



(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) 
1-0022325

(51)⁷ **A61K 9/127, 31/337, 9/16**

(13) **B**

(21)	1-2012-03067	(22)	20.05.2011		
(86)	PCT/EP2011/058275	20.05.2011	(87)	WO2011/144745A2	24.11.2011
(30)	61/347,222	21.05.2010	US		
	10163643.9	21.05.2010	EP		
(45)	25.11.2019	380	(43)	25.01.2013	298
(73)	Syncore Biotechnology Co., Ltd. (TW) 84 Chung Shan Road, Tung Shan Shine, I-Lan, Taiwan				
(72)	HAAS, Heinrich (DE), FATTLER, Ursula (DE)				
(74)	Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)				

(54) **CHẾ PHẨM LIPOSOM CHỨA HỢP CHẤT ỨA CHẤT BÉO VÀ QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình điều chế liposom có khả năng tăng nạp được chất và/hoặc hoạt chất dùng để chuẩn đoán bệnh và/hoặc chất dùng trong mỹ phẩm mà hầu như được hòa tan bởi màng liposom, thể phân tán liposom có độ ổn định tăng đối với việc giải phóng hoạt chất và/hoặc chất dùng trong mỹ phẩm từ liposom thu được từ quy trình nêu trên, và được phẩm hoặc mỹ phẩm chứa thể phân tán liposom ổn định này. Quy trình điều chế có thể bao gồm các bước loại nước và hydrat hóa lại thể phân tán liposom mà các bước này có thể được thực hiện bằng cách sấy phun.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình điều chế liposom có khả năng chứa gia tăng các hoạt chất dùng trong dược phẩm và/hoặc dùng để chẩn đoán bệnh và/hoặc các chất dùng trong mỹ phẩm mà về cơ bản được hòa tan bởi màng liposom, thể phân tán liposom có độ ổn định gia tăng về đặc tính giải phóng hoạt chất và/hoặc chất dùng trong mỹ phẩm từ liposom thu được từ quy trình này, và dược phẩm hoặc mỹ phẩm chứa thể phân tán liposom ổn định đã nêu. Quy trình điều chế này có thể bao gồm bước loại nước và bước hydrat hóa lại thể phân tán liposom, các bước này có thể được thực hiện bằng cách sấy phun.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Liposom là cấu trúc nhân tạo dạng túi bao gồm các màng đơn lớp hoặc đa lớp bao quanh ngăn chứa nước. Thông thường nhất, màng liposom được tạo ra từ lớp màng kép lipid, nhưng chúng cũng có thể bao gồm các hợp chất lưỡng phần dạng monome và polyme, kể cả các loại lưỡng phần, polyme và polypeptit khác (Antonietti and Forster 2003). Liposom được hình thành một cách tự nhiên khi lipid được phân tán trong môi trường nước trong các điều kiện thích hợp. Hầu hết các liposom có đặc tính không độc, không có tính kháng nguyên và dễ phân huỷ sinh học do chúng có đặc tính phân tử của màng của động vật có vú. Các dược chất và các hợp chất ưa chất béo hoặc lưỡng phần có thể được kết hợp vào màng liposom, các dược chất và các hợp chất ưa nước có thể được bao nang trong nhân nước của liposom.

Trong những năm gần đây, liposom đã trở thành một công cụ quan trọng để phân phối thuốc trong ngành công nghiệp dược phẩm (Gregoriadis 1995). Liposom có khả năng ảnh hưởng đến dược động học nhờ việc giải phóng kéo dài dược chất vào cơ thể hoặc làm giảm tác dụng phụ bằng cách hạn chế nồng độ tự do của dược chất. Bằng cách gắn kết phối tử với liposom hoặc làm cho chúng tích điện, liposom tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân phối hướng đích các dược chất đến vị trí tác dụng mong muốn. Bên cạnh ứng dụng trong dược phẩm, liposom cũng thường được sử dụng cho mỹ

phẩm.

Trong ứng dụng đối với dược phẩm hoặc mỹ phẩm, khi liposom được sử dụng để phân phối hoạt chất, thì việc quan trọng là kiểm soát và tối ưu hóa khả năng nạp hoạt chất của chế phẩm liposom và độ ổn định của chế phẩm liposom được nạp các hoạt chất hoặc hợp chất dùng trong mỹ phẩm này. Độ ổn định của chế phẩm là một đặc tính rất quan trọng trong quá trình điều chế, bảo quản và ứng dụng chế phẩm. Trong nhiều trường hợp, độ ổn định về mặt vật lý hoặc hóa học của sản phẩm liposom là hạn chế, điều này cần phải được xem xét khi lập kế hoạch cho quy trình điều chế (thời gian giữ), bảo quản (độ ổn định trong thời hạn sử dụng) và ứng dụng của sản phẩm (độ ổn định trong sử dụng).

Đối với ứng dụng trong dược phẩm, chế phẩm liposom thường được dùng bằng cách tiêm. Do vậy, liposom phải có mặt trong pha nước trong các điều kiện thích hợp để dùng qua đường tĩnh mạch (intravenous - iv) hoặc trong màng bụng (intraperitoneal - ip).

Chế phẩm liposom dùng trong dược phẩm cần phải đáp ứng được các tiêu chuẩn chất lượng cực kỳ nghiêm ngặt. Hầu hết các sản phẩm liposom lỏng hiện nay đều không ổn định trong khoảng thời gian bảo quản dài, do chúng trải qua các quá trình phân hủy hóa học và vật lý. Tuy nhiên, đối với dược phẩm, mong muốn có được chế phẩm cuối cùng ổn định trong khoảng thời gian ít nhất từ sáu tháng đến hai năm ở nhiệt độ trong phòng hoặc ở nhiệt độ trong tủ lạnh. Các yếu tố này hạn chế khả năng sử dụng liposom làm chất mang thực cho các hợp chất có hoạt tính sinh học. Để đạt được các yêu cầu như vậy đối với liposom, các kỹ thuật loại nước đã được phát triển.

Độ ổn định dài hạn của chế phẩm liposom tăng lên nhiều khi chúng được loại nước và bảo quản ở dạng chế phẩm khô chứ không phải là chế phẩm lỏng. Trước khi tiêm, sản phẩm liposom khô cần phải được hydrat hóa lại trong môi trường nước thích hợp tạo ra huyền phù nước để dùng. Do độ ổn định của chế phẩm liposom đã được hydrat hóa lại có thể còn bị hạn chế bởi các quá trình phân hủy hóa học và vật lý, việc gia tăng độ ổn định trong sử dụng của huyền phù liposom sẵn sàng để dùng ngay là một mục tiêu quan trọng khác của công nghệ bào chế dược phẩm.

Phương pháp ổn định hóa thường được sử dụng đối với huyền phù liposom trong nước bằng cách sấy đông được mô tả trong patent Mỹ số 4,229,360 và 4,247,411. Trong quy trình sấy đông, huyền phù liposom được làm đông lạnh và sau đó làm giảm áp suất, giúp loại bỏ nước đã đông lạnh nhờ quá trình thăng hoa. Thông thường, huyền phù nước chứa tá dược, như đường, để ngăn ngừa hoặc giảm thiểu các sai sót tạo ra do việc đông lạnh và loại nước gây ra. Quy trình sấy đông tạo ra liposom trong chất nền bảo vệ là tá dược mà từ đó, sau khi hydrat hóa lại, sẽ thu được sản phẩm lỏng đã nêu trước đây. Như đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 4,880,635, liposom có thể được bảo vệ khỏi các tác động bất lợi của bước loại nước và bước hydrat hóa lại nhờ sự có mặt của đường bảo vệ, không chỉ ở bên ngoài, mà còn ở bên trong liposom.

Phương pháp sấy phun, ví dụ như đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,089,181, là một quy trình khác để bào chế chế phẩm liposom đã được loại nước ổn định. Quy trình này đã được cải biến cho phù hợp từ quy trình trong ngành công nghiệp thực phẩm và sử dụng bước nguyên tử hóa huyền phù thành các giọt nhỏ bằng cách phun huyền phù đó, và sau đó làm bay hơi môi trường ra khỏi các giọt nhỏ này ở nhiệt độ cao. Tương tự quy trình sấy đông, huyền phù liposom có thể chứa tá dược, như đường, để bảo vệ màng liposom. So với quy trình sấy đông, quy trình sấy phun có ưu điểm đáng kể khi áp dụng ở quy mô lớn trong công nghiệp, do nó cho phép đạt công suất sản xuất cao hơn với chi phí thấp hơn và các kết quả công nghệ có thể điều chỉnh được. Tuy nhiên, nhiệt độ cao ở phương pháp này khiến cho các hoạt chất đã được bao nang cũng như các màng lipid đều phải chịu ứng suất.

Để làm ổn định huyền phù chứa dược chất hòa tan trong nước đã được bao nang trong liposom để sấy phun, patent Mỹ số 4,895,719 bộc lộ cách cân bằng nồng độ thẩm thấu cao ở bên trong được tạo ra do nồng độ dược chất hòa tan bên trong cao với nồng độ thẩm thấu cao ngang bằng của môi trường xung quanh.

Để làm ổn định dược chất kỵ nước trong pha nước của liposom, tài liệu WO 2007/005754 bộc lộ cách tạo phức đối với dược chất này bằng các cyclodextrin trước khi bao nang. Dược chất kỵ nước ở dạng phức được giữ lại trong liposom ở nồng độ cao, ngay cả với sự có mặt của gradien thẩm thấu chuyển màng do cyclodextrin gây ra. Tuy nhiên độ ổn định của hoạt chất đã được đưa vào màng liposom không được bộc lộ.

Sự có mặt của các chất tan có hoạt tính thẩm thấu, như đường hoặc ion, ở bên trong hoặc bên ngoài màng liposom tạo ra lực thẩm thấu. Cách mà gradien thẩm thấu chuyển màng tác động lên cấu trúc và động lực học của màng sinh học đã được nghiên cứu trong các tài liệu, và các mô hình nhằm mô tả hiện tượng giống như mối quan hệ ứng suất-sức căng và sự phân giải đã được đề xuất (Ertel, Marangoni et al. 1993; Hallett, Marsh et al. 1993). Một cách vắn tắt, thử nghiệm bởi tác giả và phương pháp phân tích kèm theo chỉ ra rằng sự trương nở lên của liposom ở ứng suất thẩm thấu nhất định tùy thuộc vào kích thước của chúng. Sự trương nở lên tới điểm hiệu suất tới hạn phụ thuộc kích thước đã được mô tả, tại đó xảy ra sự phân giải (lột qua). Các điều kiện mà trong đó liposom được mong đợi là có trạng thái căng thích hợp đã được đưa ra.

Liên quan đến việc điều chế liposom chứa được chất ưa chất béo có thời hạn sử dụng tăng, tài liệu WO 2004/002468 bộc lộ quy trình điều chế liposom chứa paclitaxel. Liposom này được tạo ra trong dung dịch đậm nền nước chứa trehaloza, tạo ra huyền phù liposom có nồng độ thẩm thấu bên trong và bên ngoài liposom ngang bằng. Sau đó, huyền phù liposom trong nước được loại nước. Quy trình loại nước có thể được thực hiện bằng cách sấy đông hoặc sấy phun. Đơn yêu cầu cấp độc quyền sáng chế này bộc lộ một số quy trình để sấy đông huyền phù liposom đã nêu. Sau khi loại nước, chế phẩm liposom có thể được hydrat hóa lại bằng cách bổ sung nước hoặc dung dịch nước vào. Tài liệu này không đưa ra dữ liệu so sánh về độ ổn định khi sử dụng của các chế phẩm liposom đã được loại nước bằng cách sấy đông hoặc bằng cách sấy phun trước khi hydrat hóa lại chúng.

Đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP 1795184 A1 bộc lộ phương pháp sản xuất bột từ dung dịch nước chứa các hạt keo có thể là liposom. Bột thu được có thể được hoàn nguyên để thu được các chế phẩm chứa liposom trong nước.

Với tình trạng kỹ thuật nêu trên, vấn đề cơ bản được giải quyết bởi sáng chế là quy trình bào chế liposom, chứa ít nhất một hoạt chất ưa chất béo và/hoặc chất dùng trong mỹ phẩm với tỷ lệ giữa chất này và chất béo là cao và có độ ổn định cao, đặc biệt là độ ổn định về mặt vật lý, và giải phóng chất này ra khỏi liposom. Đặc biệt, sáng chế liên quan đến quy trình điều chế chế phẩm liposom có thời gian giữ trong quá trình điều chế và độ ổn định khi sử dụng kéo dài, trong đó quy trình này bao gồm bước loại nước nhanh.

Vì vậy, giải pháp cho vấn đề nêu trên đạt được theo sáng chế bằng cách đề xuất các phương án nêu trong các điểm yêu cầu bảo hộ và được mô tả chi tiết hơn trong phần mô tả sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất giải pháp cho các vấn đề nêu trên, đó là chế phẩm liposom, trong đó ứng suất căng trên màng liposom được gây ra bởi lực thẩm thấu, và quy trình bào chế chế phẩm liposom này.

Cụ thể, sáng chế đề xuất quy trình bào chế huyền phù liposom trong pha nước với ít nhất một hoạt chất và/hoặc chất dùng trong mỹ phẩm có mặt trong màng liposom, trong đó huyền phù nói trên bao gồm ít nhất một chất có hoạt tính thẩm thấu trong pha nước, và trong đó nồng độ thẩm thấu của pha nước bên trong thể tích đã được bao nang liposom, O_{trong} , lớn hơn nồng độ thẩm thấu của pha nước bên ngoài thể tích đã được bao nang liposom, $O_{\text{ngoài}}$.

Liposom được đặc trưng bởi sự có mặt của ứng suất căng trên màng liposom (liposom được tạo ứng suất). Chúng có thể thu được trực tiếp trong quá trình tạo liposom hoặc ở bước xử lý bất kỳ sau khi tạo liposom.

Liposom đã được tạo ứng suất có thể thu được bằng cách tác động trực tiếp đến nồng độ thẩm thấu của pha nước bên trong và/hoặc bên ngoài liposom hoặc bằng cách làm thay đổi các đặc tính màng, như đóng gói phân tử, của màng liposom, trong đó liposom có mặt trong môi trường có nồng độ thẩm thấu nhất định.

Liposom đã được tạo ứng suất có thể được bào chế trực tiếp với hoạt chất và/hoặc chất dùng trong mỹ phẩm có mặt trong màng liposom. Theo cách khác, liposom đã được tạo ứng suất có thể được điều chế không cùng với chất mà sau đó được thêm vào liposom.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất quy trình điều chế chế phẩm liposom bao gồm các bước:

a) tạo ra chế phẩm liposom thứ nhất chứa huyền phù liposom trong pha nước,

trong đó liposom này chứa ít nhất một màng, trong đó màng này bao thể tích pha nước đã được bao nang trong liposom, và pha nước này chứa ít nhất một chất có hoạt tính thẩm thấu và có nồng độ thẩm thấu toàn phần ban đầu là O_1 , b) sau đó tạo ra gradien thẩm thấu trong pha nước của chế phẩm này, trong đó nồng độ thẩm thấu của pha nước bên ngoài thể tích đã được bao nang liposom, $O_{\text{ngoài}}$, là thấp hơn nồng độ thẩm thấu của pha nước bên trong thể tích đã được bao nang liposom, O_{trong} , để tạo ra chế phẩm liposom thứ hai (đã được tạo ứng suất),

c) tùy ý, loại nước của chế phẩm liposom thứ hai (đã được tạo ứng suất) để thu được chế phẩm đã được loại nước,

d) tùy ý, hydrat hóa lại chế phẩm đã được loại nước.

Tốt hơn, nếu chế phẩm liposom ở bước a) chứa ít nhất một hoạt chất hoặc chất dùng trong mỹ phẩm trong màng liposom. Theo cách khác, chất này có thể được bổ sung vào ở giai đoạn sau của quy trình sản xuất.

Bước b) có thể thực hiện bằng cách làm giảm nồng độ thẩm thấu toàn phần ban đầu O_1 của huyền phù liposom thu được từ bước a) để tạo ra chế phẩm liposom đã được tạo ứng suất có nồng độ thẩm thấu toàn phần O_2 thấp hơn nồng độ thẩm thấu O_1 .

Bước b) có thể được thực hiện bằng cách pha loãng huyền phù liposom thu được từ bước a) bằng môi trường nước có nồng độ thẩm thấu thấp hơn O_1 , hoặc bằng cách thẩm tách huyền phù bằng môi trường nước có nồng độ thẩm thấu thấp hơn O_1 . Theo cách đơn giản nhất, huyền phù liposom được pha loãng bằng nước.

Theo sáng chế, gradien thẩm thấu có thể được tạo ra hoặc được thay đổi ở các giai đoạn khác nhau trong quá trình điều chế chế phẩm liposom. Hơn nữa gradien thẩm thấu có thể thay đổi một lần hoặc nhiều lần ở một số giai đoạn của quy trình điều chế. Điều này có thể đạt được dễ dàng theo các quy trình giống hoặc khác như được mô tả sau đây. Quy trình điều chế chế phẩm liposom liên quan đến tất cả các bước được thực hiện trước ứng dụng cuối cùng của huyền phù liposom.

Bước b) của quy trình theo sáng chế có thể bao gồm các bước sau:

b1) loại nước đối với chế phẩm liposom ở bước a) để thu được chế phẩm

liposom đã được loại nước, và

b2) hydrat hóa lại chế phẩm liposom đã được loại nước trong các điều kiện để tạo ra chế phẩm liposom đã được tạo ứng suất, tốt hơn là trong môi trường nước.

Tốt hơn, nếu bước loại nước được thực hiện bằng cách sấy phun huyền phù liposom.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm thu được hoặc có thể thu được theo quy trình nêu trên.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm liposom chứa ít nhất một hoạt chất hoặc chất dùng trong mỹ phẩm trong màng liposom, trong đó màng liposom ở điều kiện ứng suất căng.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất chế phẩm liposom chứa ít nhất một hoạt chất hoặc chất dùng trong mỹ phẩm trong màng liposom, trong đó liposom có mặt trong pha lỏng có nồng độ thẩm thấu bên trong thể tích đã được bao nang bằng liposom (O_{trong}) lớn hơn nồng độ thẩm thấu của pha lỏng bên ngoài của thể tích đã được bao nang bằng liposom ($O_{\text{ngoài}}$).

Bất ngờ là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng huyền phù liposom chứa liposom, mà màng liposom của nó trong điều kiện ứng suất căng, có độ hoà tan cao hơn đối với các hợp chất ưa chất béo.

Do đó, sáng chế còn đề xuất quy trình điều chế chế phẩm liposom chứa ít nhất một dược chất ưa chất béo hoặc hợp chất dùng trong mỹ phẩm, quy trình này bao gồm các bước:

i) tạo ra chế phẩm liposom đã được tạo ứng suất, chứa huyền phù liposom trong pha nước,

ii) ủ chế phẩm liposom đã được tạo ứng suất nêu trên với ít nhất một hoạt chất hoặc chất dùng trong mỹ phẩm ưa chất béo, tùy ý ở dạng không hòa tan, và

iii) tùy ý tách chất không tan ra khỏi chế phẩm liposom, tốt hơn là bằng cách lọc hoặc ly tâm,

iv) tùy ý loại nước đối với chế phẩm liposom được ủ, và

v) tùy ý hydrat hóa lại chế phẩm liposom đã được loại nước này.

Liposom đã được tạo ứng suất có thể thu được theo quy trình bất kỳ trong số các quy trình nêu trên. Tốt nhất, nếu ít nhất một chất có hoạt tính thẩm thấu có mặt trong pha nước của huyền phù liposom, trong đó O_{trong} lớn hơn $O_{\text{ngoài}}$.

