



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

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



1-0039367

(51)<sup>2020.01</sup> A61L 27/52; C08B 37/00 (13) B

(21) 1-2021-01465 (22) 19/03/2021  
(45) 25/04/2024 433 (43) 26/07/2021 400  
(73) Sở Khoa học và Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh (VN)  
244 Điện Biên Phủ, phường 7, quận 3, thành phố Hồ Chí Minh  
(72) Đặng Thị Lệ Hằng (VN); Trần Ngọc Quyên (VN).

(54) QUY TRÌNH TỔNG HỢP HYDROGEL NHẠY NHIỆT TỪ VẬT LIỆU ALGINAT-CYS-PLURONIC

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình tổng hợp hydrogel nhạy nhiệt từ vật liệu alginat-cys-pluronic. Vật liệu alginat-cys-pluronic này tạo hydrogel hình thành nhờ sự thay đổi nhiệt độ, không cần có sự bổ sung của chất kết dính hoặc chất tạo liên kết ngang. Cụ thể, sáng chế đề cập đến quy trình tổng hợp hydrogel nhạy nhiệt từ vật liệu alginat-cys-pluronic, bao gồm các bước: (i) tạo dẫn xuất alginat với cystamin thông qua phản ứng amit hóa, (ii) hoạt hóa nhóm hydroxyl OH trên mạch pluronic (công thức:  $\text{HO}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_x[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_y[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_x\text{H}$ , trong đó  $x= 2-100$ ,  $y= 70-100$ ) với chloroformate R-COOC1 (R là mạch carbon), (iii) sau đó vật liệu alginat-cys-pluronic được tổng hợp từ bước (i) và (ii) trên thông qua phản ứng tạo liên kết uretan, (iv) sản phẩm ở bước (iii) hòa tan vào môi trường nước hoặc đệm sinh lý (PBS, pH 7,4) để thu được hydrogel.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực hóa ứng dụng, cụ thể đề cập đến quy trình tổng hợp hydrogel nhạy nhiệt từ vật liệu alginat-cys-pluronic, ứng dụng trong lĩnh vực y sinh.

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong lĩnh vực y học tái tạo, vật liệu sinh học đang trở thành một xu hướng chính trong những năm gần đây nhờ những ưu điểm vượt trội so với các kỹ thuật ghép mô đồng loại hoặc thay thế mô đồng loại. Sự phát triển của các vật liệu sinh học không những giải quyết vấn đề nguồn cung, mà còn giải quyết các vấn đề liên quan đến thái ghép và khả năng mắc các bệnh lây nhiễm do sử dụng nguồn mô đồng loại. Trong những năm gần đây, rất nhiều vật liệu sinh học polyme có nguồn gốc tự nhiên hoặc từ các polyme dẫn xuất của nó được giới thiệu. Nguồn polyme thiên nhiên rất nhiều trong tự nhiên và có các đặc tính sinh học như khả năng mô phỏng đặc tính sinh học của mô, tính tương hợp sinh học, tương hợp mô, phân hủy được trong môi trường sinh học và giảm thiểu giá thành liên quan đến tinh chế. Hầu hết các vật liệu sinh học được tổng hợp trên cơ sở các polyme tự nhiên như chitosan (có nguồn gốc từ động vật giáp xác), gelatin (có nguồn gốc từ da động vật), collagen (có nguồn gốc từ động vật), xenluloza (có nguồn gốc từ thực vật), dextran (có nguồn gốc từ vi sinh vật), chondroitin sulfat (có nguồn gốc từ sụn), alginat (có nguồn gốc từ thực vật), v.v..

Vật liệu sinh học alginat rất được quan tâm trong những nghiên cứu thuộc lĩnh vực tái tạo mô. Alginat được làm từ axit alginic - hợp chất có nhiều trong tảo nâu (*Laminaria spp*). Polyme này hình thành cấu trúc mạng lưới 3D dễ dàng nhờ sự tham gia của các cation hóa trị hai như  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ . Các gel hình thành từ alginat và các cation hóa trị hai cho thấy khả năng hấp thụ tốt. Bên cạnh đó, alginat hydrogel còn cho thấy khả năng cầm máu thông qua cơ chế kích hoạt tiểu cầu nhờ tương tác trao đổi ion. Do đó, trên thị trường có nhiều vật liệu y sinh sử dụng alginat trong lĩnh vực tái tạo vết thương như Algicell<sup>TM</sup> (alginat và bạc), Fibracol<sup>TM</sup>Plus (alginat và collagen) hay Tromboguard (alginat, chitosan, polyuretán và bạc). Tuy nhiên, sự hình thành gel này

rất khó để kiểm soát vì sự trao đổi ion với môi trường sinh lý, dẫn đến quá trình phân rã nhanh và mất đi đặc tính của cấu trúc hydrogel.

