



(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)



1-0051765

(51)⁷ A61K 9/08; A61K 47/12; A61K 47/18; (13) B
A61P 35/04; A61K 47/36; A61K 9/19;
A61K 31/136; A61K 47/26

(21) 1-2019-06268

(22) 15/09/2017

(86) PCT/CN2017/101801 15/09/2017

(87) WO2018/233095 27/12/2018

(30) 201710486510.8 23/06/2017 CN

(45) 25/09/2025 450

(43) 25/06/2020 387A

(73) Shenzhen China Resources Jiuchuang Medical and Pharmaceutical Co., Ltd (CN)
Room 101 of Filling Workshop, Gosun Pharma, No. 2 Kaifeng Road, Meiting
Community, Meilin Street, Futian District Shenzhen 518000, China

(72) LIU, Jun (CN); YE, Tiantian (CN); ZHANG, Dan (CN).

(74) Công ty TNHH Đại Tín và Liên Danh (DAITIN AND ASSOCIATES CO.,LTD)

(54) THUỐC TIÊM TINH THỂ NANO TỰ LẮP RÁP SINH HỌC NHẢM ĐÍCH BẠCH
HUYẾT VÀ PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ THUỐC NÀY

(21) 1-2019-06268

(57) Thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học có chức năng nhắm đích bạch huyết và phương pháp sử dụng thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học có chức năng nhắm đích bạch huyết nhắm đích là hệ thống bạch huyết. Thuốc tiêm có chứa 0,05-5% mitoxantron và muối của nó, 0,1-10% chất điều hòa áp suất thẩm thấu, 0,001-0,1% đệm, 0,01-0,1% chất chống oxy hóa, 0,05-1% chất hấp phụ, và 0-20% chất độn. Phương pháp sử dụng là tiêm kẽ mô, và hạch bạch huyết tạo ra màu xanh có thể nhìn thấy bằng mắt thường sau khi nhắm đích thụ động tới hệ thống bạch huyết.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến việc thiết kế và bào chế dạng liều dùng có chức năng nhắm đích bạch huyết, và cũng đề cập đến thành phần công thức và phương pháp bào chế thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học trong cơ thể sống.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Di căn bạch huyết là một trong các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tiên lượng u ác tính. Các tế bào u đi vào hệ thống bạch huyết và khuếch tán ở giai đoạn sớm và đi vào các hạch bạch huyết không tác động hoặc các hạch bạch huyết từ khối u nguyên phát thông qua hệ bạch huyết, gọi là di căn nhảy cóc và hạn chế khả năng phẫu thuật. Các hạch bạch huyết vùng ít nhạy cảm với xạ trị hơn các khối u nguyên phát và hóa trị liệu toàn thân không hiệu quả đối với các hạch bạch huyết di căn, vì các thuốc hóa trị liệu ở dạng bào chế thông thường không dễ dàng vận chuyển đến các hạch bạch huyết. Do hiệu quả của việc điều trị di căn hạch bạch huyết ảnh hưởng trực tiếp đến tỷ lệ chữa khỏi và tỷ lệ sống của bệnh nhân, nên việc điều trị nhắm đích là các u di căn hạch bạch huyết ngày càng được chú ý nhiều hơn. Các hạch bạch huyết đã trở thành một cơ quan đích tiềm năng trong hóa trị liệu khối u.

Các hệ thống phân phối thuốc được thiết kế để cho phép nhắm đích bạch huyết bằng cách sử dụng đặc điểm là các chất và hạt đại phân tử dễ dàng xâm nhập hệ thống bạch huyết thông qua hình thức thực bào. Hiện nay, các chất mang thuốc được sử dụng bao gồm nhũ tương, cacbon hoạt tính, xyclodextrin, liposom, thể trung tâm, nhánh phân, tinh thể nano, vv... và chúng có thể được kết hợp với các thuốc hóa trị hoặc các hợp chất ảnh hóa bằng các liên kết hóa học, tạo nhũ tương, hấp thụ, ẩn nhập, nang hóa, vv... Mặc dù các chất mang thuốc này có các đặc tính hướng bạch huyết đáng kể so với các thuốc phân tử nhỏ, nhưng chúng kém hơn về độ ổn định khi lưu trữ trong ống nghiệm (*in vitro*) và độ bền pha loãng trong cơ thể (*in vivo*), và khả năng duy trì tải thuốc hiệu quả và tính toàn vẹn của chất mang trong môi trường sinh lý cũng không rõ ràng.

Tinh thể nano hay hỗn dịch nano là các phân tán keo có thành phần siêu vi được tạo ra bằng các kỹ thuật tự lắp ráp hoặc nghiền thành bột với một lượng nhỏ chất hoạt động bề mặt hoặc polyme như một chất ổn định, và có kích thước hạt nằm trong khoảng 1-100 nm, và nhờ đó có chức năng nhắm đích bạch huyết tốt. So với các hệ thống phân phối thuốc khác, tinh thể nano được tạo thành trực tiếp từ thuốc, và có ưu điểm là có thể tải được lượng lớn thuốc, dễ dàng sản xuất công nghiệp và giá thành bào chế tương đối thấp. Chúng cũng có thể được sử dụng bằng nhiều con đường vận chuyển thuốc khác nhau, như tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch, sử dụng theo đường miệng, sử dụng qua da, v.v...

Bản thân các tinh thể nano có hoạt tính tương đối cao và rất không ổn định. Khi các điều kiện kích hoạt nhất định được đáp ứng, chúng sẽ giải phóng năng lượng tự do dư thừa và các hạt sẽ lớn lên, dẫn đến mất các đặc tính của vật liệu nano. Hiện nay, để điều chế các thuốc dạng tinh thể nano có hai quy trình cơ bản: từ dưới lên (công nghệ tự lắp ráp *in vitro*) và từ trên xuống (công nghệ nghiền). Do có một số nhược điểm của công nghệ tự lắp ráp trong ống nghiệm, như tồn dư dung môi hữu cơ, độ ổn định vật lý của công thức kém, xu hướng xảy ra quá trình chín Ostwald, v.v..., nên công nghệ nghiền được sử dụng rộng rãi hơn trong ngành dược phẩm. Tuy nhiên, do lượng năng lượng lớn được tạo ra trong quá trình nghiền, nên sự biến đổi dạng tinh thể có thể xảy ra. Vì vậy, so với các hệ thống phân phối thuốc khác, tinh thể nano cũng có nhược điểm là kém ổn định *in vitro*, khó kiểm soát độ ổn định *in vivo*, độ ổn định công thức nhạy cảm đối với các kỹ thuật chuẩn bị và khó khăn trong việc mở rộng quy mô. Do đó, việc bào chế các tinh thể nano là khó khăn, gây cản trở tới ứng dụng lâm sàng của chúng.

Đối với hệ thống phân phối thuốc được đề cập ở trên có chức năng nhắm đích bạch huyết, phương thức sử dụng có thể được chọn từ nhóm bao gồm sử dụng theo đường kẽ mô, sử dụng theo đường niêm mạc, sử dụng theo đường mạch máu, sử dụng theo đường tiêu hóa, vv... Trong đó, sử dụng theo đường kẽ mô còn được gọi là tiêm kẽ mô. Việc tiêm kẽ mô, chẳng hạn như tiêm dưới da, tiêm bắp, tiêm màng bụng và tiêm bắp, của hệ thống phân phối thuốc được đi kèm với sự vận chuyển và hấp thu nó bởi các mao mạch máu và mao mạch bạch huyết. Do sự kết nối lỏng lẻo giữa các tế bào nội mô, thường có nhiều khoảng trống mở. Hệ thống tải thuốc có thể đi vào các mao mạch bạch huyết thông qua khe hở giữa các tế bào nội mô của mạch và bằng hình thức xuất bào và nhập bào của các tế bào nội mô, và sau đó đến các hạch bạch huyết vùng thông qua dẫn lưu bạch huyết. Nhờ những ưu điểm của phương

thức tiêm kẽ mô này trong tải thuốc nhắm đích bạch huyết, nên nó đã trở thành phương thức phổ biến nhất cho các hệ thống phân phối thuốc có chức năng nhắm đích bạch huyết. Cho đến nay, Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) đã phê chuẩn ba công thức để nhắm đích bạch huyết: Sunfua coloit được phê chuẩn năm 1974, xanh Isosunfan được phê chuẩn năm 1981 và Lymphoseek được phê chuẩn năm 2013. Ở Trung Quốc, thuốc tiêm nano cacbon dạng hỗn dịch (Kanalín) của công ty dược phẩm Chongqing Laimei được phê chuẩn lưu hành. Tiêm nội mô hoặc tiêm ngoại mô được chọn làm phương thức sử dụng cho cả bốn công thức có chức năng nhắm đích bạch huyết đã lưu hành.