Tốt hơn, nếu hoạt chất hoặc chất dùng trong mỹ phẩm nêu trên có độ hoà tan kém trong nước.

Hoạt chất hoặc chất dùng trong mỹ phẩm nêu trên là ưa chất béo, và tốt hơn nếu có log P lớn hơn 1. Tốt hơn nữa, nếu hợp chất này là taxan, tốt nhất là paclitaxel hoặc chất dẫn xuất của nó.

Đã bất ngờ phát hiện ra rằng khả năng chứa các hợp chất ưa chất béo, kém hòa tan trong nước, như paclitaxel, của màng liposom có thể được cải thiện, và sự giải phóng các hợp chất này ra khỏi màng liposom có thể giảm, khi màng liposom chịu ứng suất, đặc biệt nếu pha nước đã được bao nang bằng liposom chứa chất có hoạt tính thẩm thấu hòa tan trong nước ở nồng độ cao hơn bên ngoài pha đã được bao nang bằng liposom. Khả năng chứa hợp chất ưa chất béo với lượng lớn hơn của các liposom này so với các liposom không có gradien nồng độ cho phép điều chế chế phẩm với tỷ lệ mol hợp chất/lipit cao hơn, và cải thiện độ ổn định của một số chế phẩm nhất định do xu hướng giải phóng hợp chất ra khỏi liposom giảm.

Liposom chứa tác nhân ưa chất béo trong ngăn màng thường ít giải phóng hợp chất vào môi trường nước nếu có gradien thẩm thấu đã nêu. Phân đoạn cân bằng chứa chất ưa chất béo nêu trên trong môi trường nước giảm. Vì vậy, nguy cơ nồng độ của hợp chất ưa chất béo trong pha nước vượt quá giới hạn độ hoà tan và kết tủa cũng giảm.

Ngoài ra, đã bất ngờ phát hiện ra rằng liposom rỗng có gradien nêu trên có khả năng chứa các hợp chất ưa chất béo với lượng lớn hơn, nghĩa là lượng phân tử gam của hợp chất ưa chất béo được hòa tan bởi cùng một lượng liposom (tính theo lượng phân tử gam lipit) là cao hơn so với liposom không có gradien này. Điều này có thể đạt

được, ví dụ, bằng cách cho hợp chất ưa chất béo tiếp xúc với liposom rỗng này.

Đã bất ngờ phát hiện ra rằng, các chế phẩm liposom thu được bằng cách hydrat hóa lại các liposom đã được loại nước trước có phân bố kích cỡ đồng nhất, như được biểu thị bởi chỉ số đa phân tán (polydispersity index - PI) thấp. Liên quan đến việc kiểm tra chất lượng, cũng mong muốn thu được sản phẩm đồng nhất, đặc biệt là để dùng trong dược phẩm. Ngoài ra, huyền phù liposom theo sáng chế có chỉ số đa phân tán hầu như không thay đổi trong khoảng thời gian dài. Điều này chỉ ra rằng liposom trong huyền phù theo sáng chế không kết tụ. Đặc biệt là đối với huyền phù liposom để dùng qua đường tĩnh mạch, cần phải tránh các khối kết tụ, do các khối kết tụ này có thể làm nghẽn mạch máu và do đó dẫn đến tắc mạch.

Về cơ bản, sáng chế giải quyết vấn đề trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách đề xuất quy trình làm ổn định các tác nhân ưa chất béo trong màng liposom của chế phẩm liposom, cũng như duy trì kích cỡ và tính đa phân tán của chế phẩm liposom đã được hydrat hóa lại. Kết quả là, độ ổn định trong khi sử dụng của chế phẩm cuối chứa liposom với hợp chất ưa chất béo có thể được kéo dài. Độ ổn định của liposom này trong quá trình bào chế chế phẩm cũng có thể được kéo dài.

Trong nhiều trường hợp, khoảng thời gian để xử lý chế phẩm lỏng trong quá trình điều chế (thời gian giữ) chế phẩm liposom bị hạn chế do nguy cơ giải phóng không mong muốn tác nhân ra khỏi liposom. Sáng chế làm giảm nguy cơ giải phóng dược chất, và vì vậy cho phép xử lý liên tục liposom trong quá trình điều chế ở quy mô thời gian kéo dài và cho phép sắp xếp linh hoạt quy trình sản xuất.

Cụ thể hơn, sáng chế cho phép bào chế chế phẩm nêu trên bằng cách sấy phun thay cho sấy đông. Trong quy trình sấy đông, liposom được làm đông lạnh và do vậy được ổn định ngay sau khi điều chế, vì vậy nguy cơ giải phóng trong quá trình điều chế là thấp. Trong quy trình sấy phun, chế phẩm lỏng được giữ trong pha lỏng trong thời gian dài, do việc sấy phun một mẻ nhất định có thể là vài giờ hoặc vài ngày. Do sáng chế cho phép gia tăng độ ổn định của chế phẩm nhất định, có thể được thực hiện bước phun dài hơn mà không bị gián đoạn. Do sấy phun thường có lượng nguyên liệu đầu vào nhiều hơn so với sấy đông, việc sản xuất ở quy mô lớn là thuận tiện và chi phí sản

xuất có thể giảm, trong khi chất lượng sản phẩm được duy trì.

Ngoài ra, nguy cơ giải phóng và kết tinh được chất trong khoảng thời gian giữa bước hoàn nguyên chế phẩm liposomal đã được loại nước và bước cho bệnh nhân dùng (độ ổn định trong khi sử dụng) giảm. Việc kết tinh có thể thúc đẩy sự tạo thành các hạt nhỏ dưới mức nhìn thấy được, mà các hạt này phải không có mặt với lượng vượt quá giới hạn nhất định trong sản phẩm để dùng qua đường tĩnh mạch. Trong nhiều trường hợp, chỉ đạt được độ ổn định trong khi sử dụng ở mức vài giờ, đây là một trở ngại trong thực tiễn lâm sàng. Vì vậy, độ ổn định trong khi sử dụng ở mức độ đủ là cực kỳ quan trọng trong ứng dụng thực tiễn của các sản phẩm được phẩm hoặc mỹ phẩm này.

Thông thường, việc điều chế liposom sử dụng các dung môi hữu cơ, như etanol, thường được tìm thấy trong các sản phẩm liposom đã được loại nước, và do vậy được tìm thấy trong huyền phù liposom đã được hydrat hóa lại có nguồn gốc từ nó. Đặc biệt là trường hợp các chế phẩm liposom đã được loại nước bằng cách sấy đông (đông khô nhanh). Tuy nhiên, mong muốn rằng các sản phẩm liposom được sử dụng để dùng cho người chứa càng ít dung môi hữu cơ càng tốt. Sáng chế cho phép loại nước bằng cách sấy phun, tạo điều kiện thuận lợi cho việc loại bỏ hầu hết hoặc toàn bộ dung môi hữu cơ còn lại, đồng thời thu được liposom có độ ổn định cao.

Đồng thời với các ưu điểm nêu trên, sáng chế có thể được thực hiện một cách dễ dàng và không tốn kém. Các thiết bị kỹ thuật phức tạp, cũng như việc bổ sung các thành phần khác vào chế phẩm nêu trên, là không cần thiết. Chất có hoạt tính thẩm thấu được sử dụng để thực hiện sáng chế là đã biết từ các chế phẩm liposom được loại nước như đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 4,880,635 hoặc WO 2004/002468.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Lượng paclitaxel được hòa tan bởi các chế phẩm liposom với nồng độ lipid là 10mM và nồng độ trehaloza tổng là 10% (khối lượng). Liposom thu được từ chế phẩm tiền thân cô đặc bằng cách pha loãng bằng nước. Tọa độ biểu thị nồng độ ban đầu, nghĩa là, dữ liệu ở 10% trehaloza, thu được từ huyền phù chưa được pha loãng, và dữ liệu ở 40% trehaloza, thu được từ huyền phù chưa được pha loãng mà có hàm lượng trehaloza ban đầu là 40% (khối lượng), và 40mM lipid, và được pha loãng

bằng nước theo tỷ lệ 1+3.

Hình 2: Tốc độ đếm của 10mM DOTAP/DOPC liposom thu được từ chế phẩm cô đặc chứa 30mM lipit trong 30% (khối lượng) trehaloza. Dung dịch này được pha loãng bằng hỗn hợp nước/trehaloza đến nồng độ trehaloza chung khác nhau nằm trong khoảng từ 30% đến 10% (khối lượng). Tất cả các chế phẩm đều có nồng độ lipit cuối là 10mM, nhưng gradien nồng độ trehaloza giữa pha được bao nang và pha nước tự do được biểu thị trên trục x.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Thuật ngữ “khoảng”, trong ngữ cảnh liên quan đến trị số về lượng, có nghĩa là độ lệch trung bình tối đa $\pm 20\%$, tốt hơn là $\pm 10\%$, của trị số đã chỉ ra. Ví dụ, lượng nằm trong khoảng 30 %mol lipit ở dạng cation có nghĩa là 30 %mol ± 6 %mol và tốt hơn là 30 %mol ± 3 %mol lipit ở dạng cation theo tổng nồng độ phân tử gam của lipit/ lưỡng phân.

Các thuật ngữ “hoạt chất” hoặc “tác nhân có hoạt tính” có nghĩa là hợp chất hoặc hỗn hợp gồm các hợp chất, có hoạt tính sinh học hoặc vật lý cụ thể, nhờ đó nó có thể được dùng làm tác nhân để chẩn đoán, phòng ngừa, hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý cho người hoặc động vật. Các tác nhân trị liệu như các dược chất và các tác nhân dùng trong chẩn đoán là các ví dụ quan trọng về hoạt chất theo sáng chế.

Thuật ngữ “tỷ trọng khô” của liposom được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là khối lượng của tất cả các hợp chất cấu thành liposom nêu trên, kể cả các hợp chất được bao nang bởi liposom, nhưng không bao hàm khối lượng nước chứa trong liposom này, chia cho thể tích của liposom trong pha nước, trên cơ sở cỡ hạt liposom $Z_{\text{trung bình}}$. Trong một ví dụ rất cụ thể, tỷ trọng khô của liposom có thể là khối lượng DOTAP, DOPC, paclitaxel, axit xitric và trehaloza chứa trong liposom, chia cho thể tích liposom trong pha nước. Tỷ trọng khô của liposom có thể được xác định theo các phương pháp siêu ly tâm như được mô tả trong phần ví dụ.

Các thuật ngữ “môi trường nước”, “chất lỏng nền nước” hoặc “pha nước” được

sử dụng trong bản mô tả này để chỉ nguyên liệu lỏng chứa nước. Theo một số phương án, nguyên liệu lỏng chứa ít nhất 50% (khối lượng), ít nhất 70% (khối lượng) hoặc ít nhất 90% (khối lượng) nước. Theo các phương án khác, nguyên liệu lỏng không chứa dung môi hữu cơ. Pha nước có thể chứa một hoặc vài hợp chất. Vì vậy, thể phân tán trong nước, huyền phù nước và nhũ tương, trong đó pha liên tục là nước, cũng là các ví dụ về chất lỏng nền nước. Chất lỏng nền nước chứa nguyên liệu thể keo dưới đây đôi khi được gọi là thể phân tán dạng keo chứa nước hoặc dung dịch nước.

Thuật ngữ “cation” được dùng trong bản mô tả này để chỉ tác nhân có điện tích thực dương hoặc điện thế zeta dương trong các điều kiện môi trường tương ứng. Theo sáng chế này, các điều kiện môi trường dùng để chỉ các điều kiện trong đó độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 9, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 8.

Thuật ngữ “độ ổn định hóa học” của hợp chất ưa chất béo được dùng trong bản mô tả này để chỉ sự thay đổi đáng kể của cấu trúc hóa học gốc, và được định nghĩa là mức thay đổi hoạt tính khoảng 5% so với trị số thử nghiệm ban đầu (hợp chất gốc), tốt hơn là khoảng 2% hoặc sự xuất hiện của các sản phẩm phân giải đặc hiệu vượt quá tiêu chí chấp nhận được của nó về khía cạnh giới hạn độ độc và khía cạnh an toàn. Đối với các hợp chất ưa chất béo như paclitaxel, độ ổn định hóa học có thể được xác định theo phương pháp HPLC/LC MS/MS và thường có nghĩa là mức sản phẩm phân hủy của hợp chất này ít hơn 5%. Ví dụ về sản phẩm phân hủy điển hình của paclitaxel là BaccatinIII, 7-Epi-Taxol v.v.. (Monography of Paclitaxel, USP26, [Jan.-Mar.2003], USPC,Inc.).

Thuật ngữ “hợp chất dùng trong mỹ phẩm” được dùng trong bản mô tả này để chỉ hợp chất có tác dụng đối với da hoặc tóc người.

Các thuật ngữ “hoạt chất dùng để chẩn đoán” hoặc “chất chẩn đoán” được dùng trong bản mô tả này để chỉ tác nhân được dùng có thể được sử dụng để quan sát đặc tính sinh học hoặc tình trạng sinh học ở đối tượng hoặc mẫu theo các phương pháp khác nhau. Việc quan sát này có thể được sử dụng để chẩn đoán.

Các thuật ngữ “sự loại nước” hoặc “khử nước” được dùng trong bản mô tả này để chỉ quy trình rút nước ra khỏi hỗn hợp. Theo một số phương án, nước được rút ra

khối hỗn hợp đến hàm lượng còn lại nhỏ hơn khoảng 10% (khối lượng), tốt hơn là nhỏ hơn khoảng 5% (khối lượng), tính theo lượng nước có mặt trước quy trình loại nước.

Các thuật ngữ “thể tích đã được bao nang” hoặc “pha đã được bao nang” được dùng trong bản mô tả này để chỉ thể tích được bao quanh bởi ít nhất một màng liposom. Thể tích này có thể được bao quanh bởi một màng trong liposom đơn lớp hoặc một số màng trong liposom đa lớp. Vì vậy, pha được bao nang là khoảng không gian nằm bên trong liposom, ngược lại thể tích bên ngoài thể tích đã được bao nang bằng liposom hoặc “pha (nước) tự do” là khoảng không gian bao quanh liposom. Trong trường hợp liposom đa lớp, thuật ngữ đã được bao nang và pha tự do được dùng để chỉ thể tích bên trong và bên ngoài của màng nhất định từ liposom đa lớp.

Thuật ngữ “thời gian giữ” được dùng để chỉ khoảng thời gian để bào chế chế phẩm lỏng trong quá trình sản xuất chế phẩm liposom.

Thuật ngữ “độ đồng nhất về kích cỡ” được dùng trong bản mô tả này để chỉ sự phân bố kích cỡ của quần thể hạt. Độ đồng nhất cao về kích cỡ hoặc khoảng phân bố cỡ hạt hẹp được đặc trưng bởi chỉ số đa phân tán thấp.

Thuật ngữ “lipit” được dùng trong bản mô tả này để chỉ nghĩa thông dụng của nó ở dạng thuật ngữ chung bao gồm chất béo, lipit, các thành phần hòa tan trong rượu-ete của chất nguyên sinh, mà không hòa tan trong nước. Lipit thường chứa một gốc ưa nước và một gốc kỵ nước. Trong nước, lipit có thể tự thiết lập để tạo thành màng hai lớp, trong đó các gốc ưa nước (các nhóm trên đỉnh) hướng về phía pha nước, và các gốc ưa chất béo (chuỗi axyl) được gắn vào trong nhân hai lớp. Lipit cũng có thể chứa hai gốc ưa nước (lưỡng phần bola). Trong trường hợp này, màng có thể được tạo ra từ lớp lipit đơn duy nhất, và không phải là lớp lipit kép. Ví dụ điển hình về lipit theo nghĩa này là các chất béo, dầu béo, tinh dầu, sáp, steroid, sterol, phospholipit, glycolipit, sulpholipit, aminolipit, chromolipit, và axit béo. Thuật ngữ này bao hàm cả lipit có trong tự nhiên và lipit tổng hợp. Lipit được ưu tiên theo sáng chế là: steroid và sterol, đặc biệt là cholesterol, phospholipit, kể cả phosphatidyl, phosphatidylcholin và phosphatidyletanolamin, và sphingomyelin. Khi có axit béo, chúng có thể có chiều dài mạch từ 12 đến 24 nguyên tử cacbon, chứa đến 6 liên kết đôi. Các axit béo được liên

kết với khung, có thể có nguồn gốc từ glyxerol. Các axit béo thuộc một lipit có thể khác nhau (không đối xứng), hoặc có thể chỉ có 1 mạch axit béo, chẳng hạn lysolexithin. Cũng có thể có các chế phẩm hỗn hợp, đặc biệt là khi lipit không phải là cation thu được từ nguồn tự nhiên, như lexithin (phosphatidylcholin) được tinh chế từ lòng đỏ trứng, tim bò, não, gan hoặc đậu nành.

“Liposom” là cấu trúc màng nhân tạo, tự đóng, có kích thước khác nhau và cấu trúc khác nhau, trong đó một hoặc vài màng bao một nhân nước. Thông thường nhất, màng liposom được tạo ra từ các màng kép lipit, trong đó nhóm đầu ưa nước được hướng về phía môi trường nước và mạch lipit được bao trong nhân ưa chất béo. Liposom cũng có thể được tạo ra từ các phân tử lưỡng phần monome và polyme khác, như polyme, chẳng hạn copolyme khối, hoặc polypeptit. Các túi đơn lớp là các liposom được xác định bởi một màng đơn bao một khoảng không chứa nước. Ngược lại, các túi oligo- hoặc các túi đa lớp được tạo ra từ một số màng. Thông thường, màng này dày khoảng 4nm và bao gồm các lipit lưỡng phần, như phospholipit, có nguồn gốc tự nhiên hoặc tổng hợp. Đặc tính của màng có thể tùy ý được cải biến bằng cách kết hợp các lipit khác như sterol hoặc các dẫn xuất của axit cholic. Liposom với các màng đặc biệt linh động trên cơ sở phospholipit với nhiệt độ chuyển pha thấp (nghĩa là thấp hơn nhiệt độ của cơ thể) đôi khi còn được gọi là transfersom.

Thuật ngữ “huyền phù liposom” được dùng trong bản mô tả này để chỉ hỗn hợp liposom trong môi trường nước.

Các thuật ngữ “chế phẩm liposom” hoặc “hỗn hợp liposom” được dùng trong bản mô tả này để chỉ hỗn hợp bất kỳ chứa liposom, kể cả huyền phù liposom hoặc hỗn hợp đã được loại nước thu được từ huyền phù này bằng cách loại nước.

Thuật ngữ “ưa chất béo” được dùng trong bản mô tả này để chỉ đặc tính của hợp chất hòa tan tốt hơn là trong pha kiểu chất béo (ví dụ hydrocacbon), như pha về cơ bản chứa lipit. Đặc tính ưa chất béo của hợp chất có thể được mô tả bằng hệ số phân bố ($\log P$). Hợp chất theo sáng chế có $\log P$ lớn hơn 1, tốt hơn nữa là lớn hơn 2, tốt nhất là lớn hơn 3.

Thuật ngữ “ $\log P$ ” được dùng trong bản mô tả này để chỉ hệ số phân bố của hợp

chất giữa pha nước và pha octanol ở 25°C. Thông thường, log P cao hơn có nghĩa là tác nhân này hòa tan tốt hơn trong octanol. Log P được xác định là ($\frac{[\text{nồng độ của tác nhân trong octanol}]}{[\text{nồng độ của tác nhân trong nước}]}$). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rõ cách xác định log P của hợp chất nhất định thông qua thử nghiệm.