Để khắc phục nhược điểm này, vật liệu alginat thường được dùng kết hợp với poly-L-Lysin, poly-L-ornithin hoặc biến tính với các polyme khác thông qua các phản ứng hóa học để làm tăng cường tính ổn định của alginat dạng gel trong môi trường sinh lý. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu đều cho thấy sử dụng poly-L-Lysin, poly-L-ornithin hoặc poly(metylen guanidin) đều làm giảm tính kết hợp sinh học của vật liệu và đòi hỏi quá trình phức tạp khi sử dụng các môi trường tổng hợp không thân thiện như pyridine và các điều kiện khắc khe khi phản ứng. Để làm tăng tính thân thiện, Redouran Mahous đã tạo ra dẫn xuất của alginat bằng cách gắn phân tử  $\alpha$ -amin- $\omega$ -thiol-poly(etylen glycol) lên các nhóm carboxylat của mạch alginat. Nhưng phương án này vẫn sử dụng  $\text{Ca}^{2+}$  làm cầu nối tạo cấu trúc 3D cho vật liệu. Sử dụng tác nhân  $\text{Ca}^{2+}$  tạo gel cho vật liệu alginat còn được ghi nhận bởi tính đồng đều thấp. Một phương án khác được trình bày trong Bằng độc quyền sáng chế CN102417734B và trong đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền giải pháp hữu ích số 2-2016-00005, đó là oxi hóa alginat và cho phản ứng với gelatin. Sau khi oxi hóa alginat, nhóm axit cacboxylic (COOH) trên alginat chuyển thành nhóm anđehit (HCO), và nhóm này dễ dàng phản ứng với nhóm amino ( $\text{NH}_2$ ) có trên mạch của gelatin. Vật liệu alginat này tạo gel phụ thuộc vào phản ứng oxi hóa alginat. Thực tế, quy trình oxi hóa alginat có nhược điểm trong quá trình khống chế thời gian thực hiện thí nghiệm, yêu cầu cao về môi trường thực hiện phản ứng, đặc biệt là quá trình loại bỏ chất oxi hóa dư. Bên cạnh đó, hydrogel từ sản phẩm này thường bị axit hóa, nghĩa là sản phẩm dễ tạo môi trường axit nếu thời gian lưu trữ trên 1 tháng gây các phản ứng miễn dịch không mong muốn.

Hướng tiếp cận thông qua tạo vật liệu alginat có tính chất nhạy cảm với các đáp ứng bên ngoài, đặc biệt nhiệt độ cho thấy hiệu quả vượt trội. Thông qua sự thay đổi của nhiệt độ dung dịch alginat biến tính này tự động tạo các cầu nối hình thành mạng lưới cấu trúc hydrogel, hoặc mạng lưới cấu trúc bị phá vỡ khi nhiệt độ thay đổi tạo nên vật liệu thú vị và có tính ứng dụng cao trong lĩnh vực y sinh. Phương án thường gặp là trộn muối natri alginat với các polyme nhạy nhiệt. Công bố đơn sáng chế số CN102796267A, muối natri alginat được trộn với polyme có tính nhạy nhiệt như N-

isopropyl acrylamit, carrageeni, v.v.. Trong sáng chế này, nhóm tác giả cho muối natri alginat đầu tiên được trộn vào nền gel chính được tạo ra từ polyalcol với nồng độ từ 1-10wt% (theo khối lượng), sau đó 0,25-5wt% polyme nhạy nhiệt được hòa vào cộng với các yếu tố phụ trợ như chất giải phóng axit (Acid-releasing agent), muối vô cơ như muối của canxi, và chất kết dính. Tuy nhiên, vật liệu này rất dễ bị tách pha nếu điều kiện bảo quản không đúng như trong sáng chế đã đề cập.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế đề xuất quy trình tổng hợp hydrogel nhạy nhiệt từ vật liệu alginat-cys-pluronic nhằm khắc phục các hạn chế về hệ hydrogel từ alginat đã được nêu trên. Nhóm tác giả nghiên cứu theo hướng tạo ra hydrogel nhạy nhiệt từ vật liệu alginat. Theo nhóm tác giả, việc sử dụng phương pháp trộn, đòi hỏi phải có vật liệu hydrogel làm nền và khó đạt được sự đồng nhất do muối alginat khó tan trong môi trường phân cực và có độ nhớt rất cao khiến cho quá trình tách pha dễ xảy ra trong quá trình tổng hợp. Do đó, nhóm tác giả nghiên cứu về biến tính alginat với polyme nhạy nhiệt như pluronic, poly(N-isopropyl acrylamit), poly(etylen glycol)-poly(3-caprolacton)-poly(etylen glycol), hoặc poly(d,l-lactit)-block poly(etylen glycol)-block-poly(d,l-lactit) (PDLLA-PEG-PDLLA) thông qua phương pháp hóa học sẽ tạo được hệ hydrogel khắc phục toàn bộ nhược điểm của phương pháp trộn. Trong tất cả các polyme nhạy nhiệt, pluronic cho thấy tiềm năng ứng dụng cao nhất bao gồm về tính an toàn sinh học (pluronic được Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm (FDA) Hoa Kỳ cho phép sử dụng trong dược phẩm) và giá thành nguyên liệu thấp. Để có thể gắn pluronic lên mạch alginat, phân tử cystamin (2,2'-dithiobisetanamin) được lựa chọn để làm cầu nối, đồng thời làm tăng tính ứng dụng cho hệ hydrogel này như tính bám dính và khả năng kháng khuẩn. Kết quả bước đầu đã tạo được vật liệu alginat-cys-pluronic và hệ hydrogel nhạy nhiệt từ hợp chất này. Vật liệu này không chỉ có thể tạo hydrogel khi dung dịch tiếp xúc với nhiệt độ trên 30°C và trở về dạng dung dịch khi nhiệt độ dưới 20°C, vật liệu còn có tính tương hợp sinh học cao, khả năng giữ nước tốt, và có thể sử dụng làm giá đỡ trong nuôi cấy tế bào.

