vàng. Hệ thống này được thiết kế để mang các chất có hoạt tính nhưng kỵ nước. Hệ thống là một tổ hợp kết hợp của hạt vàng/polyethyleneimin (AuNPs/PEI) và β -cyclodextrin đã sulphat hóa (CD). Các chất cyclodextrin dạng anion được gắn vào các phân tử nano mang điện tích dương bằng các liên kết ion. AMG sau đó được bao gói vào các hạt nano AuNPs/PEI/CD này. Hệ nano kết hợp này có kích thước khoảng 100nm khi xác định dưới kính hiển vi TEM (transmission electron microscopy) và có thế zeta dương ($+30 \pm 3\text{mV}$). Điều thú vị là các nghiên cứu *in vitro* bước đầu cho thấy nó ức chế sự phát triển của các dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt PC-3 và DU145 tốt hơn so với dạng AMG tự do (Qiu S, et al., 2016, *Bioorg Med Chem Lett*. S0960-894X(16)30329-8).

Có thể nhận thấy rằng các dạng hạt nanomangostin tạo được vẫn cần được tiếp tục tối ưu về hệ mang để có cấu trúc đơn giản hơn, khuếch tán tốt trong nước mà vẫn thể hiện được hoạt tính sinh học mong muốn, đặc biệt theo hướng xử lý bệnh biofilm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế này là tạo ra chế phẩm hạt nano bọc AMG (nanomangostin) có khả năng phân tán tốt trong nước, làm tăng sinh khả dụng, tăng khả năng ứng dụng, đồng thời khắc phục được các thiếu sót của các quy trình công nghệ đã biết. Quy trình theo sáng chế bao gồm các bước:

- a) chuẩn bị pha phân tán có chứa AMG hòa tan trong dung môi thích hợp;
- b) chuẩn bị dung dịch chất mang: β -cyclodextrin trong nước được phân tán đều trên máy rung siêu âm;
- c) chuẩn bị dung dịch PEG 400 (polyetylen glycol) được phân tán đều trên máy rung siêu âm;
- d) tạo dung dịch nanomangostin: Dung dịch AMG/PEG400/ β -cyclodextrin /H₂O theo tỉ lệ xác định; và
- e) sau đó sản phẩm để qua đêm và ly tâm; sản phẩm là hỗn hợp đồng nhất ở dạng lỏng có màu vàng.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm hạt nano bọc AMG thu được từ quy trình nêu trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig 1. Công thức của AMG, công thức hóa học: $C_{24}H_{26}O_6$. Khối lượng phân tử: 410.466.

Fig 2. Là sơ đồ quy trình tạo hạt nanomangostin.

Fig 3. Kích thước hạt nanomangostin đo trên máy DLS.

Fig 4. Ảnh FE-SEM của hệ hạt nanomangostin.

Fig 5A. Đường chuẩn định lượng α -mangostin trong các mẫu phân tích.

Fig 5B. Sắc kí đồ HPLC (UV 245 nm) của chất chỉ thị α -mangostin (A) và mẫu nanomangostin (B).

Fig 6. Là biểu đồ thể hiện khả năng ức chế sự hình thành biofilm của vi khuẩn *S. mutans* của hạt nanomangostin (NMG).

Fig 7. Khả năng gây chết tế bào vi khuẩn *S. mutans* trên biofilm của hạt nanomangostin.

Fig 8. Hình thái nhân tế bào khi xử lý với AMG và NMG. Các tế bào ung thư (10^5 tế bào/ml) được xử lý với các chất AMG và NMG. Mẫu được quan sát dưới kính hiển vi Olympus CKX41 ở độ phóng đại 100 X. (A). Đối chứng; (B). Xử lý AMG; (B). Xử lý NMG.