Thuật ngữ “độ hoà tan thấp trong nước” được dùng trong bản mô tả này để chỉ độ hoà tan của hợp chất thấp hơn 0,1mg/ml, tốt hơn nữa là thấp hơn 0,01mg/ml và tốt nhất là thấp hơn 0,001mg/ml trong nước ở độ pH sinh lý và nhiệt độ 25°C khi không có mặt chất phụ gia tăng cường độ hoà tan.

“Nồng độ thẩm thấu toàn phần” của huyền phù liposom là tổng lượng chất có hoạt tính thẩm thấu có mặt trong một thể tích nhất định của huyền phù này chia cho thể tích huyền phù. Để tính nồng độ thẩm thấu toàn phần, chất có hoạt tính thẩm thấu bên trong và bên ngoài thể tích đã được bao nang bằng liposom của huyền phù cũng được xem xét. Theo sáng chế, các chữ viết tắt O_1 và O_2 dùng để chỉ nồng độ thẩm thấu toàn phần.

Các thuật ngữ “ O_{trong} ” và “ $O_{\text{ngoài}}$ ” được dùng trong bản mô tả này để chỉ nồng độ thẩm thấu bên trong và bên ngoài của màng liposom tự đóng. Đối với liposom đơn lớp, $O_{\text{ngoài}}$ là nồng độ thẩm thấu của pha nước tự do, và O_{trong} là nồng độ thẩm thấu của thể tích đã được bao nang. Đối với liposom đa lớp, O_{trong} và $O_{\text{ngoài}}$ là nồng độ thẩm thấu bên trong và bên ngoài của mỗi màng tự đóng riêng biệt. Theo sáng chế, các tình huống có O_{trong} lớn hơn $O_{\text{ngoài}}$ là đặc biệt thích hợp. Khác biệt tương đối giữa O_{trong} và $O_{\text{ngoài}}$ có thể được khảo sát bằng các kỹ thuật ly tâm, ví dụ bằng kỹ thuật ly tâm hoặc siêu ly tâm phân tích hoặc điều chế. Do chất có hoạt tính thẩm thấu thường làm thay đổi tỷ trọng của pha nước, khác biệt giữa O_{trong} và $O_{\text{ngoài}}$ có thể được nhận biết dựa trên tính lắng của liposom (Goormaghtigh and Scarborough 1986, Huang and Charlton 1971). Ngoài ra, gradien thẩm thấu có thể ảnh hưởng đến các thông số cấu trúc của màng liposom, như có thể được xác định theo các phương pháp như tia X hoặc tán xạ neutron, hoặc theo kích cỡ liposom, như có thể được xác định theo phương pháp tán xạ ánh sáng và phương pháp tán xạ tia X.

Thuật ngữ “chất có hoạt tính thẩm thấu” được dùng trong bản mô tả này để chỉ một chất hòa tan trong nước mà hầu như không thể thẩm qua màng liposom. Ví dụ cụ thể là, ví dụ, ion hoặc các loại đường, như glucoza, hoặc trehaloza mà có thể được bẫy một cách hữu hiệu trong liposom, trong khi các phân tử nước biểu thị khả năng thẩm cao và do vậy, trong bản mô tả này, nước không được xem là chất có hoạt tính thẩm thấu. Tính chọn lọc theo độ thẩm của các hợp chất khác nhau là dấu hiệu chính của liposom (Bangham et al., 1965). Tính thẩm của một hợp chất qua một màng phụ thuộc vào thành phần của màng, trạng thái pha và các điều kiện ranh giới.

Thuật ngữ “nồng độ thẩm thấu” là tổng nồng độ phân tử gam của các chất hòa tan có mặt trong dung dịch này, kể cả hoạt chất và các phân tử trợ giúp, như tá dược thẩm thấu được sử dụng để làm chậm tốc độ giải phóng hoạt chất. Nếu chất hòa tan có mặt ở dạng phân ly, ion hóa, hoặc dạng kết tụ, thì nồng độ thẩm thấu được định nghĩa là tổng nồng độ phân tử gam của các dạng phân ly, ion hóa hoặc dạng kết tụ này. Đóng góp vào nồng độ thẩm thấu của một dung dịch được tạo ra bởi chất hòa tan bất kỳ trong dung dịch đó là gần bằng nồng độ của chất hòa tan này trong dung dịch đó chia cho khối lượng phân tử của nó. Vì vậy, theo nguyên tắc chung, khối lượng phân tử của một chất hòa tan càng lớn, thì nồng độ thẩm thấu của chất hòa tan này càng nhỏ, và đóng góp của chất hòa tan này vào nồng độ thẩm thấu toàn phần của dung dịch càng nhỏ. Khác biệt về nồng độ thẩm thấu có thể được xác định theo mức thay đổi các thông số hóa lý khác nhau, như tỷ trọng, tỷ trọng electron, chiết suất, hoặc độ nhớt, có thể được xác định theo các phương pháp đã được thiết lập trong hóa lý.

Thuật ngữ “lipit tích điện âm” được dùng trong bản mô tả này để chỉ lipit có điện tích thực âm.

Thuật ngữ “dược phẩm” được dùng trong bản mô tả này để chỉ hỗn hợp gồm hai hoặc nhiều thành phần khác nhau có dược tính khác dược tính của mỗi thành phần. Theo sáng chế, hai hoặc nhiều thành phần có nghĩa là thể phân tán dạng lipit hoặc thể phân tán dạng keo và một hoạt chất, tùy ý cùng với chất mang, chất pha loãng và/hoặc tá dược được dùng.

Thuật ngữ “ổn định về mặt vật lý” của liposom được dùng trong bản mô tả này

để chỉ sự thay đổi trạng thái vật lý của liposom. Liposom là ổn định khi trạng thái vật lý được duy trì. Một khía cạnh quan trọng của tính ổn định vật lý là sự giải phóng hợp chất được bao trong màng liposom vào môi trường nước của huyền phù liposom. Sự giải phóng hợp chất là dấu hiệu của tính không ổn định về mặt vật lý. Sự giải phóng hợp chất ra khỏi màng có thể dẫn đến sự gia tăng nồng độ và sự kết tụ hợp chất đó trong môi trường nước. Trong trường hợp taxan, sự kết tụ có thể quan sát được nhờ hiện tượng tạo ra các tinh thể taxan hình kim. Mức độ kết tinh của taxan có thể được xác định bằng cách quan sát bằng mắt thường chế phẩm liposom lỏng, bằng kính hiển vi quang học, phép đo chặn ánh sáng hoặc tán xạ ánh sáng. Kích cỡ liposom và sự phân bố theo kích cỡ cũng là các dấu hiệu về tình trạng vật lý của huyền phù liposom.

Thuật ngữ “đa phân tán” là sự phân bố kích cỡ hạt trong khoảng rộng đối với một mẫu hạt nhất định, ví dụ huyền phù liposom. Một tiêu chuẩn để đánh giá mức độ đa phân tán là chỉ số đa phân tán (polydispersity index - PI), thu được theo phương pháp phân tích nửa bất biến đối với dữ liệu quang phổ tương quan photon (photon correlation spectroscopy - PCS).

Thuật ngữ “chỉ số đa phân tán” (PI) là số không thứ nguyên thu được theo phương pháp phân tích nửa bất biến đối với kết quả từ các phép đo quang phổ tương quan photon (PCS) (Koppel 1972). Phân tích nửa bất biến làm cho mô hình có thể dễ dàng phù hợp dữ liệu PCS, mà từ đó thu được $Z_{\text{trung bình}}$, là số đo về kích cỡ hạt, và trị số PI, là số đo về độ đa phân tán. Cách tính các thông số này được xác định trong tài liệu tiêu chuẩn ISO 13321:1996 E. Khi xác định kích cỡ hạt, các thuật ngữ PCS và Dynamic Light Scattering (DLS), thường được sử dụng đồng nghĩa. Kỹ thuật này đo dao động của cường độ ánh sáng phân tán theo thời gian, xảy ra do các hạt trải qua chuyển động Browni. Phân tích các dao động cường độ này cho phép xác định hệ số khuếch tán của các hạt mà nó được chuyển đổi thành mức phân bố kích cỡ. Trong phạm vi của sáng chế này, PI và $Z_{\text{trung bình}}$ được xác định như được mô tả trong ví dụ 6.

Thuật ngữ “quang phổ tương quan photon” là kỹ thuật đo dao động cường độ ánh sáng tán xạ theo thời gian xảy ra do các hạt này trải qua chuyển động Browni. Phân tích các dao động cường độ này cho phép xác định hệ số khuếch tán của các hạt, mà nó được chuyển đổi thành mức phân bố kích cỡ. Trong phép đo kích cỡ hạt, PCS và

DLS thường được sử dụng đồng nghĩa.

Thuật ngữ “lipit tích điện âm” được dùng đồng nghĩa với cation lipit (để định nghĩa, xem phần định nghĩa “lipit cation”). Theo sáng chế, tốt hơn nếu môi trường có độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 9, tốt hơn là từ 5 đến 8.

Thuật ngữ “tính ổn định” có thể chỉ tính ổn định vật lý của liposom và tính ổn định hóa học của mỗi thành phần (ví dụ lipit và hoạt chất) chứa trong liposom này.

Các thuật ngữ “liposom đã được tạo ứng suất” hoặc “chế phẩm liposom đã được tạo ứng suất” được dùng để chỉ liposom, trong đó màng liposom chịu ứng suất căng, và chỉ chế phẩm chứa các liposom này.

Thuật ngữ “ứng suất kéo” trên màng liposom theo sáng chế có thể được gây ra bằng cách sử dụng gradien nồng độ của chất có hoạt tính thẩm thấu giữa pha nước bên trong và bên ngoài thể tích đã được bao nang bằng liposom. Nếu nồng độ thẩm thấu bên trong O_{trong} cao hơn nồng độ thẩm thấu bên ngoài $O_{\text{ngoài}}$, điều này sẽ dẫn đến sự gia tăng gradien áp suất, ΔP , giữa thể tích được bao nang và thể tích tự do nhờ lực thẩm thấu. Áp suất dư được cân bằng với sức căng bề mặt, γ , ở màng liposom, trong đó mối tương quan giữa gradien áp suất và sức căng bề mặt được thể hiện theo phương trình Young-Laplace đã biết rõ (Evans and Wennerström, 1994).

$$\gamma = \frac{\Delta P \cdot r}{2}$$

(Công thức 1)

Đối với các hệ liposom theo sáng chế, cần tính đến việc là sức căng bề mặt đã được gây ra làm giãn bề mặt của màng liposom, điều này có thể dẫn đến sự thay đổi bán kính, thể tích được bao nang, và, do vậy, làm thay đổi nồng độ thẩm thấu của thể tích được bao nang này. Mức giãn bề mặt, ΔA , là hàm số của sức căng bề mặt phụ thuộc vào mô đun đàn hồi của màng, κ , và được xác định theo phương trình Young sau:

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{\gamma}{\kappa}$$

Công thức 1 làm rõ rằng mối quan hệ giữa sức căng bề mặt và áp suất phụ thuộc bán kính. Đối với gradien áp suất nhất định, sức căng bề mặt tăng khi bán kính tăng. Mức tăng diện tích và mức tăng kích cỡ tương ứng của liposom đối với liposom lớn là lớn hơn đối với liposom nhỏ. Đối với các hệ với sức căng bề mặt nhất định, như bong bóng xà phòng, gradien áp suất $p_{\text{bên trong}} - p_{\text{bên ngoài}}$ tăng khi bán kính tăng, hoặc, nói cách khác, với độ cong tăng.

Các thuật ngữ “hoạt chất trị liệu” hoặc “chất trị liệu” được dùng trong bản mô tả này để chỉ tác nhân phòng ngừa hoặc làm giảm mức độ của tình trạng bệnh lý ở động vật, đặc biệt là ở động vật có vú, tốt hơn là ở người.

Thuật ngữ “phân tử nhỏ” được dùng trong bản mô tả này để chỉ phân tử có phân tử lượng ít hơn khoảng 2000Da.

Thuật ngữ “điện thế Zeta” được dùng trong bản mô tả này để chỉ điện thế tĩnh đo được của hạt ở thể keo trong môi trường nước, được đo bằng dụng cụ như Zetasizer 3000 có áp dụng vi điện di Laser Doppler trong dung dịch KCl 0,05mM ở độ pH khoảng 7,5. Điện thế zeta là điện thế ở đường danh giới giữa dung dịch đậm đặc và vùng cắt thủy động lực học hoặc lớp khuếch tán. Thuật ngữ này đồng nghĩa với thuật ngữ “thế điện động” do nó là điện thế của các hạt hoạt động bên ngoài và chịu trách nhiệm về tác động điện động của hạt.

Quy trình điều chế chế phẩm liposom theo sáng chế có thể được thực hiện theo các bước sau:

a) tạo chế phẩm liposom thứ nhất chứa huyền phù gồm liposom trong pha nước, trong đó liposom này chứa ít nhất một màng, trong đó màng này bao quanh thể tích được bao nang trong liposom của pha nước và pha nước này chứa ít nhất một chất có hoạt tính thẩm thấu và có nồng độ thẩm thấu toàn phần ban đầu, O_1 , sau đó

b) tạo gradien thẩm thấu trong pha nước của chế phẩm nêu trên, trong đó nồng độ thẩm thấu của pha nước bên ngoài thể tích đã được bao nang bằng liposom, $O_{\text{ngoài}}$, thấp hơn nồng độ thẩm thấu của pha nước bên trong thể tích đã được bao nang bằng

liposom, O_{trong} , để tạo chế phẩm liposom thứ hai (đã được tạo ứng suất),

c) tùy ý loại nước của chế phẩm liposom thứ hai (đã được tạo ứng suất) này để thu được chế phẩm đã loại nước, và

d) tùy ý hydrat hóa lại chế phẩm đã loại nước này.

Tốt hơn, nếu chế phẩm liposom ở bước a) chứa ít nhất một tác nhân ưa chất béo có mặt trong màng liposom. Tuy nhiên, tác nhân ưa chất béo cũng có thể được bổ sung vào ở giai đoạn sau của quy trình sản xuất.

Bước b) có thể được thực hiện bằng cách làm giảm nồng độ thẩm thấu toàn phần ban đầu O_1 của chế phẩm liposom thu được từ bước a) để tạo chế phẩm liposom đã được tạo ứng suất có nồng độ thẩm thấu toàn phần O_2 thấp hơn nồng độ thẩm thấu O_1 .

Trong phạm vi của sáng chế này, việc làm giảm nồng độ thẩm thấu toàn phần O_1 liên quan đến quy trình, trong đó ban đầu nồng độ thẩm thấu của môi trường nước bên ngoài thể tích đã được bao nang bằng liposom, $O_{\text{ngoài}}$, bị giảm. Nếu giả sử ban đầu nồng độ ở tất cả các ngăn bằng nhau, $O_1 = O_{\text{ngoài}} = O_{\text{trong}}$, thì trước tiên sự pha loãng chỉ ảnh hưởng đến pha nước tự do, $O_{\text{ngoài}}$, dẫn đến $O_{\text{ngoài}} < O_{\text{trong}}$. Kết quả là, gradien thẩm thấu giữa phần bên trong và phần bên ngoài của thể tích đã được bao nang bằng liposom được tạo ra. Đã hiểu rõ rằng, với sự có mặt của gradien thẩm thấu, liposom có thể trương nở, do màng này có thể thấm phân tử nước. Do đó, tác dụng phụ của việc pha loãng còn là nồng độ thẩm thấu của môi trường nước đã được bao nang, O_2 , có thể giảm đến một mức nhất định. Mức thay đổi tuyệt đối của nồng độ thẩm thấu tùy thuộc vào nhiều yếu tố như, phân đoạn thể tích đã được bao nang, kích cỡ liposom, độ đàn hồi của màng (Young's modulus) v.v.. Vì vậy, tỷ lệ giữa O_1 và O_2 không nhất thiết phải bằng tỷ lệ giữa O_{trong} và $O_{\text{ngoài}}$ sau khi pha loãng.

Tuy nhiên, việc giảm nồng độ thẩm thấu trong pha nước tự do không được bao nang sẽ dẫn đến sự tăng gradien nồng độ thẩm thấu $O_{\text{trong}} - O_{\text{ngoài}}$ giữa phần bên ngoài và phần bên trong của pha đã được bao nang. Nếu sự trương nở do ứng suất thẩm thấu xảy ra vượt ra ngoài một yếu tố nhất định, lỗi trên màng có thể hình thành, cho phép

giải phóng chất hòa tan ra khỏi pha có nồng độ thẩm thấu cao hơn sang pha có nồng độ thẩm thấu thấp hơn. Điều này sẽ làm giảm gradien thẩm thấu và ứng suất thẩm thấu. Màng có thể khép lại trong các điều kiện ứng suất kéo tối đa và giới hạn quan trọng tối đa của gradien thẩm thấu để tạo ra lỗ. Vì vậy hệ này có thể được xem là tự ổn định, có nghĩa là nếu áp dụng gradien dư, thì cho dù trong các điều kiện cụ thể nào, hệ này cũng sẽ chấp nhận trạng thái gradien thẩm thấu tối đa. Tác dụng này có thể được xem là thuận lợi để đảm bảo các điều kiện lặp lại trong quá trình sản xuất.

Liposom được sử dụng theo sáng chế có thể chứa các lipid trung tính, anion lipid và/hoặc cation lipid. Các lipid trung tính hoặc anion lipid có thể được chọn từ các sterol hoặc các lipid như cholesterol, phospholipit, lysolipit, lysophospholipit, sphingolipit hoặc pegylat lipid có điện tích âm hoặc không có điện tích. Do đó, lipid không có điện tích và anion lipid hữu dụng bao gồm: phosphatidylserin, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol (không hạn chế ở đường cụ thể), axit béo, sterol, chứa nhóm axit carboxylic, ví dụ, cholesterol, 1,2-diacyl-sn-glyxero-3-phosphoetanolamin, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 1,2-diioleoylphosphoetanolamin (DOPE), 1,2-dihexadecylphosphoetanolamin (DHPE), 1,2-diacyl-glyxero-3-phosphocholin, 1,2-distearylphosphatidylcholin (DSPC), 1,2-dipalmitylphosphatidylcholin (DPPC), 1,2-dimyristylphosphatidylcholin (DMPC), phosphatidylcholin, tốt hơn là PC trứng, PC đậu tương và sphingomyelin. Các axit béo liên kết với khung glyxerol không bị giới hạn ở chiều dài cụ thể hoặc số liên kết đôi. Phospholipit cũng có thể có hai axit béo khác nhau. Tốt hơn, nếu các lipid khác ở trạng thái tinh thể lỏng ở nhiệt độ trong phòng và chúng có thể trộn lẫn được với (nghĩa là có thể tạo ra pha duy nhất và không xảy ra sự tách pha hoặc tạo miền) với cation lipid ở tỷ lệ như chúng đang dùng. Theo một phương án được ưu tiên, lipid không có điện tích là 1,2-diioleoylphosphatidylcholin (DOPC).