Cụ thể sáng chế đề cập đến quy trình tổng hợp hydrogel nhạy nhiệt từ vật liệu alginat-cys-pluronic. Cụ thể, vật liệu được tạo ra từ ba nguyên liệu chính là muối natri

alginat, cystamin và pluronic thông qua liên kết uretan (-NHC(=O)O-). Để đạt được mục đích trên, sáng chế đề xuất vật liệu alginat-cys-pluronic được tổng hợp theo các bước như sau: (i) tạo dẫn xuất alginat với cystamin thông qua phản ứng amit hóa, (ii) hoạt hóa nhóm hydroxyl OH trên mạch pluronic (công thức:  $\text{HO}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_x[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_y[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_x\text{H}$ , trong đó  $x= 2-100$ ,  $y= 70-100$ ) với clorofomat R-COOCl (R là mạch carbon), (iii) sau đó vật liệu alginat-cys-pluronic được tổng hợp từ (i) và (ii) trên thông qua phản ứng tạo liên kết uretan, (iv) sản phẩm ở bước (iii) hòa tan vào môi trường nước hoặc đệm sinh lý (PBS, pH 7,4) để thu được hydrogel.

Vật liệu alginat-cys-pluronic tổng hợp theo sáng chế này tạo gel nhờ sự thay đổi của nhiệt độ, không cần bổ sung thêm các ion hóa trị hai. Thêm vào đó, vật liệu này tạo được gel trong môi trường nước hoặc môi trường đệm sinh lý như PBS thích hợp cho việc phát triển thành khung xương cho liệu pháp tế bào gốc.

Vật liệu theo sáng chế này tạo được gel ở nhiệt độ trên  $30^\circ\text{C}$  và chuyển về trạng thái dung dịch khi nhiệt độ hạ xuống dưới  $20^\circ\text{C}$ , đặc biệt thích hợp với các ứng dụng trong lĩnh vực tái tạo mô.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là phổ  $^1\text{H-NMR}$  của vật liệu alginat-cys-pluronic

Hình 2: (A) - Hydrogel được tạo từ vật liệu alginat-cys-pluronic, (B) - cấu trúc hydrogel từ vật liệu alginat-cys-pluronic, (C) - nhiệt độ chuyển pha của vật liệu alginat-cys-pluronic.

Hình 3 là hình ảnh nguyên bào sợi mọc ra từ mảnh mô khi nuôi cấy trên đĩa phủ gel alginat nhạy nhiệt.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất quy trình tổng hợp hydrogel nhạy nhiệt từ vật liệu alginat –cys-pluronic bao gồm các bước sau:

i) Natri alginat được hòa tan trong hỗn hợp dimetyl sulfoxit (DMSO): nước (tỷ lệ 1:1 theo thể tích), pH khoảng 6,0-6,5. Sau khi natri alginat tan hoàn toàn, dung dịch được giữ trong môi trường nhiệt độ lạnh (dưới 15°C). 1-etyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimite (EDC) và N-hydroxysuccinimide (NHS) hòa tan trong nước ở 2 cốc riêng biệt. Dung dịch EDC được cho vào dung dịch natri alginat (khoảng 15 đến dưới 45 phút, trong điều kiện kỵ sáng) trước khi cho dung dịch NHS vào, phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ phòng. Lượng EDC sử dụng tối thiểu bằng lượng NHS sử dụng, tốt nhất khi tỷ lệ NHS cao hơn, tối ưu ở tỷ lệ 1:2 (EDC: NHS= 1:2 theo số mol). Hàm lượng EDC cho 1 g natri alginat tốt nhất là 0,0046 mol, hàm lượng NHS cho 1 g natri alginat tốt hơn là từ 0,046 mol trở lên, tốt nhất là thuộc khoảng 0,0069 đến 0,0092 mol. Sau 30-60 phút (tốt nhất là 30 phút), dung dịch cystamin (MW~ 152,28 g/mol) trong cùng môi trường với hệ phản ứng được nhỏ giọt vào hệ phản ứng, phản ứng tiếp tục được khuấy ở nhiệt độ phòng trong vòng 48 giờ. Để tinh sạch phản ứng, dung dịch phản ứng được nhỏ giọt vào cồn 96°, tủa thu được sau đó được hòa lại vào nước cất và sử dụng phương pháp thẩm tách bằng màng xenluloza với khối lượng phân tử loại bỏ (MWCO) ~ 12-14kDa trong môi trường nước cất để loại bỏ dung môi đã sử dụng. Sản phẩm dẫn xuất alginat với cystamin (alginat-cys) thu được nhờ phương pháp sấy thăng hoa.