Mô tả chi tiết sáng chế

Quy trình chế tạo chế phẩm hạt nano giữa một hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học cao là AMG với một chất mang polyme β -cyclodextrin và hợp chất hoạt động bề mặt có tính thân nước như PEG 400 bao gồm các bước:

- Chuẩn bị pha phân tán có chứa AMG (độ sạch > 96% của Sigma) 50mg/dung môi etanol (C_2H_5OH) trên máy khuấy từ trong thời gian 2 giờ, tốc độ từ 400 - 500 vòng/phút để tạo thành dung dịch đồng nhất hoàn toàn.
- Chuẩn bị dung dịch chất mang: Dung dịch β -cyclodextrin trong nước theo tỉ lệ 50mg/10ml nước được phân tán đều trên máy khuấy từ trong thời gian 2 giờ, tốc độ khuấy từ 400 - 500 vòng/phút để tạo thành dung dịch đồng nhất hoàn toàn.
- Chuẩn bị dung dịch PEG 400 (Sigma) theo tỉ lệ 0,15ml/10ml dung dịch etanol và nước (tỉ lệ 1:4) được phân tán đều trên máy rung siêu âm trong thời gian 2 giờ, ở nhiệt độ phòng.
- Tạo dung dịch hạt nano: Dung dịch AMG/PEG 400/ β -cyclodextrin/ H_2O theo tỉ lệ 50mg/0,15ml/50mg/10ml được đưa vào thiết bị tạo hạt trong thời gian 3 giờ, ở nhiệt độ phòng.

- e) Thu sản phẩm: sản phẩm sau đó được khuấy qua đêm để loại bỏ dung môi và được ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Sản phẩm là hỗn hợp đồng nhất ở dạng lỏng có nồng độ AMG đạt 1-2 mg/ml.

Bảng 1: Thành phần hệ dung dịch nanomangostin

Đặc tính	Đơn vị	Giá trị
Dạng tồn tại	Lỏng	Dạng dung dịch màu vàng
Tỷ trọng	g/ml	$\geq 1,03$
Kích thước tiểu phần	Nm	< 200
Hàm lượng hỗn hợp AMG	mg/ml	1 - 2
pH		6,5 – 8,0

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Chế tạo hệ nanomangostin theo các chỉ số ở bảng 1

Bảng 2. Thành phần các hợp chất của ví dụ 1

STT	Thành phần	Tỷ lệ	Khối lượng
1	AMG	0,1%	500mg/100ml
2	PEG 400	1,5%	1,5ml/100ml
3	Etanol	96°	120ml
4	β -cyclodextrin	0,1%	500mg/100ml
5	Nước		Vừa đủ 600ml

Tiến hành thử nghiệm điều chế theo quy trình của sáng chế

a) Chuẩn bị pha phân tán có chứa AMG hòa tan trong dung môi thích hợp như etanol (C_2H_5OH) trên máy khuấy từ trong thời gian 2 giờ, tốc độ từ 400-500 vòng/phút để tạo thành dung dịch đồng nhất hoàn toàn.

b) Chuẩn bị dung dịch chất mang: Dung dịch β -cyclodextrin trong nước theo tỉ lệ 500mg/100ml được phân tán đều trong 100ml nước trên máy khuấy từ trong thời gian 2 giờ, tốc độ từ 400 -500 vòng/phút để tạo thành dung dịch đồng nhất hoàn toàn

c) Chuẩn bị dung dịch PEG 400 theo tỉ lệ 1,5ml/100ml dung dịch etanol và nước (tỉ lệ 1:4) được phân tán đều trên máy rung siêu âm trong thời gian 2 giờ, ở nhiệt độ phòng.

d) Tạo dung dịch nano: Dung dịch AMG/PEG 400/ β -cyclodextrin/ H_2O theo tỉ lệ 500mg/1,5ml/500mg/100ml được đưa vào thiết bị tạo hạt trong thời gian 3 giờ, ở nhiệt độ phòng.

e) Thu sản phẩm: Sản phẩm được khuấy qua đêm để đuổi dung môi và được ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Sản phẩm là hỗn hợp đồng nhất ở dạng lỏng có nồng độ AMG đạt 1,2 mg/ml.