Cation lipid được ưu tiên của chế phẩm liposom là muối amoni của N-[1-(2,3-diioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimetyl, ví dụ muối metylsulfat. Đại diện được ưu tiên của họ lipid TAP (trimethylamoni metylsulfat) là DOTAP (diioleoyl-), DMTAP (dimyristoyl-), DPTAP (dipalmitoyl-), hoặc DSTAP (distearoyl-). Các lipid thông dụng khác đối với sáng chế có thể bao gồm: DDAB, dimetylđioctadecyl amoni bromua; 1,2-diacyloxy-3-

trimetylmoni propan, (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: dioleoyl, dimyristoyl, dilauroyl, dipalmitoyl và distearoyl; cả hai mạch axyl khác nhau cũng có thể liên kết với khung glyxerol); N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N-dimetyl amin (DODAP); 1,2-diaxyloxy-3-dimetylmoni propan, (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: dioleoyl, dimyristoyl, dilauroyl, dipalmitoyl và distearoyl; hai mạch axyl khác nhau cũng có thể liên kết với khung glyxerol); N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimetylmoni clorua (DOTMA); 1,2-dialkyloxy-3-dimetylmoni propan, (bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: dioleoyl, dimyristoyl, dilauroyl, dipalmitoyl và distearyl; hai mạch alkyl khác nhau cũng có thể liên kết với khung glyxerol); dioctadexylamidoglyxylspermin (DOGS); 3β -[N-(N',N'-dimetylamin-etan)carbamoyl]cholesterol (DC-Chol); 2,3-dioleoyloxy-N-(2-(spermincarboxamido)-etyl)-N,N-dimetyl-1-propanaminium trifloaxetat (DOSPA); β -alanyl cholesterol; xetyl trimetyl amoni bromua (CTAB); diC14-amidin; N-tert-butyl-N'-tetradexyl-3-tetradexylamino-propionamidin; 14Dea2; N-(alpha-trimetylamonioaxetyl)diđodexyl-D-glutamat clorua (TMAG); O,O'-ditetradecanoyl-N-(trimetylamonio-axetyl)diētanolamin clorua; 1,3-dioleoyloxy-2-(6-carboxy-spermyl)-propylamit (DOSPER); N,N,N',N'-tetrametyl-N,N'-bis(2-hydroxyetyl)-2,3-dioleoyloxy-1,4-butandiamoni iđua; chất dẫn xuất 1-[2-(axyloxy)etyl]2-alkyl-(alkenyl)-3-(2-hydroxyetyl)-imidazolinium clorua như đã được mô tả bởi Solodin và đồng tác giả (Solodin et al., 1995), như 1-[2-(9(Z)-octadecenoyloxy)etyl]-2-(8(Z)-heptadexenyl-3-(2-hydroxyetyl)imidazolinium clorua (DOTIM), 1-[2-(hexadecanoyloxy)etyl]-2-pentadexyl-3-(2-hydroxyetyl)imidazolinium clorua (DPTIM), chất dẫn xuất của hợp chất amoni bậc bốn của 2,3-dialkyloxypropyl, chứa gốc hydroxyalkyl trên amin bậc bốn, như đã được mô tả bởi Felgner và đồng tác giả (Felgner et al., 1994) chẳng hạn, như: 1,2-dioleoyl-3-dimetyl-hydroxyetyl amoni bromua (DORI), 1,2-dioleoyloxypropyl-3-dimetyl-hydroxyetyl amoni bromua (DORIE), 1,2-dioleoyloxypropyl-3-dimetyl-hydroxypropyl amoni bromua (DORIE-HP), 1,2-dioleoyl-oxy-propyl-3-dimetyl-hydroxybutyl amoni bromua (DORIE-HB), 1,2-dioleoyloxypropyl-3-dimetyl-hydroxypentyl amoni bromua (DORIE-Hpe), 1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimetyl-hydroxyetyl amoni bromua (DMRIE), 1,2-dipalmitoyloxypropyl-3-dimetyl-hydroxyetyl amoni bromua (DPRIE), 1,2-disteryloxypropyl-3-dimetyl-hydroxyetyl amoni bromua (DSRIE); các cation este của axyl carnitin như đã được báo cáo bởi Santaniello và

đồng tác giả (patent Mỹ số 5,498,633); cation trieste phosphatidylcholin, tức là 1,2-diacyl-sn-glycerol-3-etylphosphocholin, trong đó mạch hydrocacbon có thể là no hoặc không no và mạch nhánh hoặc thẳng với chiều dài mạch từ C_{12} đến C_{24} , hai mạch axyl không nhất thiết phải giống hệt.

Liposom có thể có kích cỡ, số tấm và cấu trúc khác nhau. Tốt hơn, nếu liposom có đường kính trung bình $Z_{\text{trung bình}}$ nằm trong khoảng từ 50nm đến 500nm. Tốt nhất, nếu kích cỡ $Z_{\text{trung bình}}$ nằm trong khoảng từ 100nm đến 200nm. Liposom có thể là liposom đơn tấm, ít tấm hoặc đa tấm. Tốt hơn, nếu liposom là liposom đơn tấm.

Tốt hơn là, hoạt chất hoặc chất dùng cho mỹ phẩm được dùng trong các phương án khác nhau của hợp chất theo sáng chế có log P lớn hơn 1, tốt hơn nữa là lớn hơn 2, tốt nhất là lớn hơn 3.

Tốt hơn là, hoạt chất hoặc chất dùng cho mỹ phẩm được dùng trong các phương án khác nhau của sáng chế có độ hoà tan thấp trong nước. Tốt hơn, nếu hợp chất có độ hoà tan thấp hơn 0,1mg/ml, tốt hơn nữa là thấp hơn 0,01mg/ml và tốt nhất là thấp hơn 0,001mg/ml trong nước ở độ pH sinh lý ở nhiệt độ môi trường xung quanh.

Tốt hơn là, hoạt chất chứa trong liposom theo sáng chế là hoạt chất dùng trong điều trị hoặc chẩn đoán bệnh. Tốt nhất là, hợp chất có hoạt tính điều trị bệnh.

Tốt hơn là, hoạt chất hoặc chất dùng cho mỹ phẩm là phân tử có phân tử lượng ít hơn 2000Da, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 1000Da.

Theo một khía cạnh, hoạt chất này có thể được chọn từ nhóm bao gồm abarelix, altretamin, anastrozol, aprepitant, bicalutamit, camptothecin, capexitabin, clorotri-anisen, estrogen tiếp hợp, cyclosporin, dactinomycin, diethylstilbestrol, doxorubicin, dolasetron, dromostanolon, epirubicin, epothilone, ví dụ epothilone B, epothilone D, hoặc chất dẫn xuất epothilone, ví dụ như đã được bộc lộ trong WO2004048372, WO2004007492, WO2005051947 và WO2005030767 (toàn bộ các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn), suberoyl anilide, etinyl estradiol, exemestan, fentanyl, flavopiridol, floxymesteron, fulvestrant, gefitinib, granisetron, hesperetin, hydromorphon, irinotecan, ketoconazole, lapatinib, letrozol, leuprolid, lomustine,

lucanthone, marinol, masoprocol, megestrol, nabilon, nilutamide, palonosetron, porfimer, quinesol, quinesol, tamoxifen, taxan, temsirolimus, testolactone, topotecan, toremifen, trimetrexat, valrubicin, vinblastin, vitamin E, và chất dẫn xuất của các hợp chất này. Tốt hơn, nếu hợp chất này là taxan, tốt nhất là paclitaxel hoặc chất dẫn xuất của nó.

Theo một khía cạnh nhất định của sáng chế, hoạt chất không là phân tử nucleotit hoặc polynucleotit giống như phân tử ADN hoặc ARN.

Theo một khía cạnh khác, phạm vi của sáng chế không bao gồm hoạt chất đã được ion hóa trong quá trình bào chế và/hoặc các hoạt chất là các hợp chất hòa tan trong nước một cách dễ dàng, ví dụ adriamycin.

Tốt hơn là, liposom theo sáng chế chứa paclitaxel trong màng liposom với lượng nằm trong khoảng từ 2,5%mol đến 4,5%mol. Do vậy, tốt hơn nếu paclitaxel có thể có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 2,5%mol đến 4,5%mol của toàn bộ lượng phân tử có mặt trong màng như lipid và các phân tử liên quan và paclitaxel. Tốt hơn nữa là, các liposom này thể hiện sự giải phóng một cách khó khăn thuốc ở dạng huyền phù và/hoặc sau khi hydrat hóa lại, và/hoặc về cơ bản không tạo thành tinh thể thuốc trong quá trình bảo quản như được xác định trong bản mô tả này.

Theo một phương án được ưu tiên theo sáng chế, liposom là cation liposom, ví dụ cation liposom chứa DOTAP, DOPC và paclitaxel với tỷ lệ phân tử gam nằm trong khoảng 50:47:3. Các chế phẩm chứa hỗn hợp này là đã biết trong lĩnh vực như MBT-0206 hoặc EndoTAG-1. Việc điều chế chế phẩm liposom chứa DOTAP, DOPC và paclitaxel đã được bộc lộ trong WO 2004/002468, toàn bộ nội dung của các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Nói chung, liposom có thể được bào chế theo các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rõ. Các phương pháp điều chế khác nhau đã được bộc lộ bởi New và đồng tác giả (1990).

Tốt hơn là, các liposom được dùng trong sáng chế này được bào chế bằng cách phun ethanol.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, liposom có điện thế zeta dương tính, tốt hơn nữa là điện thế zeta lớn hơn +30mV.

Chất có hoạt tính thẩm thấu được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế hoặc chứa trong chế phẩm theo sáng chế là các chất hòa tan không có khả năng thẩm thấu hết lớp kép lipid. Tốt hơn, nếu chất có hoạt tính thẩm thấu có mặt nằm bên ngoài và bên trong của liposom.

Chất có hoạt tính thẩm thấu có thể là phân tử hữu cơ như sacarit, ví dụ monosacarit, disacarit, oligosacarit hoặc polysacarit, rượu, đường, axit amin, peptit, protein, polyme hòa tan trong nước, muối, ion hữu cơ hoặc vô cơ, hoặc hỗn hợp của chúng.

Các saccarit thông dụng bao gồm đường và các rượu đường, oligosacarit, polysacarit hòa tan trong nước và chất dẫn xuất của chúng. Các saccarit được ưu tiên theo sáng chế bao gồm glucoza, fructoza, lactoza, sucroza, maltoza, xenlobioza, galactoza, maltotrioza, maltopentoza, rafinoza, đextrin, dextran, inulin, manitol, sorbitol, xylitol, chitosan và tốt nhất là trehaloza.

Ví dụ về polyme hòa tan trong nước là polyetylen glycol, rượu polyvinyl, polyacrylat, hoặc polyvinylpyrrolidon.

Theo một khía cạnh nhất định, việc sử dụng chất có hoạt tính thẩm thấu trong phương pháp hoặc chế phẩm theo sáng chế không bao hàm việc sử dụng các phức chất tạo điều kiện thuận lợi cho việc hòa tan các hợp chất có độ hoà tan kém trong nước. Ví dụ về các tác nhân tạo phức là xyclodextrin như đã được Zhang và đồng tác giả mô tả trong WO 2007/005754 hoặc MacLachlan và đồng tác giả trong WO 2007/012191.

Môi trường nước hoặc pha nước được dùng trong sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều thành phần khác mà trộn lẫn ít nhất một phần với nước, như các rượu (ví dụ các rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon, như etanol) hoặc keton (ví dụ C₁₋₄ keton như axeton). Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, pha nước chứa etanol.

Pha nước có thể còn chứa chất đệm hoặc các chất làm ổn định khác. Chất đệm thích hợp được chọn trong số axit axetic, Tris, Bis, axit phosphoric, axit lactic và các

chất tương tự, tốt hơn là axit xitric. Chất đệm có thể có độ pH của môi trường nước nằm trong khoảng từ 3 đến 7, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4 đến 5.

Tốt hơn là, chế phẩm liposom ở bước a) được điều chế bằng cách trộn dung dịch hữu cơ (ví dụ etanol) chứa lipit và tùy ý một hoạt chất hoặc chất dùng cho mỹ phẩm vào môi trường nước chứa ít nhất một chất có hoạt tính thẩm thấu được đặc trưng bởi nồng độ thẩm thấu O_1 toàn phần.

Khoảng gradien thẩm thấu được ưu tiên, $O_{\text{trong}}-O_{\text{ngoài}}$, nằm trong khoảng từ 10mOsm đến 2000mOsm, cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 50mOsm và 1000mOsm và thậm chí cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 100mOsm đến 1000mOsm.

Gradien thẩm thấu cũng có thể được thể hiện bởi sự khác biệt về tỷ lệ nồng độ/khối lượng giữa nồng độ/khối lượng của chất có hoạt tính thẩm thấu bên trong thể tích đã được bao nang bằng liposom và nồng độ/khối lượng của chất có hoạt tính thẩm thấu bên ngoài thể tích đã được bao nang bằng liposom. Khoảng gradien thẩm thấu được ưu tiên là sự khác biệt nồng độ/khối lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 30% khối lượng, nghĩa là gradien từ 0% đến 30% theo khối lượng của chất có hoạt tính thẩm thấu bên ngoài thể tích đã được bao nang và từ 10% đến 40% khối lượng của chất bên trong thể tích đã được bao nang.

Chế phẩm liposom thu được từ bước a) có thể được đưa vào bước đồng nhất hóa, có thể được thực hiện bằng cách ép đùn, lọc qua màng lọc, đồng nhất hóa ở áp suất cao và/hoặc đồng nhất hóa ở tốc độ cao và tốt nhất là bằng cách ép đùn qua màng, ví dụ có cỡ lỗ khoảng 200nm có sử dụng áp suất. Các màng có cỡ lỗ khác như 50nm, 100nm, 150nm, 400nm đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng có thể được sử dụng. Bước lọc qua màng lọc có thể được thực hiện bằng cách lọc qua màng làm từ PVDF, PES, màng lọc nylon, nhưng các nguyên liệu khác cũng có thể được sử dụng nếu được xác định là thích hợp. Tốt hơn, nếu cỡ lỗ của màng nằm trong khoảng từ 200nm đến 450nm, nhưng cỡ lỗ này không chỉ giới hạn ở các kích cỡ đã nêu. Các nguyên liệu khác và cỡ lỗ khác có thể được kết hợp với nhau để thu được dung dịch có thể được xử lý bằng cách lọc tiệt trùng. Theo một phương án được ưu tiên, liposom thu được từ bước a) được cho đồng nhất hóa trước khi gradien thẩm thấu được tạo ra.

Do tiết trùng là dấu hiệu bắt buộc của dược phẩm, huyền phù liposom được dùng trong quy trình theo sáng chế có thể được tiết trùng ở một số giai đoạn trong quy trình. Tốt hơn, nếu huyền phù này được tiết trùng bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng loại dùng để tiết trùng (0,22µm). Theo một phương án được ưu tiên, huyền phù liposom được vô trùng bằng cách lọc sau khi gradien thẩm thấu được tạo ra ở bước b) của quy trình theo sáng chế.

Theo khái niệm chung của sáng chế, gradien thẩm thấu giữa thể tích đã được bao nang và thể tích tự do có thể được tạo ra hoặc biến đổi một hoặc vài lần ở các giai đoạn khác nhau trong suốt quá trình điều chế chế phẩm liposom. Điều này có thể đạt được theo các quy trình giống nhau hoặc khác nhau như được mô tả dưới đây.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, bước b) của quy trình theo sáng chế có thể bao gồm các bước:

b1) loại nước cho chế phẩm liposom thu được từ bước a) để tạo ra chế phẩm liposom đã được loại nước, và

b2) hydrat hóa lại chế phẩm liposom đã loại nước này, tốt hơn là trong môi trường nước trong các điều kiện để thu được chế phẩm liposom đã được tạo ứng suất.

Thuật ngữ “chế phẩm liposom thu được từ bước a)” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ chế phẩm liposom được bào chế ở bước a) hoặc chế phẩm liposom bất kỳ có thể thu được từ chế phẩm liposom được bào chế ở bước a) theo các bước bào chế khác nhau. Các bước bào chế này có thể bao gồm đồng nhất hóa và/hoặc tiết trùng như nêu trên.

Theo một phương án được ưu tiên, việc tạo ra hoặc làm biến đổi gradien thẩm thấu được thực hiện ít nhất một lần sau khi điều chế chế phẩm liposom thứ nhất ở bước a) và trước khi loại nước cho chế phẩm liposom thu được từ bước a) này. Tốt hơn, nếu việc tạo ra hoặc làm biến đổi gradien thẩm thấu được thực hiện sau bước ép đùn và/hoặc sau khi lọc tiết trùng. Như đã nêu trên, gradien thẩm thấu tăng cường độ ổn định của huyền phù liposom được đưa vào các bước bào chế.

Tốt hơn, nếu bước loại nước được thực hiện ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ trong

phòng.

Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên của sáng chế, việc loại nước ở bước b1) được thực hiện bằng cách sấy phun huyền phù liposom. Trong quy trình sấy phun, huyền phù liposom trước tiên được phun thành các giọt nhỏ bằng cách phun huyền phù này. Sau đó, liposom được sấy bằng cách làm bay hơi môi trường khỏi các giọt nhỏ này ở nhiệt độ cao. Việc sấy liposom sau khi tạo giọt có thể được thực hiện bằng cách cho các giọt này tiếp xúc với dòng khí cấp, khô, có thể đã được làm nóng để thu được các hạt rắn. Dòng khí này có thể là khí trơ hoặc không khí. Tốt hơn, nếu khí sấy có thể là khí có hàm lượng oxy thấp chứa oxy hoặc khí không chứa oxy với lượng ít hơn 0,1% thể tích, tốt hơn nếu ít hơn 0,05% thể tích. Khí trơ làm gia tăng tính an toàn của hệ thống sấy đã được làm nóng chứa các dung dịch rất dễ cháy, bằng cách bơm nitơ, cacbon đioxit, heli, neon, argon, krypton, xenon và radon hoặc một số khí trơ khác để thay thế oxy. Tác dụng của hệ thống này là nhằm loại bỏ hoàn toàn oxy, hoặc làm giảm nó đến mức không đáng kể. Theo một phương án được ưu tiên, nitơ được sử dụng làm khí trơ. Theo một phương án khác của sáng chế, khí trơ bảo vệ hoạt chất và tá dược chứa trong chế phẩm. Tốt hơn, nếu việc sấy phun được thực hiện trong thiết bị thích hợp dùng để sấy phun. Liposom đã loại nước được tách khỏi dòng khí và được thu hồi. Bước sấy phun có thể được thực hiện trong điều kiện áp suất dư, áp suất thường hoặc chân không một phần. Khoảng áp suất xử lý thích hợp có thể tồn tại nếu bột phù hợp với đặc trưng kỹ thuật được tạo ra với khí sấy ở nhiệt độ hệ thống cho phép tối đa và ở công suất tối đa. Để lựa chọn các điều kiện sấy, tổ hợp các thông số như tốc độ nạp chất lỏng, tốc độ khí sấy, nhiệt độ khí sấy, các thông số nhiệt động của tá dược, và giới hạn độ ổn định của các hợp chất cần phải được tính đến. Các thông số quan trọng là nhiệt độ đầu vào của khí sấy $T_{\text{vào}}$, và nhiệt độ đầu ra, T_{ra} , ở bên trong thiết bị sấy phun. Về cơ bản T_{ra} thấp hơn $T_{\text{vào}}$ do làm mát đoạn nhiệt nhờ bay hơi. Nhiệt độ thực tế của bề mặt hạt có thể thấp hơn T_{ra} một cách đáng kể, tùy thuộc vào tốc độ bay hơi cục bộ. Vì vậy, không thể xác định được các thông số sấy phun chung. Để sấy liposom, nhiệt độ bên trong khoang xử lý có thể nằm trong khoảng từ 10°C đến 200°C. Thông thường hơn, huyền phù được sấy theo phương pháp theo sáng chế với nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 150°C, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 60°C đến 120°C. Thiết bị dùng cho quy trình sấy phun có thể do Büchi (Flawil, Switzerland), hoặc GEA

Niro (Soeborg, Denmark) cung cấp hoặc tự tạo. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể lựa chọn các điều kiện của quy trình sấy khô, ví dụ tốc độ và nhiệt độ nạp, tùy thuộc vào huyền phù cần sấy, thiết bị được sử dụng và đặc trưng kỹ thuật mong muốn.