ii) Pluronic (HO[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>x</sub>[CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)O]<sub>y</sub>[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>x</sub>H, trong đó x= 2-100, y= 70-100) được làm nóng chảy trong môi trường hút chân không và có bổ sung khí N<sub>2</sub> ở nhiệt độ 65°C đến dưới 100°C, tốt hơn là 65°C - 85°C để làm khan mẫu. Sau khi mẫu pluronic chuyển thành dạng lỏng hoàn toàn, cloroformat (R-COOCl) được cho vào hệ phản ứng (tỷ lệ số mol giữa pluronic và R-COOCl là 1:2,5). Hệ tiếp tục phản ứng trong môi trường chân không có bổ sung khí N<sub>2</sub> ở nhiệt độ 65°C đến dưới 100°C, tốt hơn là 65°C - 85°C, trong khoảng 4-7 giờ. Hạ nhiệt độ của bình phản ứng xuống dưới 50°C. Hỗn hợp được hòa tan trong dung môi hữu cơ là tetrahydrofuran (THF) (thể tích 25ml), rồi cho phản ứng trong 16-24 giờ ở nhiệt độ phòng, tốc độ khuấy 500 vòng/phút. Hòa tan 3-amino-1-propanol (MW=89,09g/mol), với tỉ lệ gam 3-amino-1-propanol:pluronic là 0,15:10, vào 5ml THF và tiến hành nhỏ giọt vào bình phản ứng. Phản ứng được diễn ra ở nhiệt độ phòng, thời gian phản ứng là khoảng 5-40 giờ, khuấy ở tốc độ nhẹ. Dung dịch phản ứng được nhỏ giọt vào hỗn hợp dung môi dietyl ete và n-

hexan (tỷ lệ 2:3 theo thể tích), nhiệt độ 0 – 10°C. Phản ứng kết tủa trong dung môi diethyl ete và n-hexan được lặp lại ít nhất ba lần. Sản phẩm hoạt hóa được thu lại bằng phương pháp lọc hút chân không và được cô quay để loại bỏ hết dung môi và thu sản phẩm cuối cùng của bước này là sản phẩm hoạt hóa pluronic với hợp chất cloromat.

iii) Sản phẩm alginate-cys ở bước (i) được hòa tan vào nước và được giữ trong môi trường lạnh. Sản phẩm pluronic hoạt hóa bước (ii) được hòa tan vào nước, khuấy trong điều kiện lạnh. Tỷ lệ tối ưu là cứ 1g sản phẩm alginate-cys ở bước (i) đem hòa tan thì sử dụng 7g sản phẩm pluronic hoạt hóa ở bước (ii) đem hòa tan. Sau khi dung dịch pluronic tan hoàn toàn, được nhỏ nhanh vào dung dịch alginat-cys với tốc độ khuấy nhẹ để tránh tạo bọt, thực hiện phản ứng ở điều kiện nhiệt lạnh (khoảng dưới 10°C) khoảng 60 phút, và sau đó tiếp tục khuấy nhẹ ở nhiệt độ phòng. Toàn bộ dung dịch được cho vào màng thẩm tách xenluloza (MCWO~12-14 kDa). Môi trường thẩm tách trong ngày đầu tiên là dung dịch cồn tuyệt đối hoặc cồn 96°, sau đó là dung dịch tris-bazơ (0,1%) và cuối cùng là nước cất. Sản phẩm alginat-cys-pluronic nhạy nhiệt thu được bằng phương pháp sấy thăng hoa.

iv) Sản phẩm ở nước (iii) được hòa tan vào nước hoặc môi trường sinh lý (PBS, pH = 7,4), để thu được dung dịch có nồng độ nằm trong khoảng 15-20 wt%, được khuấy nhẹ trong môi trường lạnh khoảng 1-2h, sau đó để trong ủ ở nhiệt độ 4-8°C trong 24 giờ để đạt độ đồng nhất. Gel được hình thành khi ủ ở nhiệt độ trên 30°C.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tổng hợp vật liệu alginat nhạy nhiệt gồm dẫn xuất alginat với cystamin và pluronic được thực hiện theo các bước dưới đây:

i) Trộn 50ml DMSO với 50 ml nước cất, sau khi nhiệt độ dung dịch giảm về nhiệt độ phòng, dùng NaOH 0,1M hoặc HCl 0,1M điều chỉnh pH về khoảng 6,5. 10g natri alginat được hòa tan vào 80ml hỗn hợp DMSO:nước. Dung dịch sau đó được để trong môi trường lạnh. Chuẩn bị 0,046 mol EDC được pha trong 10ml hỗn hợp DMSO:nước và 0,092 mol NHS pha trong 10ml hỗn hợp DMSO:nước, 0,023 mol cystamin trong 10ml nước cất. Dung dịch natri alginat sau đó được khuấy nhẹ, dung dịch EDC được cho vào hệ phản ứng, 30 phút sau NHS được thêm vào. Phản ứng ở nhiệt độ phòng và trong điều kiện kỵ sáng. 60 phút sau, dung dịch cystamin được nhỏ

giọt vào bình phản ứng, phản ứng tiếp tục được khuấy ở nhiệt độ phòng trong vòng 48 giờ trước khi sử dụng phương pháp thẩm tách bằng màng xenluloza (MCWO~12-14Kda) trong môi trường nước cất để loại bỏ cystamin không phản ứng và các dung môi đã sử dụng. Sản phẩm dẫn xuất alginat với cystamin (Alg-cys) thu được nhờ phương pháp sấy thăng hoa.