Mitoxantron là tác nhân nghiên cứu được sử dụng rộng rãi trong sinh học phân tử, dược lý và nghiên cứu khoa học khác. Nó cũng là một loại thuốc chống ung thư loại kháng sinh. Nó có cấu trúc và hiệu quả chống ung thư tương tự doxorubicin, không có cấu trúc đường amin, không tạo ra các gốc tự do và có tác dụng ức chế peroxid hóa lipid. Nó có thể tiêu diệt các tế bào khối u ở bất kỳ giai đoạn nào của chu kỳ tế bào, với cả tế bào tăng sinh và không tăng sinh bị ức chế, do đó nó có hoạt tính chống khối u tương đương hoặc cao hơn một chút so với doxorubicin, và cao hơn đáng kể so với xyclophosphamit, Flouracil, methotrexat, vincristin và là loại thuốc chống ung thư phổ rộng. Cả dạng bột thuốc và dạng dung dịch của mitoxantron đều có màu. Cơ chất thuốc là dạng bột màu nâu tím, dạng dung dịch có màu xanh đậm và có dạng đỏ tím đậm trong axit sunfuric đậm đặc. Mitoxantron hydroclorua dùng cho thuốc tiêm trên thị trường là dạng dung dịch sử dụng theo đường tiêm tĩnh mạch, và đích nhắm của nó chủ yếu là u lympho ác tính, ung thư vú và bệnh bạch cầu ác tính. Không có công thức dược phẩm của mitoxantron hoặc muối của nó có chức năng nhắm đích bạch huyết trên cả thị trường trong và ngoài nước.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Nhằm khắc phục các nhược điểm nêu trên, sáng chế đề xuất thành phần công thức, phương pháp bào chế, phương thức điều trị, và nguyên lý thiết kế dung dịch tiêm có khả năng tự lắp ráp sinh học thành tinh thể nano trong cơ thể.

Sáng chế có các đặc điểm kỹ thuật sau:

Thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học có chức năng nhắm đích bạch huyết, thành phần có chứa 0,05-5% mitoxantron hoặc muối của nó và 0,1-10% tỷ lệ khối lượng/thể tích chất điều hòa áp suất thẩm thấu, và phần còn lại là dung môi.

Theo tùy chọn, thuốc tiêm bao gồm thêm 0,01-0,1% đệm, 0,01-0,1% chất chống oxy hóa, 0,05-1% chất hấp phụ, và 0-20% chất độn.

Theo tùy chọn, nồng độ của mitoxantron trong thuốc tiêm là 0,1-1%.

pH của thuốc tiêm nằm trong khoảng 2,0-6,0.

Theo tùy chọn, pH của thuốc tiêm nằm trong khoảng 3,5-5,5

Áp suất thẩm thấu của thuốc tiêm nằm trong khoảng 285-2317 mmol/kg.

Theo tùy chọn, áp suất thẩm thấu của thuốc tiêm nằm trong khoảng 307-1503 mmol/kg.

Theo tùy chọn, muối của mitoxantron là một hoặc nhiều muối được chọn từ nhóm bao gồm muối hydroclorua, oxalat, sulfat, phosphat, axetat hoặc xitrat của mitoxantron.

Kích thước hạt của hạt tinh thể nano tự lắp ráp sinh học trong điều kiện sinh lý nằm trong khoảng 1-1000 nm.

Theo tùy chọn, kích thước hạt của hạt tinh thể nano tự lắp ráp sinh học trong điều kiện sinh lý nằm trong khoảng 10-100 nm.

Theo tùy chọn, kích thước hạt của hạt tinh thể nano tự lắp ráp sinh học trong điều kiện sinh lý nằm trong khoảng 30-60 nm.

Theo tùy chọn, thuốc tiêm có chứa một lượng thể tích nhỏ dung dịch pha tiêm và bột tiêm, trong đó lượng thể tích nhỏ dung dịch pha tiêm không chứa chất độn và bột tiêm chứa chất độn với lượng 0-20%.

Theo tùy chọn, chất điều hòa áp suất thẩm thấu là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm natri clorua, glucoza, sorbitol, manitol, glyxerin, PEG, phosphat, xitrat hoặc kết hợp giữa chúng.

Theo tùy chọn, đệm là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm axit axetic, natri axetat, axit xitric hoặc natri xitrat.

Theo tùy chọn, chất chống oxy hóa là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm natri sunfit, natri hydrosulfit, natri metasulfit, natri thiosulfat, hoặc natri edetat.

Theo tùy chọn, chất độn là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm các monosacarit, tức là glucoza, fructoza, galactoza, riboza, hoặc deoxyriboza, hoặc nhóm disacaroza, sucroza, trehaloza, maltoza, hoặc lactoza, hoặc đường polyme, tức là manitol, sorbitol, lactitol, xylitol, maltitol, hoặc erythritol.

Theo tùy chọn, chất hấp phụ là cacbon hoạt tính.

Theo tùy chọn, sau khi chức năng nhắm đích bạch huyết được thực thi, các hạch bạch huyết tạo ra màu xanh có thể nhìn được bằng mắt thường.

Theo tùy chọn, sau khi chức năng nhắm đích bạch huyết được thực thi, các hạch bạch huyết chứa u di căn sẽ co lại hoặc trở về kích thước bình thường.

Theo tùy chọn, thuốc tiêm được sử dụng để điều trị ở dạng dung dịch, và mitoxantron hoặc muối của nó ở dạng phân tử được hòa tan hoàn toàn.

Theo tùy chọn, sau khi thuốc tiêm dạng dung dịch được tiêm vào mô, các tinh thể nano sẽ tự lắp ráp tại vị trí tiêm.

Theo tùy chọn, phương thức tiêm để thực thi chức năng nhắm đích bạch huyết là tiêm kẽ mô.

Theo tùy chọn, phương thức tiêm có thể là tiêm dưới da, tiêm bắp, tiêm dưới niêm mạc, tiêm trong màng bụng, tiêm nội mô, tiêm ngoại mô hoặc kết hợp giữa chúng.

Phương pháp bào chế thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học có chức năng nhắm đích bạch huyết, với thuốc tiêm là dung dịch thuốc tiêm tinh thể tự lắp ráp sinh học thể tích nhỏ, bao gồm các bước bào chế sau: cân một lượng thích hợp các nguyên liệu thô và tá dược, thêm 70% lượng nước pha tiêm đã định trước vào trong bể phối trộn cô đặc, thêm lượng đã định trước tá dược, khuấy hòa tan trong 15 phút, sau đó thêm mitoxantron hoặc muối của chúng, khuấy hòa tan trong 20 phút, nạp thêm cacbon hoạt tính, khuấy hấp phụ trong 20 phút ở 40-60°C, lọc dung dịch cô đặc qua lõi lọc gấp nếp bằng thép không gỉ cỡ 3 μm và được chuyển vào trong bể hòa loãng, bổ sung nước pha tiêm lên thể tích tổng, khuấy trong 10 phút, lọc dung dịch thuốc qua liên tiếp hai bộ lọc vô trùng 0,22 μm , và đóng vào các lọ riêng biệt và hàn kín.

Ngoài ra, phương pháp bào chế thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học dạng bột tiêm bao gồm các bước sau: cân một lượng thích hợp các nguyên liệu thô và tá dược, thêm 70% lượng nước pha tiêm đã định trước vào trong bể phối trộn cô đặc, thêm lượng đã định trước tá dược, khuấy hòa tan trong 15 phút, sau đó thêm mitoxantron hoặc muối của chúng, khuấy hòa tan trong 20 phút, nạp thêm cacbon hoạt tính, khuấy hấp phụ trong 20 phút ở 40-60°C, lọc dung dịch cô đặc qua lõi lọc gấp nếp bằng thép không gỉ cỡ 3 μm và được chuyển vào trong bể hòa loãng, bổ sung nước pha tiêm lên thể tích tổng, khuấy trong 10 phút, lọc dung dịch thuốc qua liên tiếp hai bộ lọc vô trùng 0,22 μm , hòa tan manitol vào trong dung dịch thuốc, và loại nước bằng cách đông khô để thu được thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học dạng bột, loại này được sử dụng tiêm kẽ mô bằng cách hydrat hóa và lắc đều trước khi sử dụng, trong đó môi trường hydrat hóa là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm nước pha tiêm, nước muối sinh lý và dịch truyền glucoza.

Mô tả chi tiết sáng chế

Tỷ lệ phần trăm khối lượng/thể tích được sử dụng trong mô tả sáng chế này là % g/ml.