Đặc biệt, các điều kiện của bước loại nước có thể được chọn để thu được hỗn hợp liposom đã loại nước với lượng dung môi hữu cơ rất thấp. Việc loại nước bằng cách sấy phun là đặc biệt thích hợp để thu được lượng dung môi hữu cơ còn lại là thấp.

Việc loại nước bằng cách sấy phun như bộc lộ trong bản mô tả cũng tạo ra hỗn hợp liposom đã được loại nước ở dạng bột có thể rót được. Bột này có các đặc tính xử lý tốt hơn, ví dụ đối với việc nạp chế phẩm đã loại nước này, so với chế phẩm đã loại nước thu được bằng cách sấy đông mà có cấu trúc kiểu bánh.

Theo một khía cạnh của sáng chế, việc loại nước gần như không làm ảnh hưởng đến tỷ lệ giữa chất có hoạt tính thẩm thấu đã được bao nang và chất có hoạt tính thẩm thấu tự do khi so sánh tỷ lệ này ở huyền phù liposom đã được đưa vào bước sấy phun và tỷ lệ này ở chế phẩm đã được sấy phun sau khi hydrat hóa lại trong nước.

Theo một khía cạnh nhất định của sáng chế, việc loại nước bằng cách sấy đông, hoặc làm đông lạnh, trong đó huyền phù liposom được làm đông lạnh và tiếp theo được áp dụng áp suất giảm để rút phân tử nước, không bao hàm trong phạm vi sáng chế.

Hỗn hợp đã loại nước, ví dụ như thu được ở bước b1) hoặc c) có thể được nạp vào vật chứa thích hợp và có thể được bảo quản trong khoảng thời gian nhất định. Tốt hơn, nếu hỗn hợp này được nạp và bảo quản trong các điều kiện vô trùng. Thời gian bảo quản có thể là từ vài ngày đến vài tháng hoặc thậm chí là vài năm. Hỗn hợp có thể được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng, ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C hoặc dưới 0°C.

Trước khi chế phẩm liposom đã loại nước được sử dụng, ví dụ được dùng cho bệnh nhân trong trường hợp chế phẩm liposom được sử dụng ở dạng dược phẩm, hoặc được xử lý tiếp, chế phẩm đã loại nước này được hydrat hóa lại theo bước b2 hoặc c).

Để thực hiện bước này, chế phẩm đã loại nước thu được như nêu trên được trộn với môi trường nước. Để tăng mức độ hydrat hóa lại, chế phẩm này có thể được khuấy hoặc xoáy.

Nồng độ thẩm thấu của môi trường nước được dùng để hydrat hóa lại thấp hơn nồng độ thẩm thấu toàn phần O_1 của huyền phù được đưa vào bước loại nước. Tốt hơn, nếu môi trường nước được sử dụng để hydrat hóa lại về cơ bản không chứa chất có hoạt tính thẩm thấu. Tốt nhất, nếu sử dụng nước loại dùng cho được phẩm để tiêm để hydrat hóa lại.

Theo một số phương án, thể tích của môi trường nước được sử dụng để hydrat hóa lại có thể lớn hơn thể tích của huyền phù liposom đã được loại nước để thu được lượng chế phẩm liposom đã được loại nước tương ứng.

Theo sáng chế, nồng độ thẩm thấu của môi trường nước được sử dụng để hydrat hóa lại và thể tích của môi trường được sử dụng để hydrat hóa lại được lựa chọn phối hợp để thu được huyền phù đã được hydrat hóa lại có nồng độ thẩm thấu toàn phần O_2 thấp hơn nồng độ thẩm thấu O_1 của huyền phù được chuyển đến bước loại nước.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, bước b) được thực hiện bằng cách pha loãng huyền phù liposom thu được từ bước a) để tạo ra môi trường nước có nồng độ thẩm thấu toàn phần O_2 thấp hơn O_1 .

Huyền phù liposom được pha loãng bằng môi trường nước như nêu trên. Theo một phương án được ưu tiên, huyền phù liposom được pha loãng bằng nước. Theo một phương án, môi trường nước được sử dụng để pha loãng huyền phù liposom không chứa hoạt chất, đặc biệt là không chứa hoạt chất được bao nang trong liposom.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, O_2 thấp hơn O_1 ít nhất là 10mOsm, tốt hơn nữa là O_2 thấp hơn O_1 ít nhất là 50mOsm, và thậm chí tốt hơn nữa là O_2 thấp hơn O_1 ít nhất là 100mOsm

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, bước b) được thực hiện bằng cách thẩm tách huyền phù liposom thu được từ bước a) bằng môi trường nước có nồng độ thẩm thấu toàn phần thấp hơn O_1 .

Tốt hơn, nếu bước thẩm tách được thực hiện trong điều kiện tạo ra gradien thẩm thấu nằm trong khoảng từ O_1 đến nồng độ thẩm thấu của môi trường nước mà việc thẩm tách được thực hiện ít nhất bằng 10mOsm, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 50mOsm và thậm chí tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 100mOsm.

Theo cách khác bước b) có thể được thực hiện theo các phương pháp thích hợp khác. Ví dụ nồng độ của chất có hoạt tính thẩm thấu có thể được giảm theo các phương pháp sắc ký thích hợp như sắc ký trao đổi ion hoặc sắc ký ái lực.

Theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, huyền phù liposom đã được tạo ứng suất thu được từ bước b) của quy trình nêu trên có thể được loại nước. Việc loại nước của huyền phù liposom đã được tạo ứng suất có thể được thực hiện theo quy trình thích hợp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết. Quy trình sấy thích hợp, ví dụ như sấy đông, sấy đông bằng cách phun hoặc sấy phun. Theo một phương án được ưu tiên, việc loại nước bằng cách sấy phun có thể được thực hiện như nêu trên đối với bước b_1). Theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, chế phẩm liposom đã loại nước thu được được hydrat hóa lại như nêu trên.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất quy trình trong đó huyền phù liposom ban đầu, tốt hơn nếu chứa các liposom cation, chứa DOTAP và tùy ý DOPC ở dạng lipid, và còn chứa hoạt chất ưa chất béo, tốt hơn là paclitaxel, trong màng liposom, được bào chế trong pha nước trehaloza. Nồng độ của các thành phần của huyền phù liposom này lớn gấp ba lần nồng độ của chúng trong huyền phù liposom được tạo ra theo quy trình mà cuối cùng nó được sử dụng, ví dụ được dùng cho người. Tốt hơn, nếu huyền phù liposom ban đầu có nồng độ khoảng 30mM lipid và khoảng 30mg/ml, tốt hơn nữa là 29,4mg/ml, trehaloza. Tùy ý, huyền phù liposom ban đầu được đồng nhất hoá bằng cách ép đùn qua màng trong bước tiếp theo. Sau đó, nồng độ thẩm thấu toàn phần của huyền phù liposom được làm giảm, tốt hơn là giảm 1,5 lần, tốt hơn là bằng cách pha loãng thể tích huyền phù liposom bằng nước, ví dụ đến 1,5 lần thể tích. Sau đó, huyền phù liposom này tùy ý được tiệt trùng, tốt hơn là bằng cách lọc. Trong bước tiếp theo, huyền phù liposom này được loại nước, tốt hơn là bằng cách sấy phun, để tạo ra huyền phù liposom đã được loại nước. Cuối cùng, huyền phù liposom đã loại nước được hydrat hóa lại để tạo ra huyền phù liposom, được sử dụng cho mục

đích tương ứng của nó, như dùng cho người. Tốt hơn, nếu huyền phù liposom sau cùng này có nồng độ lipit khoảng 10mM và nồng độ trehaloza khoảng 10mg/ml, tốt hơn là 9,79mg/ml.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình điều chế chế phẩm liposom, quy trình này bao gồm các bước:

i) tạo ra huyền phù liposom, trong đó pha nước của huyền phù này chứa ít nhất một chất có hoạt tính thẩm thấu, trong đó nồng độ thẩm thấu bên trong thể tích đã được bao nang bằng liposom cao hơn nồng độ thẩm thấu bên ngoài thể tích đã được bao nang bằng liposom,

ii) ủ huyền phù liposom này với hợp chất ưa chất béo, tùy ý ở dạng không hòa tan,

iii) tùy ý tách hợp chất không hòa tan bất kỳ ra khỏi huyền phù liposom, ví dụ bằng cách lọc, ly tâm hoặc các phương pháp thích hợp khác,

iv) tùy ý loại nước ra khỏi chế phẩm liposom, và

v) tùy ý hydrat hóa lại chế phẩm liposom đã được loại nước này.

Tốt hơn, nếu gradien thẩm thấu giữa bên trong và bên ngoài thể tích đã được bao nang bằng liposom nằm trong khoảng từ 10mOsm đến 2000mOsm, cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 50mOsm đến 1000mOsm và cụ thể hơn nữa là nằm trong khoảng từ 100mOsm đến 1000mOsm.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, huyền phù liposom ở bước i) không chứa hoạt chất hoặc chất dùng cho mỹ phẩm.

Liposom có gradien thẩm thấu ở bước i) có thể được bào chế như nêu trên. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, không có hoạt chất hoặc chất dùng cho mỹ phẩm nào được bổ sung vào trong quá trình điều chế huyền phù liposom ở bước i). Dạng không hòa tan của hoạt chất hoặc chất dùng cho mỹ phẩm có thể ví dụ như dạng tinh thể, ví dụ như có hình thái và kích cỡ khác nhau hoặc ở dạng bột.

Theo một phương án của sáng chế, chất không hòa tan được tách khỏi thể phân

tán sau khi ủ. Theo một phương án được ưu tiên, hợp chất không hòa tan được tách bằng cách ly tâm hoặc lọc. Việc lọc có thể được thực hiện trong thiết bị lọc xyranh.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm liposom thu được hoặc thu được từ các quy trình nêu trên. Chế phẩm này có thể ở dạng đã được loại nước hoặc ở dạng huyền phù trong nước.

Tốt hơn, nếu chế phẩm liposom theo sáng chế được dùng làm thuốc, ví dụ thuốc cho người hoặc động vật. Tốt hơn, nếu chế phẩm này được dùng qua đường tĩnh mạch. Tốt hơn nữa, nếu chế phẩm này được dùng để điều trị bệnh ung thư như bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư màng trong tử cung, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư phổi, u lympho, u hắc sắc tố, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt và bệnh ung thư ở trẻ nhỏ như u thần kinh đệm thân não, u tế bào hình sao vùng tiểu não, u não tế bào hình sao, u màng não thất, khối u sacôm Ewing/khối u di truyền, khối u tế bào mầm, ngoài sọ, bệnh Hodgkin, bệnh bạch cầu, nguyên bào lympho cấp tính, bệnh bạch cầu, bệnh tủy xương cấp tính, bệnh ung thư gan, u nguyên thủy bào, u nguyên bào thần kinh, u lympho không phải Hodgkin, sacôm xương/u mô bào sợi ác tính của xương, u nguyên bào võng mạc, sacôm cơ vân, sacôm mô mềm, u thần kinh ngoại bì nguyên thủy trên lều và u tuyến tụy, bệnh ung thư hiếm ở trẻ nhỏ, u thần kinh đệm dưới đồi và con đường thị giác, khối u Wilms và các khối u thận khác ở trẻ nhỏ và bệnh ung thư ít phổ biến hơn bao gồm bệnh bạch cầu lympho cấp tính, bệnh bạch cầu tủy xương cấp tính ở người trưởng thành, u lympho không phải Hodgkin ở người trưởng thành, khối u não, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư ở trẻ nhỏ, sacôm ở trẻ nhỏ, bệnh bạch cầu lympho mạn tính, bệnh bạch cầu tủy xương mạn tính, bệnh ung thư thực quản, bệnh bạch cầu tế bào tóc, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư gan, bệnh đa u tủy, u nguyên bào thần kinh, bệnh ung thư miệng, bệnh ung thư tuyến tụy, u lympho hệ thần kinh trung ương sơ cấp, bệnh ung thư da, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư túi mật, bàng quang và ống mật, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư dạ dày-ruột, sacôm Kaposi, tế bào caxinom niệu mạc, caxinom tuyến giáp, caxinom tinh hoàn, bệnh ung thư âm đạo, sacôm mạch, sacôm mô mềm, u trung biểu mô và caxinom tế bào gan. Đặc biệt, bệnh ung thư có thể là bệnh ung thư gây di căn và/hoặc bệnh ung

thư kháng điều trị chuẩn (bằng hóa chất). Việc sử dụng chế phẩm theo sáng chế có thể làm chậm hoặc làm dừng tiến trình bệnh, hoặc có thể dẫn đến sự thuyên giảm một phần hoặc hoàn toàn ở người. Tốt nhất là, bệnh ung thư tuyến tụy hoặc bệnh ung thư vú, đặc biệt là bệnh ung thư vú âm tính ba thụ thể, được điều trị. Chế phẩm liposom theo sáng chế có thể được dùng ở liều đơn vị khoảng 11mg/m^2 paclitaxel đến khoảng 44mg/m^2 paclitaxel, tốt hơn là ở liều đơn vị khoảng 22mg/m^2 paclitaxel. Tốt hơn, nếu các chế phẩm được dùng một hoặc hai lần mỗi tuần. Các chế phẩm liposom có thể được sử dụng như đã nêu trong WO2005/039533, WO 2006/117220, và WO 2007/107305.

Ngoài ra, chế phẩm liposom theo sáng chế có thể được sử dụng làm chế phẩm chẩn đoán hoặc mỹ phẩm.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất huyền phù liposom chứa hoạt chất hoặc hợp chất dùng cho mỹ phẩm trong màng liposom, trong đó liposom bao môi trường nước có nồng độ thẩm thấu cao hơn nồng độ thẩm thấu của môi trường nước bên ngoài thể tích đã được bao nang liposom. Môi trường nước của huyền phù chứa ít nhất một chất có hoạt tính thẩm thấu. Tốt hơn, nếu chênh lệch giữa nồng độ thẩm thấu của môi trường bên trong liposom và bên ngoài liposom ít nhất là 10mOsm , tốt hơn nếu ít nhất là 50mOsm .

Chênh lệch nồng độ thẩm thấu bên trong và bên ngoài liposom gây ra gradien áp suất thẩm thấu, gây ra ứng suất kéo trên màng liposom, như được mô tả trong tài liệu của Hallet và đồng tác giả, 1993. Vì vậy, sáng chế đề xuất huyền phù liposom chứa hoạt chất hoặc hợp chất dùng cho mỹ phẩm trong màng liposom, trong đó màng liposom này chịu ứng suất kéo.

Liposom, trong đó màng liposom chịu ứng suất kéo, có thể thu được bằng cách áp dụng gradien thẩm thấu như nêu trên.

Một số phương pháp xác định đặc tính hóa lý có thể được áp dụng để xác định gradien thẩm thấu và ứng suất kéo trong các chế phẩm liposom. Trong nhiều trường hợp, dung dịch chứa hoạt chất thẩm thấu có tỷ trọng cao hơn tỷ trọng của nước và tỷ trọng này thay đổi một cách đều đều theo nồng độ hợp chất. Nếu nồng độ thẩm thấu của thể tích đã được bao nang bằng liposom cao hơn nồng độ thẩm thấu của thể tích tự

do, thì điều này ảnh hưởng đến tỷ trọng liposom. Đối với trehaloza ở nồng độ 5% (150mOsm) trong nước, thì tỷ trọng cao hơn tỷ trọng của nước tinh khiết 0,02g/l (Handbook of Chemistry and Physics, CRC Press, Boca Raton, Florida). Do vậy, sự chênh lệch giữa nồng độ thẩm thấu bên trong và bên ngoài liposom dẫn đến sự khác biệt về tỷ trọng của môi trường bên trong thể tích đã được bao nang bằng liposom và môi trường bên ngoài thể tích đã được bao nang bằng liposom.

Vì vậy, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất huyền phù liposom, trong đó thể tích đã được bao nang bằng liposom có tỷ trọng cao hơn môi trường bên ngoài thể tích đã được bao nang bằng liposom. Sự chênh lệch về tỷ trọng được gây ra bởi gradien thẩm thấu được ưu tiên và tỷ trọng của dung dịch chứa chất có hoạt tính thẩm thấu tương ứng. Tỷ trọng của các hạt keo, như liposom, có thể được xác định theo phương pháp siêu ly tâm chẳng hạn.

Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên của sáng chế, huyền phù liposom chứa gradien thẩm thấu là huyền phù liposom chứa liposom bao gồm DOTAP, DOPC, và paclitaxel, tốt hơn là với tỷ lệ phân tử gam là 50:47:3, ở nồng độ lipid tổng là khoảng 10mM, trehaloza, và tùy ý axit xitric, được tạo huyền phù trong pha nước chứa khoảng 10mg/ml, đặc biệt là 9,79mg/ml, trehaloza, và tùy ý khoảng 0,011mg/ml axit xitric, trong đó liposom này có tỷ trọng khô ít nhất là khoảng 1,1g/ml, đặc biệt ít nhất khoảng 1,15g/ml, ít nhất khoảng 1,17g/ml, hoặc ít nhất khoảng 1,17g/ml. Tốt hơn, nếu liposom nêu trên có $Z_{\text{trung bình}}$ bằng khoảng 140nm.

Quy trình nêu trên cho phép bào chế huyền phù liposom chứa liposom như nêu trên, còn được đặc trưng bởi phân bố kích cỡ hạt được kiểm soát, trong đó khoảng phân bố kích cỡ hầu như không được mở rộng bởi quy trình điều chế, như đã được mô tả ví dụ bằng cách thay đổi chỉ số đa phân tán (polydispersity index - PI). Tốt hơn, nếu PI của huyền phù liposom theo sáng chế chứa gradien thẩm thấu không cao hơn 0,2, tốt hơn nữa nếu không cao hơn 0,1, bằng cách tạo ra gradien thẩm thấu.

Theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, hoạt chất hoặc hợp chất dùng cho mỹ phẩm về cơ bản chỉ chứa trong ngăn màng của liposom trong các chế phẩm liposom theo sáng chế. Do vậy, ít nhất khoảng 98%, tốt hơn nếu ít nhất khoảng 99%

lượng phân tử gam của tất cả các hoạt chất hoặc hợp chất dùng cho mỹ phẩm có mặt trong chế phẩm này được bao trong pha lipid của màng liposom này. Chỉ có lượng còn lại là có thể được hòa tan trong pha nước của chế phẩm này hoặc có thể có mặt ở dạng hoạt chất hoặc hợp chất dùng cho mỹ phẩm được kết tinh.

Huyền phù bột lợ trong bản mô tả này, mà có thể thu được theo các quy trình đã biết, là bền hơn đối với việc giải phóng thuốc so với huyền phù liposom thông dụng có thể so sánh được được điều chế không có gradien thẩm thấu. Độ ổn định theo thời gian đối với việc giải phóng thuốc từ liposom là cao hơn, và chế phẩm này ít bị giải phóng thuốc khi chịu các ứng suất cơ học và/hoặc các ứng suất khác. Tốt hơn, nếu việc giải phóng thuốc có thể được ngăn cản ít nhất trong 6 giờ, tốt hơn nếu ít nhất trong 12 giờ, ít nhất trong 24 giờ, ít nhất trong 2 ngày, ít nhất trong 7 ngày hoặc ít nhất trong 14 ngày hoặc lâu hơn ở 25°C, so với huyền phù không có gradien thẩm thấu. Việc xác định mức giải phóng thuốc phụ thuộc vào loại thuốc. Đối với liposom được nạp paclitaxel, mức độ giải phóng thuốc có thể được theo dõi một cách dễ dàng bằng cách xác định các hạt thuốc (tinh thể) tạo thành sau khi giải phóng. Các hạt có thể được xác định, ví dụ theo phương pháp phổ nhiễu xạ tia X, hoặc các kỹ thuật tán xạ ánh sáng.