ii) Pluronic F127 (MW= 12500 g/mol, 10g) được cho nóng chảy (nhiệt độ khoảng dưới 100°C, đến khi nóng chảy hoàn toàn) trong môi trường khí N<sub>2</sub>, không có độ ẩm và được khuấy trên bếp từ với tốc độ dưới 100 vòng/phút. Sau khi Pluronic tan chảy hoàn toàn, cho phenyl clorofomat (MW= 156,565 g/mol, 0,313g) vào bình phản ứng và tiếp tục khuấy trong điều kiện phản ứng ban đầu trong thời gian 7 giờ. Hạ nhiệt độ của bình phản ứng xuống dưới 50°C. Hỗn hợp được hòa tan trong dung môi hữu cơ là tetrahydrofuran (THF) (thể tích 30ml), rồi cho phản ứng trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng, tốc độ khuấy 500 vòng/phút. Hòa tan 3-amino-1-propanol (MW=89,09g/mol, 0,15g) vào 5ml THF tiến hành nhỏ giọt vào bình phản ứng. Phản ứng được diễn ra ở nhiệt độ phòng, thời gian phản ứng là khoảng 40 giờ, khuấy ở tốc độ nhẹ. Sản phẩm thu được bằng phương pháp kết tủa sử dụng dietyl ete:n-hexan (tỷ lệ 2:3 theo thể tích), ở nhiệt độ 10°C. Sau đó, phần tủa được đem đi cô quay để loại bỏ hết dung môi thu sản phẩm là sản phẩm hoạt hóa pluronic với hợp chất cloromat.

iii) 1g alginat-cys thu được từ bước i được hòa tan vào nước và được giữ trong môi trường lạnh. 7g sản phẩm pluronic hoạt hóa thu được từ bước ii được hòa tan vào nước, khuấy trong điều kiện lạnh. Sau khi dung dịch pluronic hoạt hóa tan hoàn toàn, được nhỏ nhanh vào dung dịch alginat-cys với tốc độ khuấy nhẹ để tránh tạo bọt, phản ứng được phản ứng ở điều kiện nhiệt lạnh (khoảng dưới 10°C) khoảng 60 phút. Phản ứng tiếp tục khuấy nhẹ ở nhiệt độ phòng. Toàn bộ dung dịch được cho vào màng thẩm tách xenluloza (MCWO~12-14 kDa). Môi trường thẩm tách trong ngày đầu tiên là dung dịch cồn tuyệt đối, sau đó là dung dịch tris-bazơ (0,1%) và cuối cùng là nước cất. Sản phẩm là vật liệu alginat-cys-pluronic nhạy nhiệt thu được bằng phương pháp sấy thăng hoa.

iv) tổng hợp hydrogel nhạy nhiệt từ vật liệu alginat-cys-pluronic bằng cách hòa tan vật liệu alginat-cys-pluronic trong nước, khuấy nhẹ ở môi trường lạnh trong 2



giờ và sau đó ủ ở nhiệt độ 8°C trong 24 giờ để đạt độ đồng nhất. Sau đó, dung dịch được ủ ở nhiệt độ trên 30°C, gel được hình thành (hình 2).

Theo kết quả đo lưu biến học, xác định sự thay đổi tính chất chảy của vật liệu bằng máy Rheostress 6000 (hãng Thermo Scientific, Mỹ), nhiệt độ chuyển pha của vật liệu alginat-cys-pluronic là 35,1°C khi pha trong môi trường nước cất ở nồng độ 0,2mg/ml (hình 2). Gel hình thành cấu trúc khoang 3D đặc trưng (hình 2) được quan sát dưới kính hiển vi đồng tiêu với sự hỗ trợ của thuốc nhuộm AO (hình 2). Bên cạnh đó, trong trạng thái gel bắt đầu được hình thành ở nhiệt độ phòng do đó gel có mang được tế bào bên trong và có khả năng giải phóng tế bào khỏi hệ hydrogel (hình 3).

### **Hiệu quả đạt được của sáng chế**

Quy trình theo sáng chế đã tổng hợp được hydrogel nhạy nhiệt từ vật liệu alginat-cys-pluronic, cụ thể dung dịch alginat-cys-pluronic có tính chất đáp ứng với sự thay đổi của nhiệt độ bằng cách thay đổi trạng thái vật lý giữa dạng gel và dung dịch. Hydrogel thu được từ vật liệu này cho thấy tiềm năng ứng dụng cao trong lĩnh vực y sinh nhờ tính tương hợp sinh học cao cũng như khả năng nuôi dưỡng tế bào trong mạng lưới cấu trúc, bên cạnh giá cả nguyên liệu rẻ tiền, quy trình đơn giản không đòi hỏi máy móc thiết bị phức tạp để tinh sạch sản phẩm.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tổng hợp hydrogel nhạy nhiệt từ vật liệu alginat-cys-pluronic gồm các bước:

i) tạo dẫn xuất alginat với cystamin, bao gồm các bước:

- bước 1i: phân tán muối natri alginat trong hỗn hợp dimetyl sulfoxit (DMSO): nước, với tỷ lệ 1:1 theo thể tích, pH nằm trong khoảng 6,0-6,5;
- bước 2i: nhỏ giọt dung dịch 1-etyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimit (EDC), với tỷ lệ 0,0046 mol cho 1g muối natri alginat, vào sản phẩm ở bước 1i, và khuấy đều trong 15 đến dưới 45 phút trong điều kiện kỵ sáng;
- bước 3i: nhỏ giọt dung dịch N-hydroxysuccinimit (NHS), với tỷ lệ 0,0092 mol cho 1g muối natri alginat, vào sản phẩm bước 2i, và khuấy trong 30 đến 60 phút trong điều kiện kỵ sáng;
- bước 4i: nhỏ từ từ dung dịch cystamin, với tỷ lệ 0,023 mol cho 1g muối natri alginat, vào sản phẩm bước 3i, và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ;
- bước 5i: nhỏ giọt sản phẩm bước 4i vào dung dịch cồn 96°, phần kết tủa được thu lại và hòa tan vào nước cất;
- bước 6i: sử dụng phương pháp thẩm tách bằng màng xenluloza, với khối lượng phân tử loại bỏ (MWCO) ~ 12-14kDa, trong môi trường nước cất để tinh sạch sản phẩm, sản phẩm sau đó được thu hồi nhờ phương pháp sấy thăng hoa để thu được sản phẩm là dẫn xuất alginat với cystamin (alginate-cys);

ii) hoạt hóa pluronic với hợp chất cloromat (R-COOCl), bao gồm các bước:

- bước 1ii: cho pluronic (HO[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>x</sub>[CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)O]<sub>y</sub>[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>x</sub>H, trong đó x = 2-100, y = 70-100, nóng chảy ở nhiệt độ 65°C đến dưới 100°C, tối ưu ở 65-85°C, trong môi trường chân không, có bổ sung khí N<sub>2</sub>, không có độ ẩm;
- bước 2ii: khi phản ứng ở bước 1ii tạo ra pluronic hóa lỏng hoàn toàn, cho phenyl clorofomat dạng R-COOCl có MW= 156,565 g/mol, vào hệ phản ứng, R là mạch carbon, với số mol sử dụng gấp 2,5 lần số mol của pluronic; sau đó tiếp tục khuấy trong điều kiện phản ứng ban đầu trong 4-7 giờ;

- bước 3ii: đưa nhiệt độ hệ phản ứng ở bước 2ii về xuống dưới 50°C, sau đó hòa tan hỗn hợp thu được từ bước 2ii trong dung môi hữu cơ dạng khan tetrahydrofuran (THF), để phản ứng diễn ra ở nhiệt độ phòng dưới điều kiện khuấy liên tục ở tốc độ 500 vòng/phút trong 16-24 giờ;
- bước 4ii: hòa tan 3-amino-1-propanol, với tỷ lệ gam 3-amino-1-propanol:pluronic là 0,15:10, vào 5ml dung môi hữu cơ dạng khan THF, sau đó tiến hành nhỏ giọt vào bình phản ứng ở bước 3ii, phản ứng tiếp tục trong 5-40 giờ ở nhiệt độ phòng;
- bước 5ii: nhỏ giọt từ từ dung dịch trong bình phản ứng ở bước 4ii vào dung dịch diethyl ete:n-hexan, với tỷ lệ 2:3 theo thể tích, ở nhiệt độ 0-10°C, phần kết tủa được thu lại bằng phương pháp lọc hút chân không;
- bước 6ii: cô quay phần kết tủa của bước 5ii để loại bỏ hết dung môi và thu sản phẩm là sản phẩm hoạt hóa pluronic với hợp chất cloromat;