Trong sáng chế, mitoxantron hydroclorua được sử dụng làm thành phần hoạt tính trong tinh thể nano tự lắp ráp sinh học, và mitoxantron hydroclorua ở dạng tan tốt trong nước ở điều kiện axit khi bào chế thành phẩm.

(1) Giá trị pH ở điều kiện axit có ảnh hưởng lớn đến trạng thái của thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp trong cơ thể. Khi pH của thuốc tiêm nằm trong khoảng 2,0-6,0 và được sử dụng bằng cách tiêm kẽ mô, với vị trí mô có giá trị pH của dịch cơ thể là 7,4, thì mitoxantron hydroclorua trở về dạng mitoxantron do hydroclorua được trung hòa trong môi trường pH sinh lý, và do đó tính tan được làm giảm để tạo ra sự tủa các tinh thể nano. Khi pH của thuốc tiêm nhỏ hơn 2,0, pH dịch cơ thể là 7,4 thì không thể đạt được phản ứng trung hòa, và vì vậy các tinh thể nano không thể được tạo thành hiệu quả. Khi pH của thuốc tiêm lớn hơn 6,0, thuốc tiêm không ổn định và mitoxantron hydroclorua bị kết tủa, ảnh hưởng đến chất lượng của thuốc tiêm. Thông qua tối ưu hiệu quả công thức cho thấy, khi pH của thuốc tiêm là 3,5-5,5 thì phản ứng trung hòa dịch cơ thể ở pH 7,4 là hiệu quả nhất, cho phép tạo thành nhanh chóng một lượng lớn các tinh thể nano ở vị trí tiêm kẽ mô để đạt được chức năng nhắm đích bạch huyết.

(2) Khi lượng dịch cơ thể tại vị trí tiêm kẽ mô là nhỏ, thì nồng độ thuốc được tiêm có ảnh hưởng đáng kể tới hàm lượng và tỷ lệ tinh thể nano được tạo thành. Khoảng nồng độ tối ưu được sử dụng trong sáng chế là 0,05-5% (khối lượng/thể tích, g/ml). Khi nồng độ sử dụng thấp hơn khoảng trên, sau khi tiêm kẽ mô, rất khó để tạo thành tinh thể nano có khả năng nhắm đích dưới điều kiện sinh lý. Khi nồng độ sử dụng cao hơn khoảng trên, xảy ra hiện tượng gây độc cho hệ thống bạch huyết.

(3) Tỷ lệ tuần hoàn của dịch cơ thể trong vị trí tiêm kẽ mô là chậm. Thuốc được tiêm vào vị trí tiêm kẽ mô được đẩy đi vào hệ thống bạch huyết chủ yếu nhờ áp suất thẩm thấu giữa vị trí tiêm và hệ thống bạch huyết. Tiêm nhược trương không có lợi cho việc dẫn thuốc vào hệ bạch huyết thông qua các khoảng trống trong các mao mạch bạch huyết, do đó tiêm đẳng trương hoặc hơi ưu trương có lợi cho việc dẫn lưu các tinh thể nano tự lắp ráp trong bạch huyết. Khoảng áp suất thẩm thấu thích hợp trong sáng chế là 285-2317 mmol/kg, và khoảng áp suất thẩm thấu tối ưu là 307-1503 mmol/kg. Khi áp suất thẩm thấu nhỏ hơn 285 mmol/kg, động lực dẫn lưu bạch huyết không đủ, và khi áp suất thẩm thấu lớn hơn 2317 mmol/kg, nồng độ của chất điều chỉnh áp suất thẩm thấu quá cao, gây ra kích ứng tại vị trí tiêm.

Chỉ có một lượng nhỏ dịch cơ thể có pH 7,4 lưu thông chậm ở vị trí tiêm. Chính nhờ những điều kiện sinh lý như vậy với độ pH thích hợp của thuốc tiêm, nồng độ sử dụng thích hợp và áp suất thẩm thấu thích hợp, độ hòa tan trong nước giảm sau khi loại bỏ hydroclorua khỏi mitoxantron hydroclorua, dẫn đến sự tự lắp ráp các tinh thể nano có kích thước hạt lớn hơn 30nm và nhỏ hơn 60nm ở vị trí tiêm kẽ mô. Có một số khoảng trống chồng lên nhau giữa các tế bào nội mô của mạch bạch huyết. Các phân tử thuốc nhỏ và hạt nano với kích thước hạt nhỏ hơn 20 nm sẽ tạo ra hiệu quả khuếch tán tốt ở vị trí tiêm sau khi tiêm dưới da, trong khi đó các hạt có kích thước 20-100 nm có thể đi qua các khoảng trống giữa tế bào nội mô của mạch bạch huyết và tạo ra hiệu quả nhắm đích bạch huyết tốt.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Công thức dung dịch tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học thể tích nhỏ và hàm lượng các thành phần cho 1000 liều tiêm được trình bày sau đây:

Ví dụ 1

Mitoxantron hydroclorua

11,64 g

Axit axetic	0,92 g
Natri axetat	0,10 g
Nước pha tiêm	2000 ml

Cân một lượng thích hợp các nguyên liệu thô và tá dược. Cho vào bể trộn cô đặc lượng nước dùng cho thuốc tiêm bằng 70% lượng thích hợp nêu trên. Cho tá dược với lượng thích hợp nêu trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 15 phút. Sau đó, cho mitoxantron hydroclorua với lượng thích hợp nêu trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 20 phút.

Dung dịch thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học thể tích nhỏ được bào chế từ công thức và quy trình có chứa 0,58% mitoxantron hydroclorua, và có pH là 3,5, và áp suất thẩm thấu là 196 mmol/kg. Các hạt tinh thể nano tự lắp ráp dưới điều kiện gian bào sinh học có kích thước hạt là 50 nm. Lớp thứ nhất của hạch bạch huyết di căn sau khi tiêm kẽ mô dưới da có màu xanh đậm có thể nhìn được bằng mắt thường, và lớp thứ hai và thứ ba của hạch bạch huyết có màu xanh nhạt nhìn được bằng mắt thường. Khối lượng và thể tích của hạch bạch huyết di căn của mỗi lớp giảm đáng kể hoặc trở về kích thước bình thường và không có sự gây độc mào đáng kể ở vị trí tiêm hoặc các tế bào lympho.

Công thức dung dịch tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học thể tích nhỏ và hàm lượng các thành phần cho 1000 liều tiêm được trình bày sau đây:

Ví dụ 2

Mitoxantron hydroclorua	11,64 g
Natri clorua	16,0 g
Axit axetic	0,92 g
Natri axetat	0,10 g
Natri edetat	0,10 g
Nước pha tiêm	11,64 g
Natri clorua	2000 ml

Cacbon hoạt tính (được sử dụng trong quá trình bào chế 2 g và được loại bỏ sau khi hoàn thành)

Cân một lượng thích hợp các nguyên liệu thô và tá dược. Cho vào bể trộn cô đặc lượng nước dùng cho thuốc tiêm bằng 70% lượng thích hợp nêu trên. Cho tá dược với lượng thích hợp nêu trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 15 phút. Sau đó, cho mitoxantron hydroclorua với lượng thích hợp nêu trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 20 phút. Cacbon hoạt tính được nạp vào và được khuấy để hấp phụ trong 20 phút ở 40-60°C. Dung dịch cô đặc được lọc qua lõi lọc gấp nếp bằng thép không gỉ cỡ 3 μm và được chuyển vào bể hòa loãng và nước pha tiêm được thêm vừa đủ và dung dịch được khuấy trong 10 phút. Dung dịch thuốc được lọc qua hai bộ lọc vô trùng (với kích thước lỗ lọc là 0,22 μm) được bố trí nối tiếp, được lọc kín riêng biệt.

Dung dịch thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học thể tích nhỏ được bào chế từ công thức và quy trình có chứa 0,57% mitoxantron hydroclorua, và có pH là 3,5, và áp suất thẩm thấu là 938 mmol/kg. Các hạt tinh thể nano tự lắp ráp dưới điều kiện gian bào sinh học có kích thước hạt là 50 nm. Lớp thứ nhất, thứ hai và thứ ba của hạch bạch huyết di căn sau khi tiêm kẽ mô dưới da có màu xanh đậm có thể nhìn thấy bằng mắt thường. Khối lượng và thể tích của hạch bạch huyết di căn của mỗi lớp giảm đáng kể hoặc trở về kích thước bình thường và không có sự gây độc mào đáng kể ở vị trí tiêm hoặc các tế bào lympho.