Theo một phương án của sáng chế, ít nhất khoảng 90%, tốt hơn là ít nhất khoảng 95%, tốt nhất là 99% lượng hoạt chất hoặc hợp chất dùng cho mỹ phẩm đã hòa tan bởi màng liposom được duy trì trong liposom trong ít nhất khoảng 24 giờ ở nhiệt độ trong phòng và không được giải phóng vào pha nước của huyền phù. Do việc giải phóng các hoạt chất ưa chất béo hoặc các hợp chất ưa chất béo dùng cho mỹ phẩm, có độ hoà tan kém trong pha nước, có thể dẫn đến sự hình thành tinh thể, huyền phù theo sáng chế về cơ bản không tạo thành tinh thể đến lượng tương ứng lớn hơn 10%, tốt hơn là lớn hơn 5%, tốt nhất là lớn hơn 1% chất hòa tan trong 24 giờ ở 25°C.

Hơn nữa, huyền phù liposom theo sáng chế thu được bằng cách hydrat hóa lại chế phẩm liposomal đã được loại nước như nêu trên không tạo ra kết tụ sau khoảng thời gian ít nhất khoảng 24 giờ ở 25°C. Sự tạo thành kết tụ có thể được xác định bằng cách xác định thay đổi của $Z_{\text{trung bình}}$ và PI theo phương pháp quang phổ tương quan photon (photon correlation spectroscopy - PCS). Huyền phù theo sáng chế được đặc trưng bởi thay đổi của $Z_{\text{trung bình}}$ với hệ số không lớn hơn 1,5, tốt hơn là không lớn hơn

1,25, và thay đổi trị số PI với hệ số không lớn hơn 2, tốt hơn là không lớn hơn 1,5, tốt nhất là không lớn hơn 1,25 sau 24 giờ. Tốt hơn, nếu huyền phù liposom với các đặc tính này được tạo ra bằng cách hydrat hóa lại chế phẩm liposom đã được loại nước.

Do các dung môi hữu cơ thường được sử dụng để bào chế liposom, ví dụ như đã nêu trên đối với phương pháp phun etanol, phần dung môi hữu cơ còn lại, như etanol, thường được tìm thấy trong sản phẩm liposom đã được loại nước, và do đó thường được tìm thấy trong huyền phù liposom đã hydrat hóa lại có nguồn gốc từ nó. Điều này là đặc biệt đúng đối với các chế phẩm liposom đã được loại nước bằng cách sấy đông (đông khô nhanh). Tuy nhiên, mong muốn sản phẩm liposom được dùng cho người chứa càng ít dung môi hữu cơ càng tốt. Sáng chế cho phép loại nước bằng cách sấy phun, tạo điều kiện thuận lợi cho việc loại bỏ hầu hết hoặc tất cả dung môi hữu cơ còn lại, đồng thời thu được liposom có độ ổn định cao. Do vậy, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm liposom đã được loại nước như nêu trên chứa dung môi hữu cơ với lượng ít hơn 1% khối lượng, tốt hơn nữa là ít hơn 0,5% khối lượng, tốt nhất là ít hơn 0,1% khối lượng tính trên tổng khối lượng chế phẩm đã được loại nước. Bằng cách hydrat hóa lại các chế phẩm liposom đã được loại nước này, thu được huyền phù liposom chứa dung môi hữu cơ với lượng ít hơn 1mg/ml, tốt hơn nữa là ít hơn 0,5mg/ml, tốt nhất là ít hơn 0,1mg/ml. Tốt hơn, nếu dung môi hữu cơ là etanol.

Ngoài ra, huyền phù liposom theo sáng chế, thu được bằng cách hydrat hóa lại chế phẩm liposom đã được loại nước như nêu trên, có profin phân bố kích cỡ tương tự huyền phù liposom ban đầu đã được loại nước như nêu trên. Cụ thể hơn, kích cỡ liposom được duy trì tốt và mức độ tạo thành kết tụ lipid không đáng kể như được xác định theo phương pháp PCS. Theo một phương án của sáng chế, huyền phù liposom được loại nước và huyền phù liposom thu được bằng cách hydrat hóa lại như nêu trên được đặc trưng bởi $Z_{\text{trung bình}}$ khác bởi hệ số nhỏ hơn 1,5 và trị số PI khác bởi hệ số nhỏ hơn 2 (theo phương pháp PCS). Tốt hơn, nếu PI của huyền phù liposom đã được hydrat hóa lại 1 giờ sau khi hoàn nguyên nhỏ hơn 0,4, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 0,3, tốt nhất là nhỏ hơn 0,25. Tốt hơn, nếu PI của huyền phù đã nêu chỉ thay đổi một chút sau 24 giờ ở 25°C, như nêu trên.

Theo một phương án riêng, sáng chế đề xuất huyền phù liposom trong nước đã

được hydrat hóa lại chứa liposom cation chứa paclitaxel với lượng lên tới khoảng 5% phân tử gam, tốt hơn là lên tới khoảng 3% phân tử gam trong màng liposom, trong đó PI của huyền phù liposom 1 giờ sau khi hoàn nguyên nhỏ hơn 0,4, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 0,3, tốt nhất là nhỏ hơn 0,25, và ngoài ra còn đặc trưng bởi thay đổi $Z_{\text{trung bình}}$ bởi hệ số không lớn hơn 1,5, tốt hơn là không lớn hơn 1,25, và thay đổi trị số PI bởi hệ số không lớn hơn 2, tốt hơn là không lớn hơn 1,5, tốt nhất là không lớn hơn 1,25 sau 24 giờ ở 25°C.

Tốt hơn, nếu liposom của huyền phù liposom đã được hydrat hóa lại nêu trên không giải phóng paclitaxel ra khỏi màng liposom vào môi trường nước trong vòng 24 giờ ở 25°C với lượng lớn hơn 2% khối lượng, tốt hơn là không lớn hơn 1% khối lượng (tính theo tổng khối lượng paclitaxel).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nạp paclitaxel vào liposom với các gradien trehaloza khác nhau

Tổng quan

Tác động của gradien thẩm thấu đến tỷ lệ phân bố paclitaxel trong liposom ở trạng thái cân bằng với pha nước bão hoà được nghiên cứu. Liposom với gradien thẩm thấu khác nhau được tạo ra và ủ thành tinh thể paclitaxel. Tất cả các chế phẩm đều có cùng thành phần; chính xác hơn, nồng độ lipid là $c_{\text{lipit}} = 10\text{mM}$ và nồng độ trehaloza là $c_{\text{trehaloza}} = 10\%$ (khối lượng). Một số chế phẩm được bào chế và ép đùn ở nồng độ lipid và trehaloza cao hơn, và được pha loãng bằng nước sau khi ép đùn đến nồng độ cuối cùng. Theo cách này, pha nước tự do được pha loãng, nhưng pha nước đã được bao nang không được pha loãng (không tính đến tác dụng gây trương nở và trao đổi chất hòa tan do lỗi). Gradien thẩm thấu giữa pha nước đã được bao nang và pha nước tự do được thiết lập, gradien này tăng khi mức pha loãng tăng. Liposom tạo thành theo cách này được ủ với paclitaxel khô và xác định lượng paclitaxel được hòa tan bởi liposom. Nhận thấy sự gia tăng đều đặn paclitaxel đã hòa tan khi mức pha loãng (gradien nồng độ) tăng. Kết quả này chỉ ra rằng lượng paclitaxel phân bố trong màng liposom ở trạng thái cân bằng sẽ tăng khi gradien thẩm thấu tăng.

Nguyên liệu

Paclitaxel, lô 06/150	Cedarburg Pharmaceuticals
DOTAP, lô MBA 113	Merck Eprova
DOPC, lô G181PC49	Avanti Polar Lipids
Nước, Milli-Q -Tổng hợp	Millipore
Trehaloza-đihydrat, độ tinh khiết cao	Senn Chemicals
Clorofom, cho mỗi phân tích	Merck
Axetonitril, loại dùng cho HPLC (ACN)	Merck
Tetrahydrofuran, loại dùng cho HPLC (THF)	Merck
Amoni axetat, cho mỗi phân tích	Merck
Trifloaxit axetic, cho mỗi phân tích	Merck
Thiết bị lọc xyranh minisart cỡ lỗ 0,2µm, đường kính 25mm	Sartorius
Màng: Xenluloza axetat	
Hệ thống HPLC 1100	Agilent
Thiết bị loại khí (G1379A)	
Bơm binary (G1312A)	
Thiết bị lấy mẫu tự động có điều nhiệt (Autoinjektor G1329A, Thermostat G1330B)	
Phản cột có điều nhiệt (G1316A)	
Bộ dò dây diot (G1315B) hoặc bộ dò có chiều dài bước sóng thay đổi (G1314A)	
ChemStation đối với LC 3D, Rev. A.09,01	
Thiết bị ép đùn, 10ml	Northern Lipids
Zetasizer 3000	Malvern Instruments

Các phương pháp

Điều chế liposom rỗng

Chế phẩm DOTAP/DOPC (tỷ lệ 1:1), hoặc chế phẩm chỉ chứa DOTAP hoặc DOPC, được điều chế theo phương pháp màng. Lượng lipid cần thiết được cân vào bình thót cổ đáy bằng và được hòa tan trong clorofom. Dung môi được làm bay hơi đến khô trong thiết bị bay hơi kiểu quay (Heidolph, Đức) ở áp suất khoảng 150mbar ở nhiệt độ khoảng 40°C trong khoảng 15 phút. Màng được sấy khô ở 10mbar trong 60 phút và

tiếp theo được hydrat hóa trong dung dịch nước trehaloza bằng cách lắc nhẹ bình thót cổ. Lượng lipid, nồng độ trehaloza và thể tích dung dịch trehaloza được chọn để tạo ra huyền phù có nồng độ lipid nằm trong khoảng từ 10mM đến 40mM và nồng độ trehaloza nằm trong khoảng từ 9,8% đến 39,2% (khối lượng/thể tích) đối với chế phẩm DOTAP/DOPC và nồng độ lipid nằm trong khoảng từ 10mM đến 30mM và nồng độ trehaloza nằm trong khoảng từ 9,8% đến 29,4% (khối lượng/thể tích) đối với chế phẩm chỉ chứa DOTAP hoặc DOPC. Huyền phù liposom đa lớp thu được được ép đùn 5 lần qua màng polycarbonat có cỡ lỗ 200nm ở áp suất khoảng 5bar. Sau khi ép đùn, huyền phù này được pha loãng bằng nước để thu được huyền phù có nồng độ lipid 10mM và nồng độ trehaloza tổng 9,8% (khối lượng/thể tích).

Nạp paclitaxel

5ml Huyền phù chứa liposom rỗng được điều chế như nêu trên được bổ sung vào 2,6mg paclitaxel khô (tương ứng với nồng độ paclitaxel theo lý thuyết 600 μ M) trong ống Falcon có dung tích 15ml. Các mẻ được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng (thiết bị khuấy từ).

Sau khi khuấy, paclitaxel không gắn kết liposomal được tách riêng bằng cách lọc 2ml ở mỗi mẻ qua thiết bị lọc xyranh (Sartorius minisart, 0,2 μ m, màng xenluloza axetat). Tiếp theo, nồng độ paclitaxel và lipid trong dịch lọc thu được được phân tích theo phương pháp HPLC.

Phương pháp phân tích

Xác định hàm lượng paclitaxel

Các mẫu được pha loãng trong ACN/THF/2mM amoni axetat 48/18/34 (theo thể tích).

Pha tĩnh:	LiChroCART® 250-4; LiChrospher 60, RP-select B chiều dài 250mm, ID: 4mm, cỡ hạt 5 μ m
Pha động:	ACN/THF/2mM amoni axetat 32/12/56 (theo thể tích)
Lưu tốc:	1ml/phút
Nhiệt độ cột:	35°C

Bước sóng dò:	229 nm
Thể tích phun vào:	10 μ l
Thời gian chạy:	40 phút

Xác định hàm lượng lipid

Hàm lượng lipid của các mẻ trước và sau khi lọc được xác định theo phương pháp HPLC để theo dõi mức hao hụt có thể có của vật liệu liposom bởi quy trình lọc. Các mẫu được pha loãng trong ACN/nước 50/50.

Pha tĩnh:	Phenomenex Luna 5 μ C8(2) 100Å, 150mm x 2mm
Pha động:	Axetonitril với 0,1% TFA, nước với 0,1% TFA

Xác định gradien lipid;

Thời gian (phút)	ACN (%)
0	50
4,12	50
7,06	75
14,13	100
21,20	100
23,56	50
30,00	50

Lưu tốc:	0,4 ml/phút
Nhiệt độ cột:	45°C
Chiều dài bước sóng của bộ dò:	205nm
Thể tích được bơm vào:	5 μ l
Thời gian chạy:	30 phút

Kết quả

Chế phẩm DOTAP/DOPC

Trên hình 1, lượng paclitaxel được hòa tan bằng cách ủ với chế phẩm liposom

DOTAP/DOPC khác nhau được thể hiện. Tất cả các chế phẩm đều chứa cùng một lượng lipid (liposom) và trehaloza. Các chế phẩm này thu được từ các chế phẩm đặc hơn khác bằng cách pha loãng bằng nước. Ngoại trừ nồng độ tuyệt đối, tất cả các chế phẩm ban đầu đều tương đương và được xử lý như nhau. Tọa độ thể hiện nồng độ trehaloza ban đầu, trước khi pha loãng. Do trong tất cả các trường hợp, nồng độ trehaloza chung cuối cùng là 10%, gradien trehaloza tăng khi trị số tọa độ tăng. Như có thể thấy, lượng paclitaxel được hòa tan bởi liposom sẽ tăng đều đặn cùng với gradien trehaloza (khi pha loãng). Khả năng nạp liposom tăng khi gradien trehaloza tăng.

Chế phẩm DOTAP và DOPC

Bảng sau chỉ ra lượng paclitaxel được hòa tan bởi chế phẩm liposom DOTAP và DOPC (thành phần đơn) phụ thuộc vào nồng độ trehaloza ban đầu được dùng để điều chế:

Bảng 1: Chế phẩm DOTAP và DOPC

c_0 trehaloza (%)	Nồng độ paclitaxel (μM)	
	DOTAP	DOPC
9,8	163	159
12,3	192	167
14,7	225	192
17,2	297	224
19,6	289	217
24,5	297	289
29,4	339	221

Đối với liposom từ lipid tinh khiết, cũng nhận thấy sự phụ thuộc rõ rệt của gradien trehaloza vào khả năng hòa tan. Đối với chế phẩm DOTAP, quan sát thấy khi sự khác biệt về nồng độ trehaloza bên trong và bên ngoài liposom ngày càng tăng thì khả năng nạp paclitaxel là tăng như ở chế phẩm DOTAP/DOPC. Hiệu quả này kém rõ rệt hơn ở liposom chứa 100% DOPC.

2. Nạp paclitaxel vào liposom với gradien trehaloza khác nhau sau khi sấy phun

2.1. Tổng quan

Mục đích của ví dụ này là để thử nghiệm xem liệu gradien thẩm thấu có tác dụng tích cực đối với khả năng nạp paclitaxel vào liposom hay không nếu liposom này được sấy phun giữa bước tạo ra và điều chỉnh trehaloza gradien. Liposom DOTAP/DOPC được điều chế ở hai nồng độ khác nhau, cụ thể là 10mM lipid trong dung dịch trehaloza 10% (khối lượng) và 20mM lipid trong dung dịch trehaloza 20% (khối lượng). Cả hai chế phẩm này đều được sấy phun ở nồng độ tương ứng. Bột sau khi sấy phun đều được hoàn nguyên bằng nước đến nồng độ lipid 10mM và nồng độ trehaloza tương ứng 10% (khối lượng). Chế phẩm lỏng được cho tiếp xúc với paclitaxel như nêu trên, và xác định lượng paclitaxel hòa tan. Đã phát hiện ra rằng, chế phẩm mà được sấy phun từ trạng thái cô đặc gấp đôi (20mM lipid/20% (khối lượng) trehaloza) hòa tan nhiều paclitaxel hơn chế phẩm mà được sấy phun từ trạng thái cô đặc duy nhất (10mM lipid, 10% khối lượng trehaloza).

Kết quả cho thấy rằng sự phân bố trehaloza bên trong/bên ngoài liposom không bị ảnh hưởng bởi việc sấy phun trong các điều kiện chọn lọc. Sau khi hoàn nguyên sản phẩm cô đặc, thu được liposom với gradien nồng độ trehaloza, tương ứng với tác dụng của việc pha loãng trực tiếp chế phẩm lỏng.

2.2. Các phương pháp

Tạo liposom

Chế phẩm được điều chế bằng cách phun ethanol. Lượng thích hợp của dung dịch lipid trong ethanol (200mM DOTAP-Cl, 188mM DOPC) được phun khi khuấy vào dung dịch chứa trehaloza trong nước. Nồng độ trehaloza là 20% (khối lượng) cho 20mM liposom và 10% (khối lượng) cho 10mM liposom. Lượng dung dịch lipid trong ethanol cần thiết là khoảng 2,5ml/l đối với chế phẩm 10mM và 5ml đối với chế phẩm 20mM.

Chế phẩm liposom đa phân tán được ép đùn 5 lần dọc qua màng polycarbonat có cỡ lỗ 200nm ở áp suất khoảng 5 bar.

Sấy phun

Bước sấy phun được thực hiện bằng thiết bị sấy phun cỡ micro Niro SD bằng cách sử dụng hai vòi phun chất lỏng. Các điều kiện sấy là như sau: nhiệt độ đầu ra = 100°C, nhiệt độ đầu vào = 145°C, tốc độ nạp liệu = 340g/giờ, tốc độ khí phun là 2,3kg/giờ, tốc độ khí làm khô là 30kg/giờ.

Hoàn nguyên

Bột khô, từ chế phẩm 10mM trước đây và từ chế phẩm 20mM trước đây, đều được hoàn nguyên bằng nước đến nồng độ lipid 10mM.

Thử nghiệm nạp paclitaxel

Việc nạp paclitaxel vào liposom được thực hiện như được mô tả trong .

2.3 Kết quả

Kết quả thu được từ việc nạp paclitaxel vào bột đã được hoàn nguyên được thể hiện trong bảng 2. Như có thể thấy, chế phẩm mà được sấy phun ở nồng độ lipid 20mM hòa tan nhiều paclitaxel hơn so với chế phẩm có nồng độ lipid ban đầu là 10mM. Kết luận rằng mức nạp paclitaxel tăng đối với chế phẩm 20mM trước đây là do gradient thẩm thấu giữa pha nước đã được bao nang và pha nước tự do, gradient này không có ở chế phẩm 10mM trước đây. Việc sấy phun và hoàn nguyên bột khô không dẫn đến sự cân bằng trehaloza giữa pha nước bên trong và pha nước bên ngoài, và vì vậy nồng độ thẩm thấu của pha nước đã được bao nang cao hơn trong trường hợp chế phẩm 20 mM trước đây.

Bảng 2: Hòa tan paclitaxel bằng chế phẩm thu được bằng cách hoàn nguyên bột đã được sấy phun. Nồng độ lipid và trehaloza là bằng nhau trong cả hai trường hợp (10mM lipid, 10% khối lượng trehaloza), nhưng trước khi sấy phun một chế phẩm là 10 mM lipid, 10% trehaloza và chế phẩm còn lại là 20mM lipid, 20% trehaloza.