Xác định kích thước hạt: Hình thái và kích thước hạt nanomangostin được xác định bằng cách sử dụng kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường FE-SEM (Field Emission Scanning Electron Microscope) (FE-SEM, Hitachi-S4800, Japan).

Xác định độ bền của hạt: Độ bền của hạt nanomangostin được xác định bằng cách đo kích thước của hạt trong dung dịch trong một tháng sử dụng máy Dynamic Light Scattering system (DLS, Zetasizer Ver. 6.20, Malvern Instruments – UK).

Xác định hiệu quả bao gói: Hàm lượng AMG trong sản phẩm cuối cùng được xác định bằng hệ thống sắc ký lỏng kết hợp với khối phổ (Agilent 1260 Single Quadrupole LC/MS System). AMG (Sigma-Aldrich) được sử dụng làm chất chuẩn. AMG chuẩn được hòa tan vào metanol ở nồng độ 1mg/ml sau đó pha loãng trong metanol ở các nồng độ khác nhau để dựng đường chuẩn. Mẫu hạt nanomangostin cũng được chuẩn bị theo cách tương tự. Các dung dịch được trộn đều và lọc qua màng lọc có kích thước 0,45 μ m. Các mẫu này sau đó được phân tích sử dụng máy quang phổ ở bước sóng 245nm. Hàm lượng AMG được xác định sử dụng phương trình hồi quy xác định từ mẫu AMG chuẩn.

Sản phẩm tạo thành được kiểm tra bằng các phương pháp phân tích hiện đại đã thu các kết quả như sau:

- ĐDLS kiểm tra kích thước hạt và độ phân tán PDI

Kết quả phân tích DLS cho 1 peak duy nhất, hoàn toàn không có sự kết khối, tạo ra các tập hợp hạt ở vùng kích thước lớn hơn, với giá trị PDI đạt 0,11, khẳng định các tiểu phân nano phân tán đồng đều, kích thước hạt tập trung trong khoảng 142nm (Fig. 3)

- Đo FE-SEM kiểm tra hình ảnh và kích thước hạt

Ảnh FE-SEM cho ta thấy các tiểu phân được nano hóa có dạng cầu, nằm phân bố đều, có kích thước khoảng > 100nm, hoàn toàn phù hợp với kết quả DLS trình bày ở trên (Fig 4).

- Đo độ bền của hạt

Bảng 3. Kích thước hạt nanomangostin sau 1 tháng theo dõi

TT	Kích thước (nm)	Cảm quan
1	146	Màu vàng nhạt, không đục
2	141	Màu vàng nhạt, không đục
3	152	Màu vàng nhạt, không đục
4	148	Màu vàng nhạt, không đục

Xác định hiệu quả bao gói:

Hàm lượng AMG của hạt được xác định sử dụng phương pháp HPLC cho thấy có đỉnh trùng với AMG chuẩn (Fig. 5A). Dựa vào đường chuẩn (Fig. 5B) xác định được hàm lượng AMG trong dung dịch NMG là 1,08 mg/ml. Hiệu suất bao gói đạt 72%.