Ví dụ 3

Công thức dung dịch tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học thể tích nhỏ và hàm lượng các thành phần cho 1000 liều tiêm được trình bày sau đây:

Mitoxantron oxalat	1,164 g
Glucoza	80,00 g
Axit xitric	1,84 g
Natri xitrat	0,20 g
Natri sunfit	0,20 g
Nước pha tiêm	2000 ml

Chất hấp phụ (được sử dụng trong quá trình bào chế và 2 g được loại bỏ sau khi hoàn thành)

Cân một lượng thích hợp các nguyên liệu thô và tá dược. Cho vào bể trộn cô đặc lượng nước dùng cho thuốc tiêm bằng 70% lượng thích hợp nêu trên. Cho tá dược với lượng thích hợp nêu trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 15 phút. Sau đó, cho mitoxantron oxalat với lượng thích hợp nêu trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 20 phút. Cacbon hoạt tính được nạp vào và được khuấy để hấp phụ trong 20 phút ở 40-60°C. Dung dịch cô đặc được lọc qua lõi lọc gấp nếp bằng thép không gỉ cỡ 3 μm và được chuyển vào bể hòa loãng và nước pha tiêm được thêm vừa đủ và dung dịch được khuấy trong 10 phút. Dung dịch thuốc được lọc qua hai bộ lọc vô trùng (với kích thước lỗ lọc là 0,22 μm) được bố trí nối tiếp, được lọc kín riêng biệt.

Dung dịch thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học thể tích nhỏ được bào chế từ công thức và quy trình có chứa 0,056% mitoxantron oxalat, và có pH là 5,5, và áp suất thẩm thấu là 1503 mmol/kg. Các hạt tinh thể nano tự lắp ráp dưới điều kiện gian bào sinh học có kích thước hạt là 40 nm. Lớp thứ nhất, thứ hai và thứ ba của hạch bạch huyết di căn sau khi tiêm kẽ mô dưới da có màu xanh nhạt có thể nhìn thấy bằng mắt thường. Khối lượng và thể tích của hạch bạch huyết di căn của mỗi lớp tăng ở mức độ nhất định và không có sự gây độc mào đáng kể ở vị trí tiêm hoặc các tế bào lympho.

Ví dụ 4

Công thức dung dịch tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học thể tích nhỏ và hàm lượng các thành phần cho 1000 liều tiêm được trình bày sau đây:

Mitoxantron sulfat	116,40 g
Glyxerin	20,13 g
Axit axetic	0,92 g
Natri axetat	0,10 g
Natri metasulfit	0,40 g
Nước pha tiêm	2000 ml

Chất hấp phụ (được sử dụng trong quá trình bào chế 2 g và được loại bỏ sau khi hoàn thành)

Cân một lượng thích hợp các nguyên liệu thô và tá dược. Cho vào bể trộn cô đặc lượng nước dùng cho thuốc tiêm bằng 70% lượng thích hợp nêu trên. Cho tá dược với lượng thích hợp nêu trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 15 phút. Sau đó, cho mitoxantron sulfat với lượng thích hợp nêu trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 20 phút. Cacbon hoạt tính được nạp vào và được khuấy để hấp phụ trong 20 phút ở 40-60°C. Dung dịch cô đặc được lọc qua lõi lọc gấp nếp bằng thép không gỉ cỡ 3 μm và được chuyển vào bể hòa loãng và nước pha tiêm được thêm vừa đủ và dung dịch được khuấy trong 10 phút. Dung dịch thuốc được lọc qua hai bộ lọc vô trùng (với kích thước lỗ lọc là 0,22 μm) được bố trí nối tiếp, được lọc kín riêng biệt.

Dung dịch thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học thể tích nhỏ được bào chế từ công thức và quy trình có chứa 5,44% mitoxantron sulfat, và có pH là 3,5, và áp suất thẩm thấu là 307 mmol/kg. Các hạt tinh thể nano tự lắp ráp dưới điều kiện gian bào sinh học có kích thước hạt là 60 nm. Lớp thứ nhất, thứ hai và thứ ba của hạch bạch huyết di căn sau khi tiêm kẽ mô dưới da có màu xanh đậm có thể nhìn thấy bằng mắt thường. Khối lượng và thể tích của hạch bạch huyết di căn của mỗi lớp trở về kích thước bình thường và gây độc đáng kể ở vị trí tiêm và các tế bào lympho.

Ví dụ 5

Công thức bột tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học và hàm lượng các thành phần cho 1000 liều tiêm được trình bày sau đây:

Mitoxantron hydroclorua	11,64 g
Manitol	16,0 g
Axit axetic	0,92 g
Natri axetat	0,10 g
Natri edetat	0,10 g
Manitol	200 g

Cacbon hoạt tính (được sử dụng trong quá trình bào chế và được loại bỏ sau khi hoàn thành)

Quá trình bào chế được thực hiện như sau:

Cân một lượng thích hợp các nguyên liệu thô và tá dược. Cho vào bể trộn cô đặc lượng nước dùng cho thuốc tiêm bằng 70% lượng thích hợp nêu trên. Cho tá dược ngoại trừ chất độn với lượng thích hợp nêu trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 15 phút. Sau đó, cho mitoxantron hydroclorua với lượng thích hợp nêu trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 20 phút. Cacbon hoạt tính được nạp vào và được khuấy để hấp phụ trong 20 phút ở 40-60°C. Dung dịch cô đặc được lọc qua lõi lọc gấp nếp bằng thép không gỉ cỡ 3 μm và được chuyển vào bể hòa loãng và nước pha tiêm được thêm vừa đủ và dung dịch được khuấy trong 10 phút. Dung dịch thuốc được lọc qua hai bộ lọc vô trùng (với kích thước lỗ lọc là 0,22 μm) được bố trí nối tiếp. Manitol được thêm vào và được hòa tan trong dung dịch thuốc. Nước được loại bỏ nhờ quá trình đông khô để thu được thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học dạng bột đông khô, và có thể được sử dụng để tiêm kẽ sau khi tái hòa tan và lắc đều trước khi sử dụng.

Bột tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học được bào chế theo công thức và quy trình này có bề mặt nhẵn mượt không bị xẹp và hao hụt sau khi đông khô. Sau khi tái hòa tan với nước pha tiêm, thuốc tiêm mitoxantron hydroclorua được tạo thành có chứa 0,52% mitoxantron hydroclorua, và có pH là 3,5, và áp suất thẩm thấu là 938 mmol/kg. Các hạt tinh thể nano tự lắp ráp dưới điều kiện gian bào sinh học có kích thước hạt là 40 nm. Lớp thứ nhất, thứ hai và thứ ba của hạch bạch huyết di căn sau khi tiêm kẽ mô dưới da có màu xanh đậm có thể nhìn thấy bằng mắt thường. Khối lượng và thể tích của hạch bạch huyết di căn của mỗi lớp giảm đáng kể hoặc trở về kích thước bình thường và không có sự gây độc mào đáng kể ở vị trí tiêm hoặc các tế bào lympho.

Ví dụ 6

Công thức bột tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học và hàm lượng các thành phần cho 1000 liều tiêm được trình bày sau đây:

Mitoxantron phosphat

11,64 g

Sorbitol	8,0 g
Axit xitric	0,74 g
Natri xitrat	0,30 g
Natri edetat	0,10 g
Sucroza	300 g
Nước pha tiêm	2000 ml
Cacbon hoạt tính (được sử dụng trong quá trình bào chế và được loại bỏ sau khi hoàn thành)	2 g

Quá trình bào chế được thực hiện như sau:

Cân một lượng thích hợp các nguyên liệu thô và tá dược. Cho vào bể trộn cô đặc lượng nước dùng cho thuốc tiêm bằng 70% lượng thích hợp nêu trên. Cho tá dược ngoại trừ chất độn với lượng thích hợp nêu trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 15 phút. Sau đó, cho mitoxantron phosphat với lượng thích hợp nêu trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 20 phút. Cacbon hoạt tính được nạp vào và được khuấy để hấp phụ trong 20 phút ở 40-60°C. Dung dịch cô đặc được lọc qua lõi lọc gấp nếp bằng thép không gỉ cỡ 3 µm và được chuyển vào bể hòa loãng và nước pha tiêm được thêm vừa đủ và dung dịch được khuấy trong 10 phút. Dung dịch thuốc được lọc qua hai bộ lọc vô trùng (với kích thước lỗ lọc là 0,22 µm) được bố trí nối tiếp. Sucroza được thêm vào và được hòa tan trong dung dịch thuốc. Nước được loại bỏ nhờ quá trình đông khô để thu được thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học dạng bột đông khô, và có thể được sử dụng để tiêm kẽ sau khi tái hòa tan và lắc đều trước khi sử dụng.