Nồng độ lipid ban đầu của chế phẩm	Nồng độ của paclitaxel đã hòa tan
10mM (PD_L_07030)	164 (μ M)
20mM (PD_L_07031)	340 (mM)

3. Độ ổn định của liposom đã nạp

3.1. Tổng quan

Để đánh giá xem liệu các chế phẩm liposom có gradien trehaloza bên trong / bên ngoài không chỉ có khả năng nạp tăng mà còn có độ ổn định cao hơn đối với việc giải phóng paclitaxel, mức độ giải phóng paclitaxel ra khỏi liposom được theo dõi theo thời gian. Chế phẩm với phân đoạn paclitaxel tương đối cao, nghĩa là 5%mol, và với gradien trehaloza khác nhau nằm trong khoảng từ 0% đến 20% (khối lượng) được điều chế. Liposom chứa gradien trehaloza giải phóng paclitaxel ở mức độ hầu như không đáng kể trong khoảng thời gian thử nghiệm 21 ngày, trong khi ở liposom không có gradien trehaloza, phân đoạn paclitaxel còn lại giảm đến dưới 1%.

3.2. Phương pháp

Chế phẩm DOTAP/DOPC

Liposom DOTAP/DOPC chứa khoảng 5%mol paclitaxel (xem bảng để biết trị số chính xác), 10mM đến 30mM lipit, và 9,8% đến 29,4% (khối lượng/thể tích) trehaloza được điều chế theo phương pháp màng nêu trên bằng cách bổ sung lượng lipit và paclitaxel tương ứng vào dung dịch clorofom. Sau đó, các mẻ 30mM được pha loãng đến nồng độ lipit 10mM (nồng độ trehaloza chung là 9,8% khối lượng/thể tích) bằng nước.

Các mẫu được bảo quản ở 4°C và hàm lượng paclitaxel của liposom được xác định sau 0, 1, 5, 14, và 21 ngày theo phương pháp nêu trên có áp dụng bước lọc và phân tích HPLC.

3.3. Kết quả

Kết quả được tóm tắt trong bảng 3. Nồng độ của paclitaxel (μM) còn lại trong liposom được thể hiện. Nồng độ lipit là 10mM, vì vậy, nồng độ paclitaxel là 100 μM tương ứng với nồng độ phân tử gam đối với lipit là 1%.

Trong chế phẩm không có gradien trehaloza, phân đoạn trehaloza còn lại phân rã đều đặn đến trị số nhỏ hơn 100 μM (nhỏ hơn 1%mol đối với lipit) sau 21 ngày. Ngược lại, ở chế phẩm với gradien trehaloza, phần paclitaxel còn lại không giảm

xuống dưới $400\mu\text{M}$. Không quan sát thấy sự phân rã đều đặn trong trường hợp này, nói cách khác, dường như trị số khoảng $400\mu\text{M}$ là trạng thái ổn định về mặt vật lý của paclitaxel trong liposom.

Bảng 3: Giữ lại paclitaxel trong liposom DOTAP/DOPC

	gradient nồng độ trehaloza		
	0	10 %	20 %
lượng paclitaxel được giữ lại bởi liposom (μM)			
trước khi lọc	470	444	425
thời gian (ngày) sau khi lọc			
0	453	446	411
1	438	428	407
5	391	429	420
14	90	427	412
21	79	409	400

Các phân đoạn paclitaxel còn lại cuối cùng tương tự với các dữ liệu thu được từ thử nghiệm nạp đối với liposom đã được xử lý một cách tương đương. Do đó, dữ liệu từ thử nghiệm nạp có thể được xem như dự đoán về giới hạn ổn định của liposom đã được nạp. Nếu không có các tác dụng khác xảy ra, các con số từ thử nghiệm nạp sẽ đưa ra thông tin về lượng paclitaxel được giữ lại bởi liposom trong các điều kiện đã nêu. Một kết luận khác từ phần ví dụ này là dường như gradient trehaloza, và độ ổn định gia tăng, được duy trì trong vài ngày. Trong trường hợp này, tác dụng này được duy trì trong 21 ngày.

4. Các phương pháp xác định tại chỗ gradient trehaloza ở các chế phẩm liposom

4.1. Tóm tắt

Chế phẩm liposom đậm đặc trehaloza ở nồng độ c_1 được điều chế và được pha loãng bằng nước hoặc bằng dung dịch trehaloza với các tỷ lệ khác nhau để thu được môi trường với nồng độ trehaloza c_2 , trong đó $c_2 \leq c_1$. Tất cả các chế phẩm này có cùng nồng độ lipid cuối là 10mM . Các chế phẩm này được phân tích trên cơ sở thay đổi cục

bộ các đặc tính quang học (chiết suất). Tốc độ đếm của phép đo tán xạ ánh sáng động học được sử dụng để thể hiện thay đổi về cường độ phân bố. Khi gradien trehaloza tăng, c_1 - c_2 , thì tốc độ đếm của phép đo tán xạ ánh sáng động học (theo phương pháp PCS) tăng đều đặn.

4.2 Phương pháp

Độ tán xạ ánh sáng động học được đo bằng dụng cụ đo góc BI-200SM do Brookhaven Instruments (Holtville USA) cung cấp. Các phép đo được thực hiện với nguồn laze 30mW có bước sóng 641nm ở góc 90°. Để phân tích dữ liệu, thực hiện phép biến nạp Laplace đảo với các kỹ thuật hệ thống hóa tối ưu.

4.3 Các mẫu

Liposom DOTAP/DOPC (tỷ lệ phân tử gam 1:1) với tổng nồng độ lipid 30mM được điều chế trong dung dịch trehaloza 30%. Chế phẩm liposom chứa 30mM lipid và 30% trehaloza được ép đùn dọc qua màng ép đùn cỡ 200. Tiếp theo, liposom này được pha loãng bằng nước, dung dịch trehaloza 30% hoặc hỗn hợp của chúng theo tỷ lệ như nêu trong bảng.

A: 30mM liposom trong dung dịch trehaloza 30%

B: dung dịch nước trehaloza 30%

C: Nước

Bảng 4: Quy trình pha loãng đối với chế phẩm chứa 10mM lipid trong pha nước bằng trehaloza ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10% đến 30% (khối lượng)

#	Thể tích A	Thể tích B	Thể tích C	Chế phẩm cuối cùng
1	1	2	-	10mM liposom trong trehaloza 30%
2	1	1,5	0,5	10mM liposom trong trehaloza 25%
3	1	1	1	10mM liposom trong trehaloza 20%
4	1	0,5	1,5	10mM liposom trong trehaloza 15%
5	1	-	2	10mM liposom trong trehaloza 10%

Nồng độ lipid trong chế phẩm cuối cùng thường là 10mM, nhưng nồng độ trehaloza chung thay đổi trong khoảng 10% (pha loãng bằng nước) đến 30% (pha

loãng bằng dung dịch trehaloza 30%). Nếu nồng độ trehaloza ban đầu là 30% thì tạo ra con số gradien nồng độ trehaloza nằm trong khoảng từ 0% (tổng nồng độ = 30%) đến 20% (tổng nồng độ = 10%). Một giờ sau khi pha loãng, phép đo tán xạ ánh sáng được thực hiện.

4.4 Kết quả

Hình 2 thể hiện kết quả của phép đo tán xạ ánh sáng động học. Tốc độ đếm được thể hiện dưới dạng hàm của gradien trehaloza. Tốc độ đếm tăng đều khi gradien trehaloza tăng. Tốc độ này có thể được hiệu chỉnh theo mức tăng gradien chiết suất và tác dụng làm trương nở đối với gradien trehaloza tăng. Đã biết rõ rằng, liposom có thể đóng vai trò làm chất thẩm thấu lý tưởng, và gradien thẩm thấu có thể được xác định từ các đặc tính tán xạ ánh sáng và hấp thụ ánh sáng trong các điều kiện thích hợp (de Gier 1993; Cabral, Hennies et al. 2003). Bên cạnh cường độ của phân tích tán xạ ánh sáng hầu như co giãn, các kỹ thuật tán xạ ánh sáng khác cũng như các phương pháp đo độ hấp thụ hoặc đo độ đục có thể được áp dụng. Các quan sát này cho thấy rằng việc phân tích tốc độ đếm của các phép đo tán xạ ánh sáng có thể được sử dụng làm công cụ kiểm soát sự thành công của việc tạo ra gradien trehaloza đối với chế phẩm. Ngoài ra, dữ liệu này xác nhận rằng thay đổi về nồng độ thẩm thấu của môi trường nước của huyền phù liposom hoàn lại các đặc tính vật lý của liposom.

5. Ảnh hưởng của gradien trehaloza lên độ ổn định về mặt vật lý của chế phẩm liposom lỏng DOTAP/DOPC chứa paclitaxel

5.1 Tổng quan

Trong ví dụ này, tác dụng làm ổn định của gradien trehaloza đối với chế phẩm liposom DOTAP/DOPC chứa paclitaxel như được thể hiện bởi ví dụ 3 được khảo sát tiếp. Liposom được bào chế ở nồng độ 30mM (trong dung dịch trehaloza 32% khối lượng), được pha loãng bằng dung dịch trehaloza/nước khác nhau, và xác định mức paclitaxel giải phóng sau khi ứng suất cơ học.

Đã phát hiện ra rằng, độ ổn định vật lý tăng khi gradien trehaloza tăng. Phát hiện này xác nhận rằng tác dụng làm ổn định của gradien trehaloza đối với liposom

chứa paclitaxel cũng đạt được ở xử lý trên quy mô thí nghiệm.

5.2. Phương pháp và nguyên liệu

Điều chế liposom

Liposom được sản xuất theo kỹ thuật phun etanol. Một cách vắn tắt, dung dịch chứa 200mM DOTAP và 188mM DOPC (tổng nồng độ lipit 388mM) được phun đồng thời khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C vào pha nước (8,11ml dung dịch lipit trong etanol cho 100ml pha nước) để thu được liposom đa phân tán với nồng độ lipit khoảng 30mM. Đối với pha nước, dung dịch chứa 32,1% khối lượng trehaloza đihydrat với 184,5 μ M axit xitric được chọn.

Thực hiện bước ép đùn như đã nêu ở áp suất 3 bar với màng polycarbonat có cỡ lỗ 220nm. Thực hiện bước lọc vô trùng như đã nêu bằng cách sử dụng thiết bị lọc tiệt trùng milipak 20 hoặc màng durapore (do Millipore, Molsheim, France cung cấp).

Gradient nồng độ

Chế phẩm liposom 30mM ban đầu trong dung dịch trehaloza 30% (khối lượng) (PD-L-09111) được pha loãng bằng nước đến nồng độ lipit và trehaloza cuối cùng khác nhau.

Bảng 5: pha loãng các mẫu thử nghiệm

Tên	PD-L-09111 (ml)	Nước (ml)	C _{lipit} (mM)	C _{trehaloza} (% khối lượng)	Δ c trehaloza (% khối lượng)
PD-L-09111	100	0	30	30	0
PD-L-09112	70	70	15	15	15
PD-L-09113	90	54	18,8	18,8	11,2
PD-L-09114	100	0	30	30	0
PD-L-09115	80	64	16,7	16,7	13,3
PD-L-09116	100	40	21,4	21,4	8,6
PD-L-09119	100	24	25	25	5

Kiểm tra độ ổn định

Các mẫu được đưa vào máy lắc và lắc với tốc độ 150 vòng/phút lần lượt ở 25°C hoặc ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C. Sau 24 và 48 giờ, các mẫu được phân tích và lượng paclitaxel còn lại trong liposom được xác định.

Xác định sự duy trì/giải phóng paclitaxel trong các chế phẩm liposom

Mức duy trì paclitaxel trong liposom được khảo sát bằng cách lọc các chế phẩm liposom để loại bỏ tinh thể paclitaxel ra khỏi sản phẩm liposom (như mô tả trong ví dụ 3). Paclitaxel còn sót lại được định lượng theo phân tích HPLC. Ngoài ra, kính hiển vi quang học được sử dụng để khảo sát các mẫu về tinh thể paclitaxel.

5.3 Kết quả

Kết quả được thể hiện trong các bảng 6 đến 12. Để đơn giản, nồng độ trehaloza ban đầu là khoảng 30% (khối lượng). Gradient nồng độ như thể hiện được tính từ nồng độ trehaloza ban đầu và hệ số pha loãng. Gradient nồng độ thực tế giữa pha đã được bao nang và pha nước tự do sẽ có cùng xu hướng, nhưng các trị số tuyệt đối có thể khác một chút so với các trị số được nêu trong bảng.

Như có thể nhận thấy, độ ổn định tăng khi gradient trehaloza tăng. Quan sát thấy lượng paclitaxel còn lại trong liposom tăng và tinh thể paclitaxel giảm. Độ ổn định ở 5°C cao hơn so với 25°C.

Bảng 6: Độ ổn định ở gradient trehaloza 0%

Số hạt			Nhiệt độ (°C)	thời gian (giờ)	Hao hụt PXL khi lọc (%)	Tinh thể trên kính hiển vi
> 1µM	> 1µM	> 25µM				
PD-L-09111	30	0	5	24	<5	Không
PD-L-09111	30	0	5	24	8	Có
PD-L-09111	30	0	5	48	8	Có
PD-L-09111	30	0	5	48	19	Có
PD-L-09111	30	0	25	24	86	Có
PD-L-09111	30	0	25	24	86	Có
PD-L-09111	30	0	25	48	85	Có

Số hạt			Nhiệt độ (°C)	thời gian (giờ)	Hao hụt PXL khi lọc (%)	Tình thể trên kính hiển vi
> 1 μ M	> 1 μ M	> 25 μ M				
PD-L-09111	30	0	25	48	85	Có

Bảng 7: Độ ổn định ở gradien trehaloza 5%

Mẫu	C _{lipit} (mM)	ΔC_{tre} (% khối lượng)	Nhiệt độ (°C)	thời gian (giờ)	Hao hụt PXL khi lọc (%)	Tình thể trên kính hiển vi
PD-L-09119	25	5	5	24	<5	Không
PD-L-09119	25	5	5	24	<5	Không
PD-L-09119	25	5	5	48	<5	Không
PD-L-09119	25	5	5	48	<5	Không
PD-L-09119	25	5	25	24	29	Có
PD-L-09119	25	5	25	24	44	Có
PD-L-09119	25	5	25	48	70	Có
PD-L-09119	25	5	25	48	69	Có

Bảng 8: Độ ổn định ở gradien trehaloza 8,6%

Mẫu	C _{lipit} (mM)	ΔC_{tre} (% khối lượng)	Nhiệt độ (°C)	thời gian (giờ)	Hao hụt PXL khi lọc (%)	Tình thể trên kính hiển vi
PD-L-09116	21,4	8,6	5	24	<5	Không
PD-L-09116	21,4	8,6	5	24	<5	Không
PD-L-09116	21,4	8,6	5	48	<5	Không
PD-L-09116	21,4	8,6	5	48	<5	Không
PD-L-09116	21,4	8,6	40	24	<5	Không
PD-L-09116	21,4	8,6	40	24	<5	Không
PD-L-09116	21,4	8,6	40	48	<5	Có
PD-L-09116	21,4	8,6	40	48	<5	Có

Bảng 9: Độ ổn định ở gradien trehaloza 11,2%

Mẫu	C _{lipit} (mM)	ΔC_{tre} (% khối lượng)	Nhiệt độ (°C)	thời gian (giờ)	Hao hụt PXL khi lọc (%)	Tinh thể trên kính hiển vi
PD-L-09113	18,8	11,2	5	24	<5	Không
PD-L-09113	18,8	11,2	5	24	<5	Không
PD-L-09113	18,8	11,2	5	48	<5	Không
PD-L-09113	18,8	11,2	5	48	<5	Không
PD-L-09113	18,8	11,2	40	24	<5	Không
PD-L-09113	18,8	11,2	40	24	<5	Không
PD-L-09113	18,8	11,2	40	48	<5	Không
PD-L-09113	18,8	11,2	40	48	<5	Không

Bảng 10: Độ ổn định ở gradien trehaloza 13,3%

Mẫu	C _{lipit} (mM)	ΔC_{tre} (% khối lượng)	Nhiệt độ (°C)	thời gian (giờ)	Hao hụt PXL khi lọc (%)	Tinh thể trên kính hiển vi
PD-L-09115	16,7	13,3	5	24	<5	Không
PD-L-09115	16,7	13,3	5	24	<5	Không
PD-L-09115	16,7	13,3	5	48	<5	Không
PD-L-09115	16,7	13,3	5	48	<5	Không
PD-L-09115	16,7	13,3	40	24	<5	Không
PD-L-09115	16,7	13,3	40	24	<5	Không
PD-L-09115	16,7	13,3	40	48	<5	Không
PD-L-09115	16,7	13,3	40	48	<5	Không

Bảng 11: Độ ổn định ở gradien trehaloza 13,3%

Mẫu	C _{lipit} (mM)	ΔC_{tre} (% khối lượng)	Nhiệt độ (°C)	thời gian (giờ)	Hao hụt PXL khi lọc (%)	Tinh thể trên kính hiển vi
-----	----------------------------	------------------------------------	------------------	--------------------	----------------------------	-------------------------------

Mẫu	C _{lipit} (mM)	ΔC_{tre} (% khối lượng)	Nhiệt độ (°C)	thời gian (giờ)	Hao hụt PXL khi lọc (%)	Tính thể trên kính hiển vi
PD-L-09115	16,7	13,3	5	24	<5	Không
PD-L-09115	16,7	13,3	5	24	<5	Không
PD-L-09115	16,7	13,3	5	48	<5	Không
PD-L-09115	16,7	13,3	5	48	<5	Không
PD-L-09115	16,7	13,3	40	24	<5	Không
PD-L-09115	16,7	13,3	40	24	<5	Không
PD-L-09115	16,7	13,3	40	48	<5	Không
PD-L-09115	16,7	13,3	40	48	<5	Không

Bảng 12: Độ ổn định ở gradien trehaloza 15%

Mẫu	C _{lipit} (mM)	ΔC_{tre} (% khối lượng)	Nhiệt độ (°C)	thời gian (giờ)	Hao hụt PXL khi lọc (%)	Tính thể trên kính hiển vi
PD-L-09112	15	15	5	24	<5	Không
PD-L-09112	15	15	5	24	<5	Không
PD-L-09112	15	15	5	48	<5	Không
PD-L-09112	15	15	5	48	<5	Không
PD-L-09112	15	15	40	24	<5	Không
PD-L-09112	15	15	40	24	<5	Không
PD-L-09112	15	15	40	48	<5	Không
PD-L-09112	15	15	40	48	<5	Không

6. Độ ổn định của liposom đã nạp paclitaxel và đã được sấy phun

6.1 Phương pháp và nguyên liệu

Nguyên liệu được sử dụng như đã mô tả trong các ví dụ trước.

Liposom chứa DOTAP, DOPC và paclitaxel (tỷ lệ phân tử gam 50/47/3) được tạo ra theo kỹ thuật phun etanol đã nêu. Paclitaxel được hòa tan với lipit trong dung

dịch etanol. Liposom ở nồng độ 20mM lipid trong 20% khối lượng trehaloza (mẻ PD-L-09031) và 10mM lipid trong 10% trehaloza (các mẻ MDG09,108-08-001 và PD-L-09032) được điều chế. Liposom được ép đùn 5 lần qua màng polycarbonat với cỡ lỗ 200nm và được lọc tiệt trùng như nêu trên.

Sau khi điều chế huyền phù liposom, liposom này được loại nước. Các mẻ PD-L-09031 và PD-L-09031 được sấy phun trong thiết bị sấy phun Niro SD-Micro với các thông số sấy phun như đã được mô tả trong ví dụ 2.