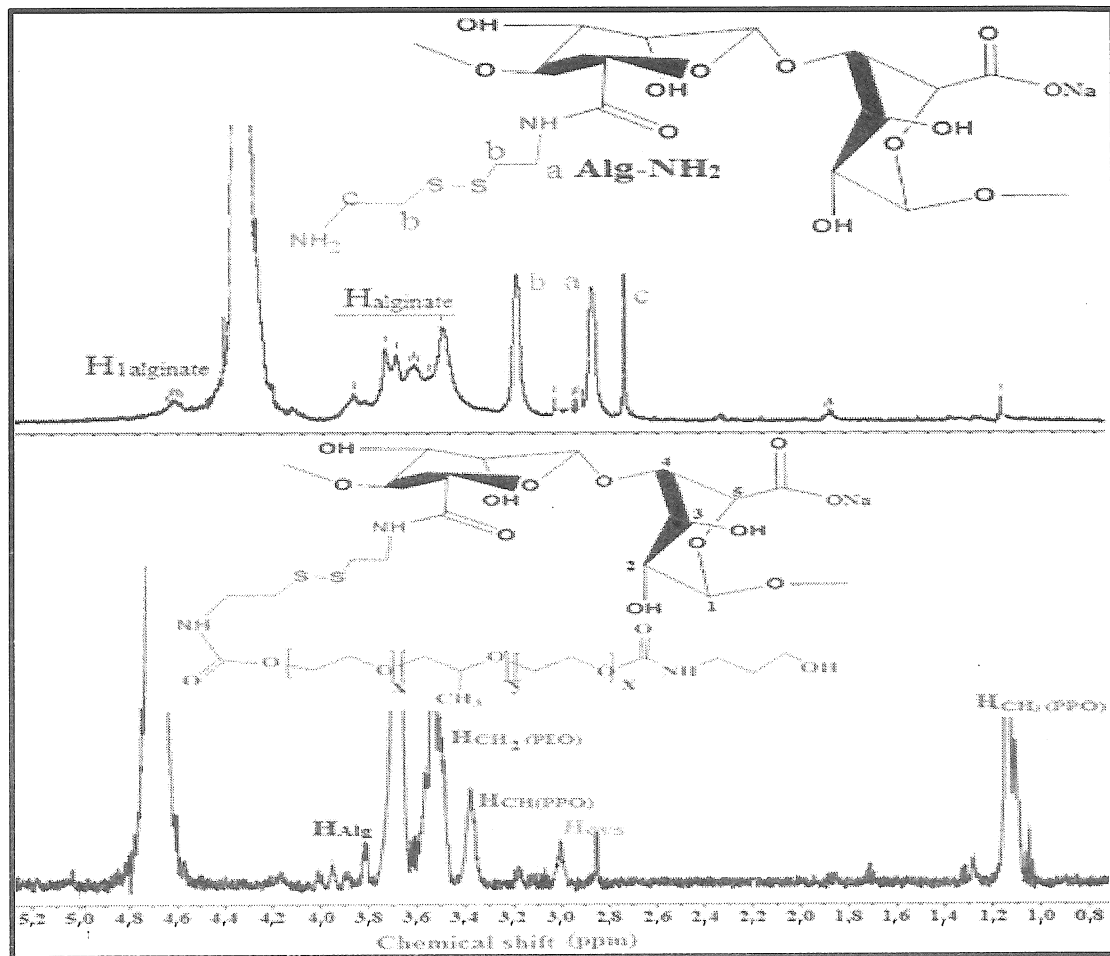
iii) tổng hợp vật liệu alginat-cys-pluronic, bao gồm các bước:

- bước 1iii: hòa tan sản phẩm của bước i vào nước cất và giữ lạnh;
- bước 2iii: hòa tan sản phẩm của bước ii vào nước và khuấy trong điều kiện lạnh;
- bước 3iii: nhỏ giọt từ từ sản phẩm ở bước 2iii vào dung dịch đã chuẩn bị ở bước 1iii, với tỉ lệ tối ưu là cứ 1g sản phẩm alginate-cys ở bước i đem hòa tan thì sử dụng 7g sản phẩm pluronic hoạt hóa ở bước ii đem hòa tan, điều kiện phản ứng ở nhiệt độ lạnh khoảng dưới 10°C, trong thời gian khoảng 60 phút, sau đó chuyển về nhiệt độ phòng;
- bước 4iii: cho sản phẩm ở bước 3iii qua màng thẩm tách xenluloza với MCWO~12-14kDa, trong đó môi trường thẩm tách trong ngày đầu tiên là dung dịch cồn tuyệt đối, sau đó là dung dịch tris-bazơ 0,1% và cuối cùng là nước cất, vật liệu alginat-cys-pluronic nhạy nhiệt thu được bằng phương pháp sấy thăng hoa;

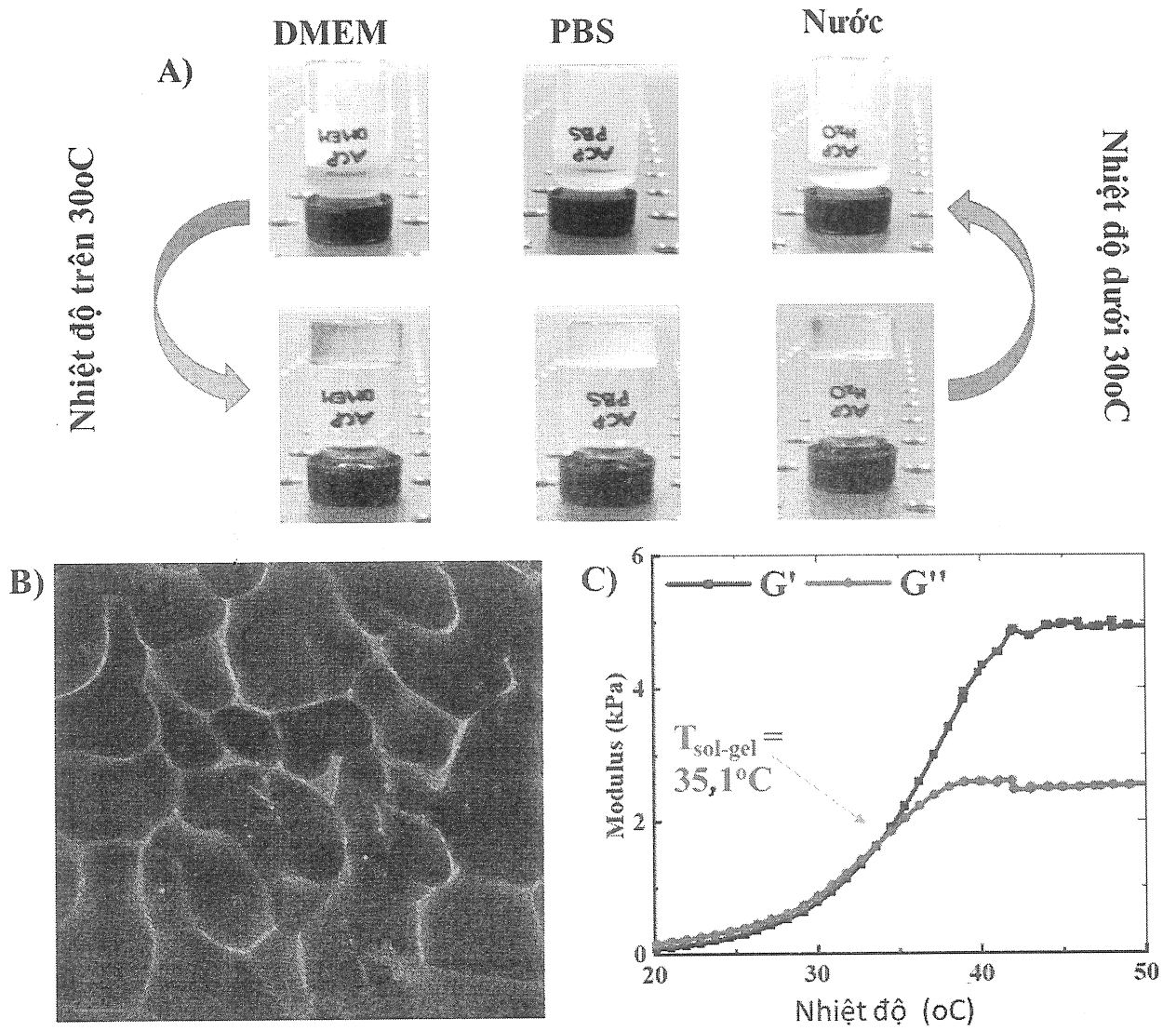
iv) tạo hydrogel nhạy nhiệt từ vật liệu alginat-cys-pluronic, bao gồm các bước:

- bước 1iv: phân tán vật liệu alginat-cys-pluronic thu được từ bước iii vào môi trường nước hoặc đệm sinh lý PBS có pH 7,4, để thu được dung dịch có nồng độ nằm trong khoảng 15-20 wt%, khuấy ở nhiệt độ lạnh khoảng 1 – 2 giờ, sau đó ủ ở nhiệt độ 4-8°C trong 24 giờ để đạt độ đồng nhất;

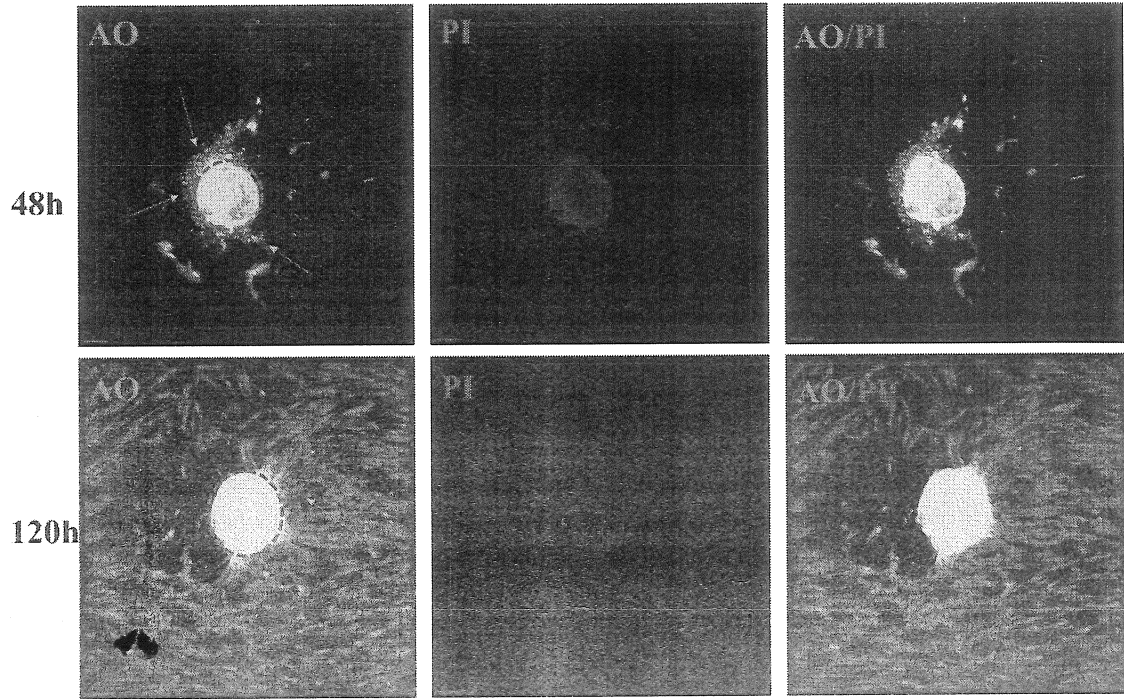
- bước 2iv: ủ sản phẩm ở bước 1iv ở nhiệt độ trên 30°C thu được hydrogel nhạy nhiệt từ vật liệu alginate-cys-pluronic.



Hình 1



Hình 2



Hình 3