Bột tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học được bào chế theo công thức và quy trình này có bề mặt bị xẹp và hao hụt sau khi đông khô. Sau khi tái hòa tan với nước pha tiêm, thuốc tiêm mitoxantron phosphat được tạo thành có chứa 0,499% mitoxantron phosphat, và có pH là 5,5, và áp suất thẩm thấu là 307 mmol/kg. Các hạt tinh thể nano tự lắp ráp dưới điều kiện gian bào sinh học có kích thước hạt là 55 nm. Lớp thứ nhất, thứ hai và thứ ba của hạch bạch huyết di căn sau khi tiêm kẽ mô dưới da có màu xanh đậm có thể nhìn thấy bằng mắt thường. Khối lượng và thể tích của hạch bạch huyết di căn của mỗi lớp giảm đáng kể hoặc

trở về kích thước bình thường và không có sự gây độc mào đáng kể ở vị trí tiêm hoặc các tế bào lympho.

Ví dụ 7

Công thức bột tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học và hàm lượng các thành phần cho 1000 liều tiêm được trình bày sau đây:

Mitoxantron axetat	11,64 g
PEG 400	30,0
Axit axetic	0,92
Natri axetat	0,10
Natri edetat	0,10
Trehaloza	200 g
Nước pha tiêm	2000 ml
Cacbon hoạt tính (được sử dụng trong quá trình bào chế và được loại bỏ sau khi hoàn thành)	2 g

Quá trình bào chế được thực hiện như sau:

Cân một lượng thích hợp các nguyên liệu thô và tá dược. Cho vào bể trộn cô đặc lượng nước dùng cho thuốc tiêm bằng 70% lượng thích hợp nêu trên. Cho tá dược ngoại trừ chất độn với lượng thích hợp nêu trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 15 phút. Sau đó, cho mitoxantron axetat với lượng thích hợp nêu trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 20 phút. Cacbon hoạt tính được nạp vào và được khuấy để hấp phụ trong 20 phút ở 40-60°C. Dung dịch cô đặc được lọc qua lõi lọc gấp nếp bằng thép không gỉ cỡ 3 µm và được chuyển vào bể hòa loãng và nước pha tiêm được thêm vừa đủ và dung dịch được khuấy trong 10 phút. Dung dịch thuốc được lọc qua hai bộ lọc vô trùng (với kích thước lỗ lọc là 0,22 µm) được bố trí nối tiếp. Trehaloza được thêm vào và được hòa tan trong dung dịch thuốc. Nước được loại bỏ nhờ quá trình đông khô để thu được thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học dạng bột đông khô, và có thể được sử dụng để tiêm kẽ sau khi tái hòa tan và lắc đều trước khi sử dụng.

Bột tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học được bào chế theo công thức và quy trình này có bề mặt bị xẹp và hao hụt sau khi đông khô. Sau khi tái hòa tan với nước pha tiêm, thuốc tiêm mitoxantron axetat được tạo thành có chứa 0,52% mitoxantron axetat, và có pH là 3,5, và áp suất thẩm thấu là 1503 mmol/kg. Các hạt tinh thể nano tự lắp ráp dưới điều kiện gian bào sinh học có kích thước hạt là 60 nm. Lớp thứ nhất, thứ hai và thứ ba của hạch bạch huyết di căn sau khi tiêm kẽ mô dưới da có màu xanh đậm có thể nhìn thấy bằng mắt thường. Khối lượng và thể tích của hạch bạch huyết di căn của mỗi lớp giảm đáng kể hoặc trở về kích thước bình thường và không có sự gây độc mào đáng kể ở vị trí tiêm hoặc các tế bào lympho.

Trong sáng chế, 1000 liều tiêm được hiểu là thuốc tiêm được chia làm 1000 phần.

Ví dụ so sánh 1

Công thức dung dịch tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học thể tích nhỏ và hàm lượng các thành phần cho 1000 liều tiêm được trình bày sau đây:

Mitoxantron hydroclorua	0,23 g
Axit axetic	0,52 g
Natri axetat	0,40 g
Natri edetat	0,10 g
Nước pha tiêm	2000 ml
Cacbon hoạt tính (được sử dụng trong quá trình bào chế và được loại bỏ sau khi hoàn thành)	2 g

Cân một lượng thích hợp các nguyên liệu thô và tá dược. Cho vào bể trộn cô đặc lượng nước dùng cho thuốc tiêm bằng 70% lượng thích hợp nêu trên. Cho tá dược với lượng thích hợp nêu trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 15 phút. Sau đó, cho mitoxantron hydroclorua với lượng thích hợp nêu trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 20 phút. Cacbon hoạt tính được nạp vào và được khuấy để hấp phụ trong 20 phút ở 40-60°C. Dung dịch cô đặc được lọc qua lõi lọc gấp nếp bằng thép không gỉ cỡ 3 µm và được chuyển vào bể hòa loãng và nước pha tiêm được thêm vừa đủ và dung dịch được khuấy trong 10 phút. Dung dịch thuốc được lọc qua hai bộ lọc vô trùng (với kích thước lỗ lọc là 0,22 µm) được bố trí nối tiếp, được lọc kín riêng biệt.

Dung dịch thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học thể tích nhỏ được bào chế từ công thức và quy trình có chứa 0,01% mitoxantron hydroclorua, và có pH là 6,83, và áp suất thẩm thấu là 196 mmol/kg. Chỉ có lớp thứ nhất của hạch bạch huyết di căn sau khi tiêm kẽ mô dưới da có màu xanh nhạt và rất khó để nhận ra bằng mắt thường. Khối lượng và thể tích của mỗi lớp hạch bạch huyết di căn không bị tác động nhiều.

Ví dụ so sánh 2

Công thức dung dịch tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học thể tích nhỏ và hàm lượng các thành phần cho 1000 liều tiêm được trình bày sau đây:

Mitoxantron hydroclorua	232,8 g
Axit axetic	1,52 g
Natri axetat	0,10 g
Natri edetat	0,10 g
Nước pha tiêm	2000 ml
Cacbon hoạt tính (được sử dụng trong quá trình bào chế và được loại bỏ sau khi hoàn thành)	2 g

Cân một lượng thích hợp các nguyên liệu thô và tá dược. Cho vào bể trộn cô đặc lượng nước dùng cho thuốc tiêm bằng 70% lượng thích hợp nêu trên. Cho tá dược với lượng thích hợp nêu trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 15 phút. Sau đó, cho mitoxantron hydroclorua với lượng thích hợp nêu trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 20 phút. Cacbon hoạt tính được nạp vào và được khuấy để hấp phụ trong 20 phút ở 40-60°C. Dung dịch cô đặc được lọc qua lõi lọc gấp nếp bằng thép không gỉ cỡ 3 μm và được chuyển vào bể hòa loãng và nước pha tiêm được thêm vừa đủ và dung dịch được khuấy trong 10 phút. Dung dịch thuốc được lọc qua hai bộ lọc vô trùng (với kích thước lỗ lọc là 0,22 μm) được bố trí nối tiếp, được lọc kín riêng biệt.

Dung dịch thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học thể tích nhỏ được bào chế từ công thức và quy trình có chứa 10,34% mitoxantron hydroclorua, và có pH là 1,66, và áp suất thẩm thấu là 196 mmol/kg. Các hạt tinh thể nano tự lắp ráp dưới điều kiện gian bào sinh học có kích thước hạt là 120 nm. Lớp thứ nhất, thứ hai và thứ ba của hạch bạch huyết di căn sau

khi tiêm kẽ mô dưới da có màu xanh đậm có thể nhìn thấy bằng mắt thường. Khối lượng và thể tích của hạch bạch huyết di căn của mỗi lớp giảm đáng kể hoặc trở về kích thước bình thường nhưng gây độc đáng kể ở vị trí tiêm hoặc các tế bào lympho.

Ví dụ đối chứng

1. Bào chế dung dịch đối chứng

Dung dịch Isosulfan Blue (IB) được sử dụng để làm dung dịch đối chứng. Công thức và quá trình bào chế được thực hiện như sau:

Công thức:

IB (cơ chất thuốc)	10 g
Dinatri hydrogenphosphat (đậm)	6,6 g
Kali dihydrogenphosphat (đậm)	2,7 g
Natri clorua (chất điều hòa áp suất thẩm thấu)	20 g

Nước pha tiêm được thêm vào tới 1000 ml.

Dùng cho 200 liều tiêm.