Ví dụ 2. Đánh giá tác dụng ức chế sự hình thành biofilm của vi khuẩn *S. mutans*

Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy các vi sinh vật sống trên biofilm (biofilm cells) thường có khả năng chống chịu các chất kháng khuẩn cao hơn so với các tế bào sống tự do (planktonic cells). Việc loại bỏ các biofilm bằng con đường truyền thống sử dụng kháng sinh là không hiện thực vì tính chống chịu cao của các tế bào trên biofilm. Sự thích nghi cao về trao đổi chất của các tế bào này với kiểu sống trên biofilm và hơn thế nữa, có thể làm xuất hiện những chủng vi khuẩn kháng kháng sinh. Như vậy, kiểm soát các bệnh gây ra do biofilm, trong đó có bệnh sâu răng, hiện nay đang tập trung vào việc tìm kiếm những chất kháng khuẩn có khả năng làm tổn thương hay can thiệp vào sự hình thành biofilm của vi khuẩn gây bệnh là các chiến lược hữu hiệu. Đánh giá ảnh hưởng của NMG so với AMG lên sự hình thành biofilm được thực hiện thông qua việc nghiên cứu ảnh hưởng của nó lên sinh khối của biofilm của vi khuẩn gây sâu răng chủ yếu ở người là *Streptococcus mutans*. Sinh khối biofilm (EPS) của *S. mutans* trên các đĩa nuôi cấy plastic 96 giếng đã được thu lại để xác định trọng lượng khô và so sánh với mẫu đối chứng sử dụng thuốc nhuộm 1% leuco crystal violet (LCV) và đo độ hấp thụ ở bước sóng 595nm. Kết quả thu được cho thấy khi xử lý với NMG và AMG 150µM sinh khối biofilm (polysaccharit ngoại bào) giảm 54% và 27%, theo thứ tự (Fig. 6). Như vậy, NMG ức chế sự sinh tổng hợp exopolysaccharit (EPS) ngoại bào.

Ví dụ 3: Đánh giá tác dụng giết tế bào vi khuẩn *S. mutans* trên biofilm

Biofilm sau 24 giờ phát triển ở điều kiện không xử lý và có xử lý với AMG 150µM và NMG 150µM đã được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang đồng tụ quét laser (Olympus, Tokyo, Japan) sử dụng thuốc nhuộm huỳnh quang LIVE/DEAD

BacLight (50:50 thể tích/thể tích) và quan sát tế bào sống (màu xanh) và tế bào chết (màu đỏ). Hình ảnh biofilm thu được cho thấy cả AMG và NMG đều gây chết mạnh tế bào so với đối chứng (Fig.7).

Như vậy, hạt nanopolyme bọc AMG có khả năng phân tán trong nước và thể hiện được hoạt tính kháng biofilm giống như AMG chưa được nano hóa. Kết quả này cho thấy triển vọng của việc ứng dụng hạt nanomagostin trong xử lý các bệnh liên quan đến biofilm.

Ví dụ 4: NMG làm thay đổi hình thái nhân tế bào ung thu phổi A₅₄₉

Quan sát hình thái nhân, ở mẫu xử lý chất AMG, hình thái nhân không có nhiều khác biệt so với mẫu đối chứng. Nhưng ở mẫu tế bào có xử lý hoạt chất NMG thì nhân tế bào to hơn nhiều so với đối chứng (Fig. 8).

Những hiệu quả đạt được của sáng chế

Hệ nanomagostin có chứa các tiểu phân nano α -mangostin, với nồng độ AMG đạt trong khoảng từ 1-2mg/ml với kích thước tiểu phân trong khoảng $< 200\text{nm}$; giá trị PDI đạt 0,12; có độ ổn định cao tại độ pH 7 trong thời gian dài (1 tháng), đáp ứng yêu cầu của quá trình vận chuyển các hạt tiểu phân AMG tới đích mong muốn. Hoạt tính kháng biofilm và kháng tế bào ung thư *in vitro* của hạt nanomagostin được thể hiện tương đương với dạng AMG chưa nano hóa tan trong dung môi hữu cơ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chế tạo chế phẩm hạt nano bọc alpha mangostin (AMG) bao gồm các bước:

a) chuẩn bị pha phân tán có chứa AMG hòa tan trong dung môi etanol (C_2H_5OH) trên máy khuấy từ trong thời gian 2 giờ, tốc độ từ 400 -500 vòng/phút để tạo thành dung dịch đồng nhất hoàn toàn;

b) chuẩn bị dung dịch chất mang: dung dịch β -cyclodextrin trong nước theo tỉ lệ 500mg/100ml được phân tán đều trong 100ml nước trên máy khuấy từ trong thời gian 2 giờ, tốc độ từ 400 -500 vòng/phút để tạo thành dung dịch đồng nhất hoàn toàn;