Quy trình bào chế:

Cân một lượng như bảng trên các chất dinatri hydrogenphosphat, kali dihydrogenphosphat và natri clorua, cho vào 80% lượng nước như bảng trên và hòa tan chúng bằng cách khuấy trong 15 phút. Sau đó, cho IB với lượng như trên vào bể trộn và hòa tan bằng cách khuấy trong 20 phút. Than dùng cho được phẩm được thêm vào và được khuấy để hấp phụ trong 20 phút ở 50°C. Dung dịch cô đặc được lọc qua thanh cacbon 3 µm và được chuyển vào trong bể hòa loãng với chất tẩy rửa, và dịch tẩy rửa được kết hợp vào trong thuốc tiêm. Nước pha tiêm được thêm vào dung dịch thuốc tới lượng đã mô tả ở trên và được khuấy khoảng 10 phút. Mẫu được đưa đi kiểm tra các đặc tính, pH và thành phần. Dung dịch thuốc đã qua kiểm tra được lọc qua màng lọc 0,22 µm, và được lấy mẫu để kiểm tra các tạp chất có thể nhìn thấy được. Dung dịch tiêm đã qua kiểm tra các tạp chất có thể nhìn thấy được được làm sạch bằng khí nitơ, được lấp đầy và hàn kín lại với thể tích $5,1 \pm 0,1$ ml mỗi liều, và được

khử trùng ở 121°C trong 15 phút. Sau khi kiểm tra sự rò rỉ, kiểm tra ánh sáng, dán nhãn và đóng gói sẽ thu được thành phẩm cuối cùng.

2. Bào chế dạng nano đối chứng

Mitoxantron hydroclorua liposom (MIH-LIP) được sử dụng làm dạng nano đối chứng. Công thức và quy trình bào chế được thực hiện như sau:

Công thức:

Mitoxantron hydroclorua	4%
Lexitin đậu nành	400
Cholesterol	100
Đệm phosphat pH 7,4	30 ml

Quy trình bào chế:

MIH-LIP được bào chế bằng phương pháp màng mỏng: lexitin đậu nành và cholesterol được cân tương ứng với lượng đã mô tả trên và được hòa tan trong 5 ml ete khan; ete khan được loại bỏ hoàn toàn bằng cách quay làm bay hơi trong điều kiện chân không; một lượng thích hợp đệm phosphat được thêm vào làm hòa tan và thu được nhũ tương màu vàng sáng đồng nhất; nhũ tương được chuyển sang ống ly tâm làm bằng polypropylen; và ống được đặt trong bể đá để xử lý siêu âm với đầu dò trong 3 phút (siêu âm 50 giây và nghỉ 10 giây). Chất lỏng đục màu vàng sáng được rót vào trong bình đáy tròn chứa lượng đã cân trước mitoxantron hydroclorua, và được đưa vào quay làm bay hơi ở 37°C để tạo thành dung dịch dạng keo màu xanh đen đồng nhất và được giữ ở 4°C để sử dụng.

3. Xác định kích thước hạt

Nước muối sinh lý được sử dụng để mô phỏng môi trường sinh lý trong cơ thể, và thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học mitoxantron hydroclorua (thuốc tiêm MIH) được đặt trong môi trường sinh lý để kiểm tra khả năng tự lắp ráp trong điều kiện sinh học với kích thước hạt là thông số chỉ thị. Mitoxantron hydroclorua (MIH) là chất đặc biệt và các thiết bị xác định kích thước hạt truyền thống như máy phân tích kích thước hạt Malvern không thể xác định chính xác khoảng kích thước hạt của nó, trong khi kính hiển vi điện tử truyền qua

và các phương pháp xác định khác yêu cầu mẫu khô để xác định và không thể mô phỏng hoàn toàn hình thái tự lắp ráp thực tế trong môi trường in vivo. Bởi vậy, kính hiển vi lực nguyên tử (AFM) được sử dụng để xác định hình thái của các hạt nano tự lắp ráp này trong điều kiện sinh lý. Kết quả chỉ ra rằng MIH có thể tự lắp ráp thành các hạt nano với kích thước hạt khoảng 60nm trong điều kiện sinh lý, và các hạt nano có dạng tròn nguyên, phân tán đồng đều và kích thước hạt đồng nhất. Trong điều kiện axit, kích thước hạt cỡ khoảng 10 nm.

4. Xác định kích thước hạt IB

Theo phương pháp được mô tả nêu trên, dung dịch IB có cùng nồng độ với MIH được đặt trong điều kiện sinh lý, và kích thước hạt và hình thái của nó được xác định bằng kính hiển vi lực nguyên tử. Kết quả kiểm tra cho thấy trong điều kiện sinh lý, mỗi hạt IB có kích thước đồng nhất từ 10-20 nm và có dạng tròn nguyên.

5. Xác định kích thước hạt MIH-LIP

Kích thước hạt của dạng đối chứng MIH-LIP được xác định bằng máy phân tích kích thước hạt Malvern. Kết quả cho thấy kích thước hạt MIH-LIP là khoảng 140 nm.

6. Đánh giá giá trị pH

6.1. Ảnh hưởng của pH tới sự ổn định của thuốc

Mitoxantron hydroclorua được sử dụng làm thuốc mô hình. pH của thuốc tiêm được điều chỉnh tương ứng tới các giá trị 1,5, 2,0, 2,5, 3,5, 4,5, 5,5, 6,0, 6,5, và 7,0. Sau một giờ điều chỉnh giá trị pH, hàm lượng của thuốc được xác định sau khi được lọc qua màng 0,22 μm . Khi pH nằm trong khoảng 1,5-6,0 thì hàm lượng thuốc nằm trong khoảng $98,45 \pm 0,61$ - $101,72 \pm 0,20\%$ Khi pH ở giá trị 6,5 và 7,0 thì hàm lượng thuốc giảm đáng kể, tương ứng là $83,76 \pm 0,61\%$ và $75,38 \pm 0,22\%$ Điều này chỉ ra rằng nếu pH của thuốc tiêm lớn hơn 6,0 thì thuốc không ổn định và bị tủa.

6.2. Ảnh hưởng của pH tới khả năng nhắm đích của thuốc

Mitoxantron hydroclorua được sử dụng làm thuốc mô hình. pH của thuốc tiêm được điều chỉnh tương ứng tới các giá trị 1,5, 2,0, 2,5, 3,5, 4,5, 5,5, và 6,0. Phương thức tiêm kẽ mô là tiêm dưới da bàn chân của giống chuột Côn Minh (Trung Quốc). Tại các thời điểm xác định trước, chuột được bẻ trật khớp cổ, và lớp thứ nhất, lớp thứ hai và thứ ba của hạch bạch

huyết của chuột được lấy ra để nhuộm màu với thuốc nhuộm. Khi pH nhỏ hơn 2,0, chỉ có lớp thứ nhất của hạch bạch huyết bắt màu thuốc nhuộm. Khi pH nằm trong khoảng 2,0-6,0, cả ba lớp của hạch bạch huyết đều bắt màu thuốc nhuộm; tuy nhiên khi pH có giá trị là 2,0, 2,5 hoặc 6,0 thì lớp thứ ba của hạch bạch huyết có màu xanh nhạt, trong khi đó khi pH nằm trong khoảng 3,5-5,5 thì cả ba lớp đều có màu xanh đậm.

7. Đánh giá áp suất thẩm thấu

7.1. Ảnh hưởng của áp suất thẩm thấu tới sự kích ứng tại vị trí tiêm

Mitoxantron hydroclorua được sử dụng làm thuốc mô hình. Áp suất thẩm thấu của thuốc tiêm được điều chỉnh tương ứng tới các giá trị 112, 196, 285, 307, 1503, 2317, và 3011 mmol/kg. Phương thức tiêm kẽ mô là tiêm dưới da bàn chân của giống chuột Côn Minh. Tại các thời điểm xác định trước, chuột được bẻ trật khớp cổ, và vị trí tiêm chuột được nhuộm H&E để đánh giá kích ứng cục bộ tại vị trí tiêm. Khi áp suất thẩm thấu của thuốc tiêm là 3011 mmol/kg, xảy ra hiện tượng sưng đỏ và nhuộm H&E có thấy có sự kích ứng cục bộ, trong khi đó không ghi nhận hiện tượng này với các giá trị áp suất thẩm thấu khác.

7.2. Ảnh hưởng của áp suất thẩm thấu tới khả năng nhắm đích của thuốc

Mitoxantron hydroclorua được sử dụng làm thuốc mô hình. Áp suất thẩm thấu của thuốc tiêm được điều chỉnh tương ứng tới các giá trị 112, 196, 285, 307, 1503, 2317, và 3011 mmol/kg. Phương thức tiêm kẽ mô là tiêm dưới da bàn chân của giống chuột Côn Minh. Tại các thời điểm xác định trước, chuột được bẻ trật khớp cổ, và lớp thứ nhất, lớp thứ hai và thứ ba của hạch bạch huyết của chuột được lấy ra để nhuộm màu với thuốc nhuộm. Khi áp suất thẩm thấu nhỏ hơn 285 mmol/kg, chỉ có lớp thứ nhất của hạch bạch huyết bắt màu thuốc nhuộm. Khi áp suất thẩm thấu nằm trong khoảng 285-2317 mmol/kg, cả ba lớp của hạch bạch huyết đều bắt màu thuốc nhuộm; tuy nhiên khi áp suất thẩm thấu có giá trị là 285 hoặc 2317 mmol/kg, thì lớp thứ ba của hạch bạch huyết có màu xanh nhạt, trong khi đó khi áp suất thẩm thấu nằm trong khoảng 307-1503 mmol/kg thì cả ba lớp của hạch bạch huyết đều có màu xanh đậm.

8. Đánh giá khả năng nhắm đích bạch huyết sau khi tiêm kẽ mô

Khả năng nhắm đích bạch huyết của hệ thống dẫn thuốc bằng hạt nano tự lắp ráp sinh học in vivo được đánh giá. Phương pháp tiêm kẽ mô được chọn là tiêm dưới da bàn chân

chuột Côn Minh thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học chứa 20 pL mitoxantron hydroclorua (thuốc tiêm MIH). Tại các thời điểm xác định trước, chuột được bẻ trật khớp cổ, và lớp thứ nhất, lớp thứ hai và thứ ba của hạch bạch huyết của chuột được lấy ra để nhuộm màu với thuốc nhuộm và hàm lượng MIH trong hạch bạch huyết được xác định bằng sắc ký lỏng cao áp hiệu năng cao (HPLC). Theo kết quả kiểm tra, diện tích dưới đường cong thời gian-nồng độ (AUC) và nồng độ tại đỉnh cao nhất (Cmax) cho thấy tiêm kẽ mô thuốc tiêm MIH có hiệu quả nhắm đích tốt đối với lớp thứ nhất của hạch bạch huyết (PLN), lớp thứ hai của hạch bạch huyết (ILN) và lớp thứ ba của hạch bạch huyết (RLN), và theo kết quả xác định hàm lượng thuốc trong máu (không phát hiện thuốc trong máu), hiệu quả nhắm đích đạt 100%, tức là kích thước hạt sau khi tự lắp ráp bằng cách tiêm kẽ mô cho phép các hạt này đi hoàn toàn vào trong hệ thống bạch huyết mà không đi vào vòng tuần hoàn máu.

Bảng 1. Các thông số dược động học trong hạch bạch huyết sau khi tiêm thuốc tiêm MIH dưới da

Dữ liệu	thuốc tiêm MIH		
	PLN	ILN	RLN
AUC (mg*h/kg)	3102,01 ±151,21	2249,78 ±109,71	963,89 ±98,13
Cmax (mg/kg)	221,12 ±35,55	157,56 ±21,43	373,86 ±16,92

Trong đó:

PLN: Hạch bạch huyết kheo

ILN: Hạch bạch huyết chậu hông

RLN: Hạch bạch huyết thận

AUC (diện tích vùng dưới đường cong thời gian-nồng độ thuốc)

Cmax (nồng độ đạt đỉnh tối đa)

IB và MIH-LIP được sử dụng đồng thời làm dạng đối chứng để đánh giá ảnh hưởng của các kính thước hạt tới khả năng nhắm đích bạch huyết của hệ thống vận chuyển thuốc. IB (cỡ 20 nm), thuốc tiêm MIH (cỡ 60 nm) và MIH-LIP (cỡ 130 nm) được sử dụng bằng cách tiêm kẽ mô. Kết quả tiêm sau hai giờ được thể hiện trên bảng 2 dưới đây. Kết quả cho thấy tinh thể nano tự lắp ráp sinh học mitoxantron hydroclorua tạo ra phân tử thuốc mitoxantron

hydroclorua có kích thước hạt xác định giúp chúng có khả năng nhắm đích bạch huyết tốt hơn so với liposom và thuốc tiêm thông thường.

Bảng 2. Khả năng nhắm đích bạch huyết của các dạng với các kích thước hạt khác nhau

Nồng độ của thuốc được tích lũy ở hạch bạch huyết (ng/ml)								
PLN			ILN			RLN		
20 nm	60 nm	130 nm	20 nm	60 nm	130 nm	20 nm	60 nm	130 nm
23,044	2137	1551,005	6,999	1455	1124,89	0,893	512	481,945

Trong đó:

PLN: Hạch bạch huyết kheo

ILN: Hạch bạch huyết chậu hông

RLN: Hạch bạch huyết thận

9. Đánh giá tốc độ nhắm đích bạch huyết

Chín con chuột Côn Minh được chia ngẫu nhiên thành ba nhóm: Nhóm thuốc tiêm MIH, nhóm MIH-LIP và nhóm IB. Ba con chuột của mỗi nhóm được tiêm dưới da ở bàn chân. Sau 10 phút tiêm, chuột được trật khớp cổ và giải phẫu. Các lớp thứ nhất, thứ hai và thứ ba của hạch bạch huyết được thu và quan sát hiệu quả bắt màu thuốc nhuộm. Kết quả thử nghiệm cho thấy tất cả ba lớp của hạch bạch huyết của nhóm thuốc tiêm MIH đều bắt màu đậm hơn so với nhóm IB và nhóm MIH-LIP với hiệu quả tốt, cụ thể là hiệu quả đánh dấu hạch bạch huyết tốt. Thuốc tiêm MIH có ưu điểm hơn so với MIH-LIP về mặt theo dõi hạch bạch huyết. Điều này có thể là do tính lưu động của dung dịch tiêm tốt hơn so với liposom.

10. Đánh giá hiệu quả trị liệu trên các hạch bạch huyết di căn

10.1. Đánh giá hiệu quả ức chế của tiêm kẽ mô cục bộ lên các khối u di căn bạch huyết

Dưới chế độ sử dụng cục bộ, kích thước lớp thứ nhất và lớp thứ hai của hạch bạch huyết ở các giai đoạn khác nhau được so sánh, và khối lượng và thể tích của các hạch bạch huyết cũng được đánh giá. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3. Từ kết quả phân tích dữ liệu có thể thấy, thuốc tiêm MIH có hiệu quả ức chế đáng kể đối với ung thư di căn bạch huyết, thể tích và khối lượng của mỗi lớp khối u di căn bạch huyết giảm đáng kể, và hiệu lực của nó

liên quan đến giai đoạn hóa trị. Hiệu quả ức chế của sử dụng cục bộ thuốc tiêm MIH lên lớp thứ hai của các u bạch huyết di căn không có sự khác biệt đáng kể với hiệu quả ức chế lên lớp thứ nhất của u bạch huyết di căn ($p>0,05$).

Bảng 3. So sánh kích thước hạch bạch huyết giữa các giai đoạn khác nhau trong nhóm tiêm cục bộ

	MPLN	MILN	MPLN	MILN
	(mm ³ , V)	(mm ³ , V)	(mg, m)	(ma, m)
Giai đoạn I	5,48	1,61	5,19	1,55
Giai đoạn II	1,92	0,76	1,94	0,92
Giai đoạn III	4,26	0,92	2,97	1,03
Giai đoạn IV	2,45	1,00	3,35	0,89

Trong đó:

Giai đoạn I: Giai đoạn thứ nhất hóa trị

Giai đoạn II: Giai đoạn thứ hai hóa trị

Giai đoạn III: Giai đoạn thứ ba hóa trị

Giai đoạn IV: Giai đoạn thứ tư hóa trị

MPLN: Hạch bạch huyết kheo di căn

MILN: Hạch bạch huyết chậu hông di căn

V: thể tích

m: khối lượng

10.2. So sánh hiệu quả ức chế tiêm tại chỗ và tiêm tĩnh mạch trên các u bạch huyết di căn

Các chế độ liều dùng khác nhau được thiết kế để so sánh hiệu quả hóa trị của phương pháp tiêm thuốc tiêm MIH cục bộ và tiêm trong tĩnh mạch vào các u bạch huyết ở các giai đoạn khác nhau. Dữ liệu thí nghiệm của nhóm tiêm cục bộ và tiêm trong tĩnh mạch được liệt kê dưới đây. Từ các kết quả này có thể kết luận rằng sử dụng thuốc tiêm cục bộ có hiệu quả ức chế tới u bạch huyết tốt hơn và khởi phát hiệu quả nhanh chóng hơn so với tiêm tĩnh mạch hệ thống.