c) chuẩn bị dung dịch PEG 400 theo tỉ lệ 1,5ml/100ml dung dịch etanol và nước (tỉ lệ 1:4) được phân tán đều trên máy rung siêu âm trong thời gian 2 giờ, ở nhiệt độ phòng;

d) tạo dung dịch nano: dung dịch AMG/PEG 400/ β -cyclodextrin/ H_2O theo tỉ lệ 500mg/1,5ml/500mg/100ml được đưa vào thiết bị tạo hạt trong thời gian 3 giờ, ở nhiệt độ phòng; và

e) thu sản phẩm: sản phẩm được khuấy qua đệm để đuổi dung môi và được ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút; Sản phẩm là hỗn hợp đồng nhất ở dạng lỏng có nồng độ AMG đạt > 1,0 mg/ml.

2. Chế phẩm hạt nano thu được từ quy trình theo điểm 1.

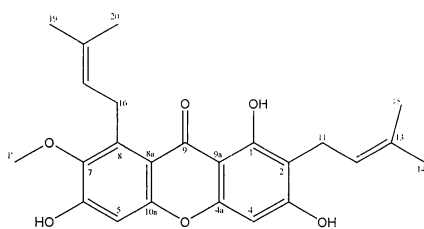


Fig. 1

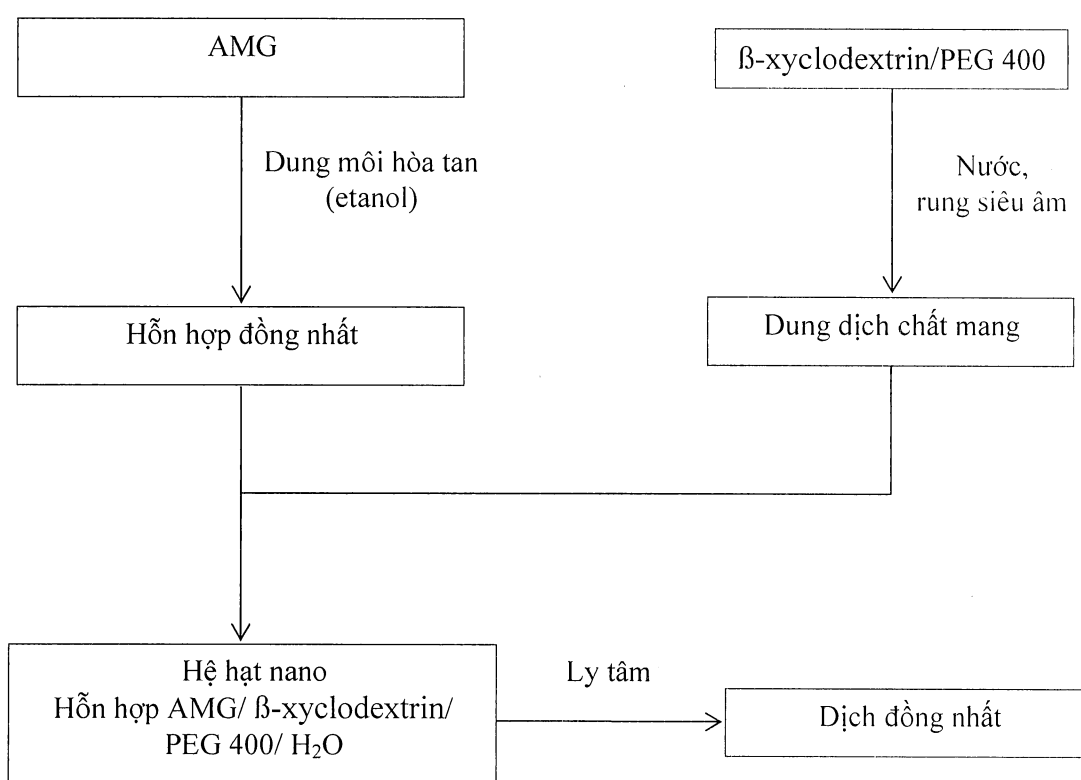


Fig. 2

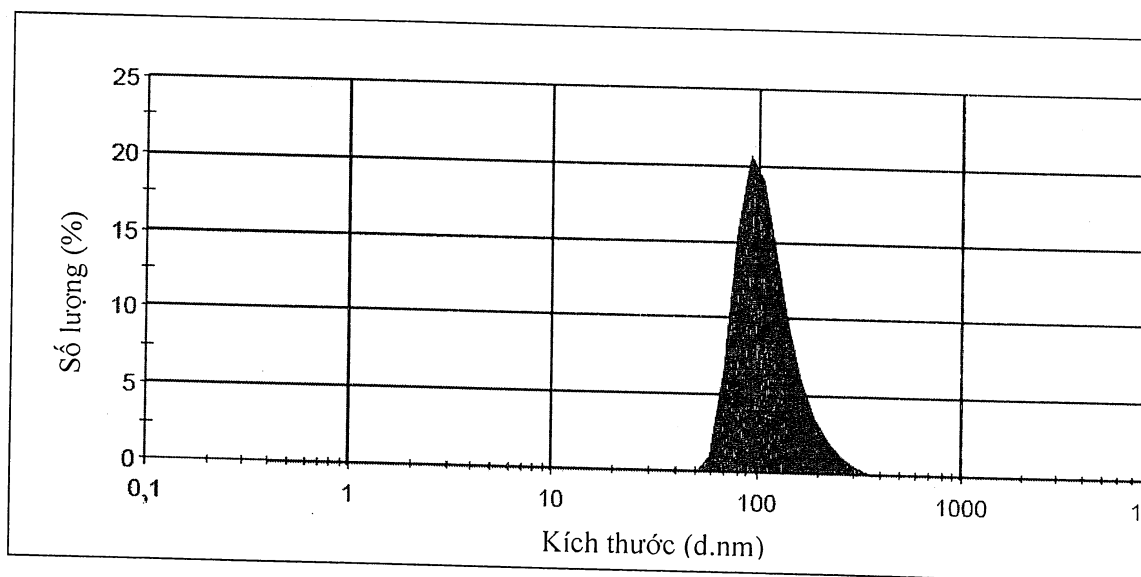


Fig. 3

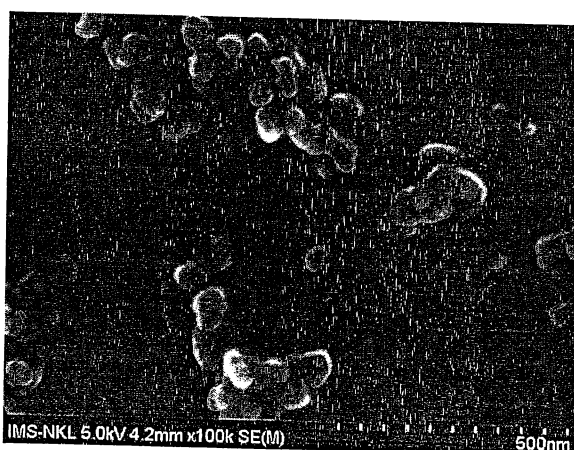