Bảng 4. So sánh kích thước hạch bạch huyết giữa nhóm tiêm tại chỗ và nhóm tiêm tĩnh mạch ở các giai đoạn khác nhau

	Nhóm tiêm tại chỗ				Nhóm tiêm tĩnh mạch			
	MPLN	MPLN	MILN	MILN	MPLN	MPLN	MILN	MILN
	(mm ³ , V)	(mg, m)	(mm ³ , V)	(mg, m)	(mm ³ , V)	(mg, m)	(mm ³ , V)	(mg, m)
Giai đoạn I	5,48	5,19	1,95	1,55	8,05	9,32	2,85	2,01
Giai đoạn II	1,92	1,94	0,76	0,92	7,59	8,17	2,50	1,95
Giai đoạn III	4,26	2,97	0,92	1,03	8,00	3,51	2,00	1,64
Giai đoạn IV	2,45	3,35	1,00	0,89	2,78	3,90	1,25	1,03

Trong đó:

Giai đoạn I: Giai đoạn thứ nhất hóa trị

Giai đoạn II: Giai đoạn thứ hai hóa trị

Giai đoạn III: Giai đoạn thứ ba hóa trị

Giai đoạn IV: Giai đoạn thứ tư hóa trị

MPLN: Hạch bạch huyết kheo di căn

MILN: Hạch bạch huyết chậu hông di căn

V: thể tích

m: khối lượng

Các phương án thực hiện trên chỉ nhằm mục đích minh họa để làm sáng tỏ sáng chế mà không nhằm hạn chế sáng chế, và các thay đổi và thay thế được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật mà không rời khỏi phạm vi kỹ thuật của sáng chế đều thuộc phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học có chức năng nhắm đích bạch huyết, trong đó, thành phần thuốc tiêm có chứa 0,05-5% mitoxantron hoặc muối của nó và 0,1-10% tỷ lệ khối lượng/thể tích (g/ml) chất điều hòa áp suất thẩm thấu, và phần còn lại là dung môi, tốt nhất là thuốc tiêm bao gồm thêm 0,001-0,1% đệm, 0,01-0,1% chất chống oxy hóa, 0,05-1% chất hấp phụ, và 0-20% chất độn, được đặc trưng bởi pH của thuốc tiêm là 2,0-6,0, áp suất thẩm thấu của thuốc tiêm là 285-2317 mmol/kg và kích thước hạt trong điều kiện sinh lý là 30-100 nm.

2. Thuốc tiêm theo điểm 1, được đặc trưng bởi, nồng độ của mitoxantron hoặc muối của nó trong thuốc tiêm là 0,1-1%.

3. Thuốc tiêm theo điểm 1, được đặc trưng bởi, pH của thuốc tiêm là 3,5-5,5, và tốt nhất là trong đó áp suất thẩm thấu của thuốc tiêm là 307-1503 mmol/kg.

4. Thuốc tiêm theo điểm bất kỳ 1-3, được đặc trưng bởi, muối của mitoxantron là một hoặc nhiều muối được chọn từ nhóm bao gồm muối hydroclorua, oxalat, sulfat, phosphat, axetat hoặc xitrat của mitoxantron, và tốt nhất là trong đó kích thước hạt trong điều kiện sinh lý là 30-60 nm.

5. Thuốc tiêm theo điểm bất kỳ 1-4, được đặc trưng bởi, thuốc tiêm có chứa một lượng thể tích nhỏ dung dịch pha tiêm và bột tiêm, trong đó lượng thể tích nhỏ dung dịch pha tiêm không chứa chất độn và bột tiêm chứa chất độn với lượng 0-20%.

6. Thuốc tiêm theo điểm bất kỳ 1-4, được đặc trưng bởi, chất điều hòa áp suất thẩm thấu là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm natri clorua, glucoza, sorbitol, manitol, glyxerin, PEG, phosphat, hoặc xitrat;

đệm là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm axit axetic, natri axetat, axit xitric hoặc natri xitrat;

chất chống oxy hóa là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm natri sunfit, natri hydrosulfit, natri metasulfit, natri thiosulfat, hoặc natri edetat; chất độn là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm các monosacarit, cụ thể là glucoza, fructoza, galactoza, riboza, hoặc deoxyriboza, hoặc disacaroza, cụ thể như sucroza, trehaloza, maltoza, hoặc

lactoza, hoặc đường polyme, cụ thể như manitol, sorbitol, lactitol, xylitol, maltitol, hoặc erythritol; và chất hấp phụ là cacbon hoạt tính.

7. Thuốc tiêm theo điểm bất kỳ 1-4, được đặc trưng bởi, sau khi chức năng nhắm đích bạch huyết được thực thi, các hạch bạch huyết tạo ra màu xanh có thể nhìn được bằng mắt thường và/hoặc các hạch bạch huyết chứa u di căn sẽ co lại hoặc trở về kích thước bình thường.

8. Thuốc tiêm theo điểm bất kỳ 1-6, được đặc trưng bởi, thuốc tiêm được sử dụng dưới dạng dung dịch, và mitoxantron hoặc muối của nó có dạng phân tử được hòa tan hoàn toàn.

9. Thuốc tiêm theo điểm bất kỳ 1-7, được đặc trưng bởi, sau khi thuốc tiêm dạng dung dịch được sử dụng tiêm kẽ mô, các tinh thể nano sẽ tự lắp ráp ở vị trí tiêm.

10. Thuốc tiêm theo điểm bất kỳ 1-7, được đặc trưng bởi, phương thức tiêm để thực hiện chức năng nhắm đích bạch huyết là phương thức tiêm kẽ mô.

11. Thuốc tiêm theo điểm 8, được đặc trưng bởi, phương thức tiêm được chọn từ nhóm bao gồm tiêm dưới da, tiêm bắp, tiêm dưới niêm mạc, tiêm trong màng bụng, tiêm nội mô, tiêm ngoại mô hoặc kết hợp giữa chúng.

12. Phương pháp bào chế thuốc tiêm theo điểm bất kỳ 1-9, được đặc trưng bởi, thuốc tiêm là loại dung dịch thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học thể tích nhỏ, và phương pháp bào chế bao gồm các bước sau: cân một lượng thích hợp các nguyên liệu thô và tá dược, thêm 70% lượng nước pha tiêm đã định trước vào trong bể phối trộn cô đặc, thêm lượng đã định trước tá dược, khuấy hòa tan trong 15 phút, sau đó thêm mitoxantron hoặc muối của chúng, khuấy hòa tan trong 20 phút, nạp thêm cacbon hoạt tính, khuấy hấp phụ trong 20 phút ở 40-60°C, lọc dung dịch cô đặc qua lõi lọc gấp nếp bằng thép không gỉ cỡ 3 μm và được chuyển vào trong bể hòa loãng, bổ sung nước pha tiêm lên thể tích tổng, khuấy trong 10 phút, lọc dung dịch thuốc qua liên tiếp hai bộ lọc vô trùng 0,22 μm , và đóng vào các lọ riêng biệt và hàn kín.

13. Phương pháp bào chế thuốc tiêm theo điểm bất kỳ 1-9, được đặc trưng bởi, thuốc tiêm là bột tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học, và phương pháp bào chế bao gồm các bước sau: cân một lượng thích hợp các nguyên liệu thô và tá dược, thêm 70% lượng nước pha tiêm đã định trước vào trong bể phối trộn cô đặc, thêm lượng đã định trước tá dược, khuấy hòa tan

trong 15 phút, sau đó thêm mitoxantron hoặc muối của chúng, khuấy hòa tan trong 20 phút, nạp thêm cacbon hoạt tính, khuấy hấp phụ trong 20 phút ở 40-60°C, lọc dung dịch cô đặc qua lõi lọc gấp nếp bằng thép không gỉ cỡ 3 μm và được chuyển vào trong bể hòa loãng, bổ sung nước pha tiêm lên thể tích tổng, khuấy trong 10 phút, lọc dung dịch thuốc qua liên tiếp hai bộ lọc vô trùng 0,22 μm , hòa tan manitol vào trong dung dịch thuốc, và loại nước bằng cách đông khô để thu được thuốc tiêm tinh thể nano tự lắp ráp sinh học dạng bột, loại này được sử dụng tiêm kẽ mô bằng cách hydrat hóa và lắc đều trước khi sử dụng, trong đó môi trường hydrat hóa là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm bao gồm nước pha tiêm, nước muối sinh lý và dịch truyền glucoza.