Fig. 4

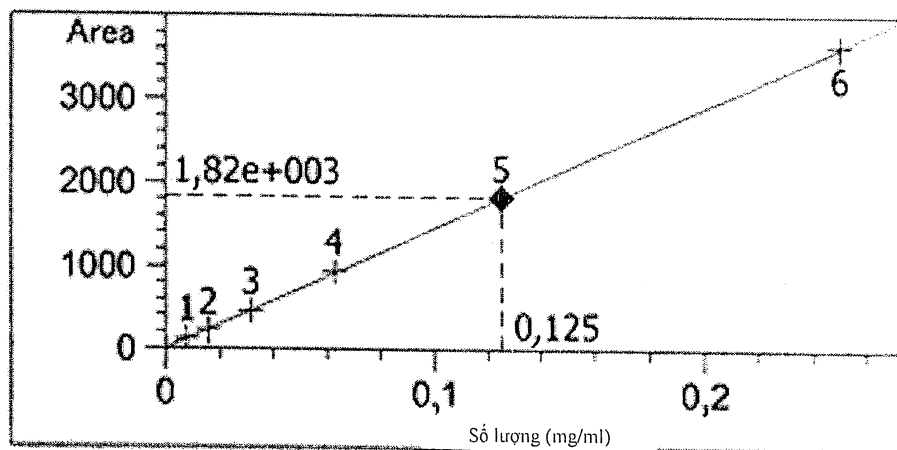


Fig. 5A

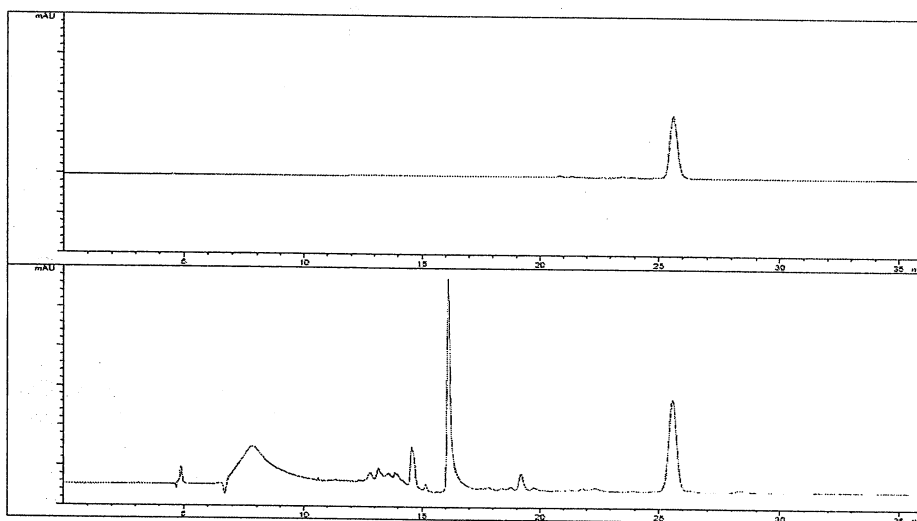


Fig. 5B

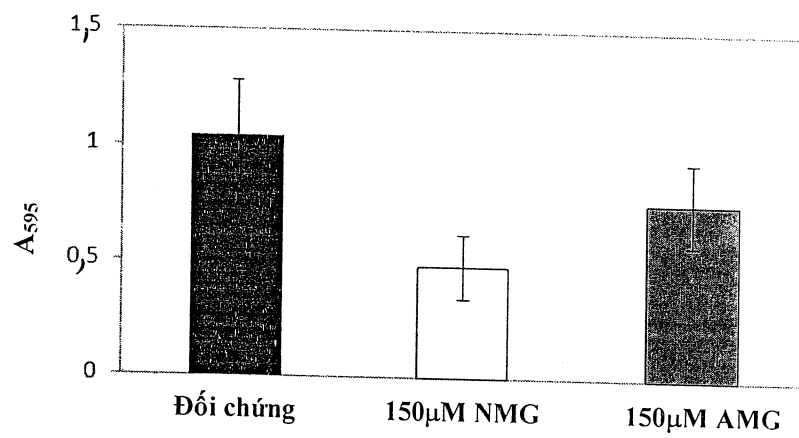


Fig. 6

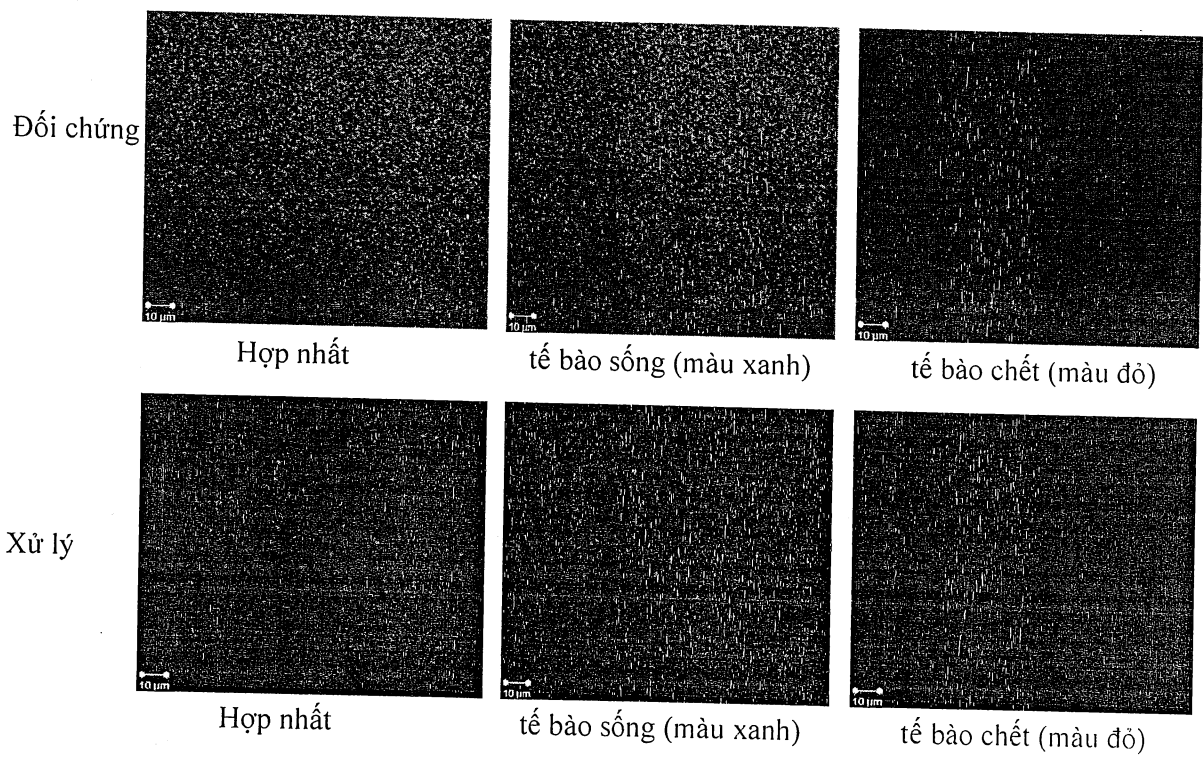
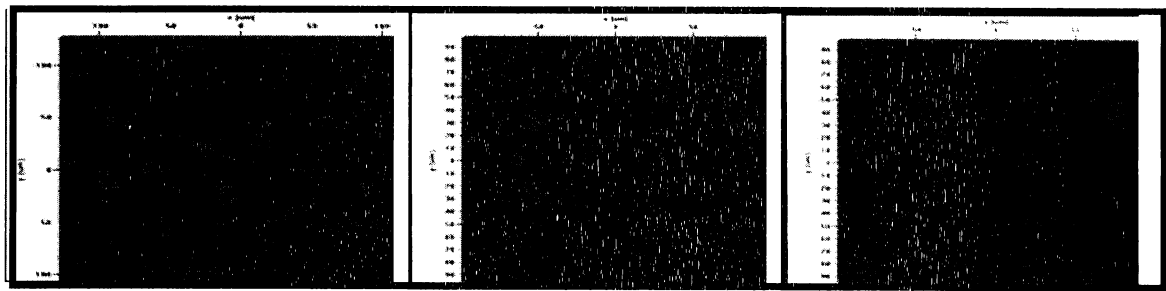


Fig. 7



A

B

C

Fig. 8