Mẻ MDG09.108-08-001 được loại nước bằng cách sấy đông, bằng cách sử dụng thiết bị sấy đông Epsilon 2-12D (Christ). Huyền phù liposom được giữ ở 4°C trong 1 giờ và được làm đông lạnh ở -40°C trong khoảng 5 giờ. Sau khi làm đông lạnh, nhiệt độ được nâng lên đến -16°C và bước sấy sơ bộ được thực hiện ở áp suất 0,1 bar trong 90 giờ. Ở bước sấy thứ hai, nhiệt độ tăng đến 20°C, trong khi áp suất giảm đến 0,01 bar.

Bột khô được hoàn nguyên bằng nước đến nồng độ lipid 10mM trong 10,5% (khối lượng) trehaloza. Sản phẩm liposom lỏng thu được được kiểm tra một giờ sau khi hoàn nguyên và 24 giờ sau khi hoàn nguyên theo phương pháp tán xạ ánh sáng động lực học bằng cách sử dụng thiết bị Malvern Zetasizer 1000HSA, Series DTS5101 (Cài đặt: Phân tích = phương thức mono, Giãn nở = 1,2; Trình tự phù hợp = 3; Điểm lựa chọn đầu tiên = 18; Điểm lựa chọn cuối cùng = Đến số 22; Điểm trọng số = bậc hai; hệ số suy giảm = x16; độ nhớt 1.200cp; Chiết suất = 1348; Số lần đo = 3; Độ trễ giữa các lần đo = 0; Khoảng thời gian đo = Tự động) để xác định $Z_{\text{trung bình}}$ và PI. Trước khi đo, các mẫu được pha loãng mười lần bằng dung dịch trehaloza đã loại nước 10,5% (khối lượng).

6.2 Kết quả

Kết quả được thể hiện trong bảng 13.

Các phát hiện đối với chế phẩm đã được sấy phun ở cùng nồng độ lipid và trehaloza như ở sản phẩm đã được hydrat hóa khác đáng kể so với kết quả ở sản phẩm đã được sấy phun từ nguyên liệu lỏng được cô đặc gấp đôi và gradien trehaloza được

tạo ra nhờ hydrat hóa lại. Chế phẩm không có gradient nồng độ thể hiện các trị số $Z_{\text{trung bình}}$ và PI cao hơn đáng kể và tăng lên trong vòng 24 giờ sau khi hoàn nguyên, trong khi chế phẩm có gradient nồng độ không thể hiện sự gia tăng này. Sự gia tăng $Z_{\text{trung bình}}$ và PI được xem là có liên quan đến việc giải phóng paclitaxel ra khỏi chế phẩm không có gradient nồng độ, kém ổn định hơn. Dữ liệu này phù hợp với kết quả ở ví dụ 2, trong đó paclitaxel có thể được nạp nhiều hơn vào liposom thu được sau khi sấy phun ở nồng độ gấp đôi và sau đó tạo ra gradient trehaloza. Việc sấy phun chế phẩm liposom chứa paclitaxel ở nồng độ trehaloza cao hơn và tiếp theo tạo ra gradient trehaloza giúp cải thiện độ ổn định của chế phẩm sau khi hoàn nguyên.

So sánh với các mẫu đã sấy phun, chế phẩm đã được sấy ở nhiệt độ thấp có PI cao hơn nhiều ngay cả sau khi hoàn nguyên.

Bảng 13: So sánh các phương pháp loại nước và hydrat hóa lại

Mẫu	$\Delta c_{\text{trehaloza}}$	1 giờ		24 giờ	
		$Z_{\text{trung bình}}$ (nm)	PI	$Z_{\text{trung bình}}$ (nm)	PI
MDG09.108-08-001	0%	170,3	0,480	175,4	0,493
PD-L-09032	0%	167	0,331	260	0,65
PD-L-09031	10 %	160,8	0,203	160,5	0,199

7. Sản xuất ở quy mô lớn và sấy phun

7.1 Nguyên liệu

7.1.1 Nguyên liệu cơ bản

- USP Paclitaxel bán tổng hợp API, Phytion Biotech, lô CP209N0014
- DOTAP-CI, Merck Eprova AG, lô MBA-020
- DOPC, Avanti Polar Lipids Inc., lô GN181PC-12
- α, α -Trehaloza dihydrat có độ tinh khiết cao (Low Endotoxine), Ferro Pfanstiehl, lô 33205A
- Etanol tuyệt đối EP, Nova Laboratories Art.-Nr. A4478B
- Axit xitric monohydrat EP/USP, Nova Laboratories Art.-Nr. V290
- Nước dùng để phun, Nova Laboratories Art.-Nr. A15210C

7.1.2 Thiết bị

- Mao quản phun ID: 2 mm
- Hộp lọc Memtrex PC 0,22µm do GE cung cấp, sản phẩm số MPC92O5FHV, lô 60240937
- Thiết bị lọc vô trùng Opticap XL4 với màng lọc Durapore 0,22µm do Millipore cung cấp, sản phẩm số KVGLAO4TT3 lô: COCA1 0972
- Bình điều chế (Nova Laboratories Ltd.)
- Bình ép đùn (Nova Laboratories Ltd.)
- Bình khử Bioburden (Nova Laboratories Ltd.)
- Bình trộn gian (Nova Laboratories Ltd.)
- Bơm nhu động (Nova Laboratories Ltd.)
- Bình chịu áp dung tích 20 lit với ống đo áp (Nova Laboratories Ltd.)
- Lỗ thông hơi dạng bướm (Nova Laboratories Ltd.)
- Thiết bị sấy phun vô khuẩn ASD-1 (GEA Niro S/A, Copenhagen Denmark)

7.2 Phương pháp

7.2.1 Sản xuất chế phẩm lỏng

7.2.1.1 Điều chế dung dịch hữu cơ

Đối với mẻ 001, 349,3g DOTAP-CL được hoà tan trong 700g etanol tuyệt đối và được khuấy trong khoảng 4 giờ. 369,5g DOPC được hoà tan trong 700g etanol tuyệt đối và được khuấy trong khoảng 3 giờ. Sau đó, hai dung dịch lipid này được kết hợp và được bổ sung vào 25,617g paclitaxel. Dung dịch hữu cơ thu được được khuấy trong khoảng 2 giờ và cuối cùng được điều chỉnh đến tổng khối lượng là 2122,5g bằng cách bổ sung etanol tuyệt đối vào. Các mẻ 002 đến 004 cũng được điều chế như vậy.

7.2.1.2 Điều chế dung dịch nước

Đối với mẻ 001, 10819g trehaloza đã loại nước được bổ sung vào khoảng 20kg nước dùng để phun trong bình điều chế và được khuấy với tốc độ 700 vòng/phút trong 90 phút. Tiếp theo, 1,258g axit xitric monohydrat được bổ sung vào và được khuấy cho đến khi hòa tan hoàn toàn. Thể tích cuối của dung dịch nước được điều chỉnh đến

34,53kg và khuấy thêm 10 phút nữa. Các mẻ 002 đến 004 cũng được điều chế như vậy.

7.2.1.3 Phun etanol

Đối với mẻ 001, dung dịch hữu cơ được phun vào dung dịch nước nhờ bơm nhu động với tốc độ phun khoảng 250g/phút. Trong quá trình phun, dung dịch này được khuấy với tốc độ khoảng 500 vòng/phút. Sau khi phun xong, dung dịch này được khuấy trong 2 phút với tốc độ 600 vòng/phút và tiếp theo khuấy trong 1 phút với tốc độ 700 vòng/phút. Trong suốt quá trình phun, nhiệt độ được giữ dưới 8°C. Các mẻ 002 đến 004 được khuấy với tốc độ 550 vòng/phút trong suốt quá trình phun mà không cần khuấy thêm sau đó.

7.2.1.4 Ép dùn

Thực hiện 8 lần ép dùn trong hộp lọc loại 5" (12,70cm) với màng polycacbonat có cỡ lỗ 0,2µm. Hộp lọc được thông hơi với áp suất nằm trong khoảng từ 0,4bar đến 0,5bar mỗi lần, và thực hiện ép dùn với áp suất 3,0 bar. Nhiệt độ được giữ dưới 8°C.

7.2.1.5 Pha loãng

Sau lần ép dùn thứ 8, khối lượng của chế phẩm được xác định. Dựa trên tỷ trọng của chế phẩm là 1,106g/ml, tính được lượng nước cần thiết để thu được 20mM chế phẩm (trên cơ sở tổng nồng độ lipid), tương ứng với việc pha loãng theo tỷ lệ 1:1,5. Đối với mẻ 001, lượng nước cần thiết để phun được bổ sung vào với tốc độ 1,66l/phút bằng bơm nhu động qua mao quản có đường kính trong 2mm, đồng thời dung dịch được khuấy với tốc độ khoảng 500 vòng/phút. Lượng nước dùng để phun bổ sung vào được làm lạnh đến dưới 8°C trước khi bổ sung vào chế phẩm. Đối với các mẻ 002 đến 004, bước pha loãng được thực hiện ở tốc độ nằm trong khoảng từ 0,62l/phút đến 0,83l/phút với tốc độ khuấy khoảng 600 vòng/phút.

7.2.1.6 Giảm nhiễm vi sinh

Trước khi giảm nhiễm vi sinh (lọc tiệt trùng lần thứ nhất), thiết bị lọc OpticapXL4 được rửa bằng 20l nước dùng để phun ở áp suất khoảng 0,5 bar. Việc nạp liệu và thông hơi thiết bị lọc được thực hiện nhờ trọng lực. Quá trình lọc được thực

hiện ở áp suất 2,5 bar, nhờ đó áp suất được nén vào kịp thời. Nhiệt độ của chế phẩm được giữ dưới 8°C.

7.2.1.7 Lọc tiệt trùng

Trước khi lọc tiệt trùng, thiết bị lọc OpticapXL4 được rửa bằng 20l nước dùng để phun ở áp suất khoảng 0,5 bar. Thực hiện việc thông khí cho thiết bị lọc ở 0,5 bar. Bước lọc được thực hiện ở áp suất 2,5 bar, nhờ đó áp suất được nén vào kịp thời. Nhiệt độ của chế phẩm được giữ dưới 8°C.

7.2.2 Sấy phun

Chế phẩm liposom được sấy phun trong thiết bị sấy phun vô khuẩn ASD-1 (GEA Niro S/A, Copenhagen Denmark). Mẻ 001 được sấy khô ở dạng mẻ đơn (Hành trình 1), trong khi các mẻ 002 đến 004 được sấy liên tiếp theo phương thức liên tục (Hành trình 2). Để sấy phun, sử dụng hai vòi cho chất lỏng, nitơ làm khí sấy, và các thông số sau:

Bảng 14: cài đặt chế độ sấy phun

Thông số	Điểm cài đặt
Tốc độ khí sấy	80kg/giờ
Áp suất khí phun	3 bar
Tốc độ khí phun	3kg/giờ
Nhiệt độ đầu ra	95°C
Tốc độ nạp liệu	2l/giờ
Nhiệt độ nạp liệu	0°C – 30°C

7.3 Độ ổn định của liposom

7.3.1 Phương pháp

Chế phẩm liposom đã loại nước từ Hành trình 1 được hydrat hóa lại trong nước để phun đến tổng nồng độ lipid 10mM, do vậy các điều kiện hoàn nguyên làm tăng hơn nữa gradien thẩm thấu của chế phẩm, gradien này là 20mM trước khi loại nước. Để so sánh, chế phẩm liposom tương ứng (Mẻ so sánh) được điều chế mà không pha loãng và

được loại nước bằng cách sấy đông (như nêu trong WO 2004/002468 chẳng hạn). Lượng paclitaxel (kể cả sản phẩm phân giải của paclitaxel) còn sót lại trong liposom được xác định theo phương pháp được mô tả trong ví dụ 1.3 sau khi hoàn nguyên liposom và sau 24 giờ ở 25°C. Tỷ lệ phần trăm của paclitaxel còn lại và có thể lọc được (dạng tinh thể) được tính dựa trên tổng lượng paclitaxel có mặt trong các chế phẩm.

7.3.2 Kết quả

Bảng 15: Giải phóng paclitaxel ra khỏi sản phẩm

Điều chế	T0		Sau 24 giờ ở 25°C	
Thời gian	Paclitaxel còn lại trong liposom [%]	Paclitaxel có thể được lọc [%]	Paclitaxel còn lại trong liposom [%]	Paclitaxel có thể lọc được [%]
Hành trình 1	99,56	0,44	99,89	0,11
	99,93	0,07	100,09	-0,09
	99,67	0,33	99,87	0,13
Mê so sánh	99,63	0,37	98,88	1,12
	99,48	0,52	98,68	1,32
	99,72	0,28	99,16	0,84

Dữ liệu cho thấy rằng các chế phẩm liposom điều chế được khi vắng mặt gradien thẩm thấu sẽ giải phóng paclitaxel nhanh hơn. Điều này có thể được quan sát dễ dàng sau một khoảng thời gian tương đối ngắn là 24 giờ.

7.4. Phân tích cỡ hạt và chỉ số đa phân tán

7.4.1. Phương pháp

Cỡ hạt ($z_{\text{trung bình}}$) và chỉ số đa phân tán (PI) được xác định theo phương pháp PCS (nhiều xạ 173°) bằng cách sử dụng Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Một cách vắn tắt, mẫu từ Hành trình 1 (tương ứng với mê 1) và Hành trình 2 (tương ứng với các mê 2 đến 4) và mẫu từ mê so sánh (xem ở trên) được tái tạo huyền phù trong nước đến tổng nồng độ lipit là 10mM. Để xác định, các mẫu được pha loãng mười lần bằng dung dịch trehaloza 10,5% đã loại nước (khối lượng). Các mẫu được bảo quản trong 24 giờ và 25°C và được đo lại.

Chế độ cài đặt sau được áp dụng để đo và phân tích dữ liệu: Kiểu đo = Kích cỡ; Mẫu: Nguyên liệu = Polystyren latex, RI: 1,590; Độ hấp thụ: 0,01; chất phân tán = 10,5% Trehaloza, Nhiệt độ: 25°C, độ nhớt 1.200 cP RI: 1,342; Tùy chọn chung = các thông số Mark-Houwink; Nhiệt độ = 25°C, Thời gian cân bằng: 5 phút; Tế bào = cuvet định cỡ loại dùng một lần DTS0012; Đo: Số lần hành trình = 15; Khoảng thời gian của hành trình (giây) = 100; Số lần đo = 3; Khoảng thời gian trễ giữa các lần đo; Tiến triển = Vị trí cố định ở vị trí 4,65, Hệ số suy giảm 6; Các thông số phân tích: Phương thức phân tích = Chung; Phân tích nửa bất biến: Trình tự phù hợp = 3; Sơ đồ trọng lượng = bậc hai; Lựa chọn điểm nửa bất biến: điểm tự động thứ nhất = Có; Phương pháp lựa chọn điểm cuối = cắt; Phân đoạn tín hiệu = 0,1; Giãn nở = 1,2; Khoảng biểu hiện: Giới hạn dưới = 0,6; Giới hạn trên = 10000; Lọc: hệ số lọc = 75; Phân tích đa phương thức: Kết quả biến nạp = Mie; Sử dụng kết quả biến nạp = Có; Sơ đồ trọng lượng = bậc hai; Độ phân giải = bình thường; Lựa chọn điểm đa phương thức; điểm tự động thứ nhất = Có; Phương pháp lựa chọn điểm cuối = cắt, Phân đoạn tín hiệu = 0,01; Giãn nở = 1,2; Phân loại cỡ: Số loại cỡ = 70; Giới hạn dưới = 0,4; Giới hạn trên = 10000; Ngưỡng: ngưỡng thấp hơn = 0,05; Ngưỡng cao hơn = 0,01; hệ số lọc = mặc định.

7.4.2 Kết quả

Kết quả được thể hiện trong bảng 16:

Mẫu		$Z_{\text{trung bình}}$ (nm)	PI
Mê so sánh		133	0,337
Hành trình 1	Mê 1	143	0,16
Hành trình 2	Mê 2	138	0,15
	Mê 3	143	0,17
	Mê 4	144	0,19

Chế phẩm được tạo ra với gradien thẩm thấu và được loại nước bằng cách sấy phun (hành trình 1 & hành trình 2) có $Z_{\text{trung bình}}$ tương tự nhau nhưng trị số PI thấp hơn đáng kể so với mẫu so sánh được tạo ra mà không có gradien thẩm thấu và được loại nước bằng cách sấy đông. Vì vậy, sản phẩm được tạo ra theo quy trình nêu trên đồng nhất hơn sản phẩm được tạo ra theo quy trình thông thường.

7.5 Xác định đặc tính bằng cách siêu ly tâm

7.5.1 Phương pháp

Phân tích siêu ly tâm được thực hiện trên thiết bị Nanolytics (Potsdam, Đức).

Mỗi mẫu được hoàn nguyên trong H₂O và hỗn hợp H₂O: D₂O theo tỷ lệ 1:1 đến nồng độ lipit 10mM và được làm cân bằng trong một giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các mẫu này được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 bằng dung môi tương ứng. Sau một giờ cân bằng nữa, các mẫu được đưa vào bước siêu ly tâm. 400μl thể phân tán liposom tương ứng được đưa vào cuvet siêu ly tâm bằng titan với đường quang là 12mm. Các mẫu này được ly tâm trong thiết bị phân tích siêu ly tâm Optima XL-I (do Beckmann-Coulter, Palo Alto cung cấp) sử dụng rôto 8 vị trí An50Ti (do Beckmann-Coulter, Palo Alto cung cấp) có lắp bộ phận gây nhiễu quang Rayleigh với vận tốc 20000 vòng/phút và ở 25°C. Trong quá trình ly tâm, profin nồng độ theo phương hướng kính là do gradien khúc xạ trong dung dịch. Các mẫu được xác định lặp lại hai lần.

7.5.2 Phân tích dữ liệu

7.5.2.1 Định nghĩa hệ số lắng

Dấu hiệu ban đầu trong siêu ly tâm phân tích là hệ số lắng được định nghĩa như sau:

$$\frac{m(1 - \bar{v} \rho)}{f} = \frac{u}{\omega^2 r} \equiv s \quad (1)$$

Trong đó u là vận tốc lắng của hạt, m là khối lượng của hạt, $\bar{v}$ là thể tích cụ thể, f là giới hạn ma sát và ρ là tỷ trọng của dung môi.

Xác định hệ số lắng

Hệ số lắng được tính trực tiếp từ dữ liệu đo được mà không cần phải giả định tiếp theo công thức:

$$\ln \frac{r}{r_m} = s \int \omega^2 dt \quad (2)$$

Trong đó r là khoảng cách đến trục quay, và r_m là mặt khum của chất lỏng. Tích phân thời gian thực hiện $\int \omega^2 dt$ được xác định bằng thiết bị đo lường.

7.5.2.3 Phân bố hệ số lắng

Thay cho hệ số lắng duy nhất ở một bán kính cụ thể, toàn bộ trục r có thể được chuyển hóa thành trục s . Sự thay đổi vận ở vị trí tương ứng tỷ lệ với nồng độ khối lượng của các loại hạt có mặt, sao cho biên độ đo có thể coi như là tọa độ y . Tuy nhiên, cần phải hiệu chỉnh tọa độ y theo mức pha loãng theo phương hướng kính. Bằng cách tính đến giới hạn hiệu chỉnh, thu được hàm số $g(s)$ sau đây, cho nồng độ khối của các loại hạt lắng với vận tốc s :

$$g(s) = \frac{1}{c_0} \frac{dc}{dr} \left(\frac{r}{r_m} \right)^2 r \int \omega^2 dt \quad (3)$$

Nồng độ c , tương ứng c_0 được đưa ra khi rời chuyển vận đơn vị, trong đó vận là một pha đầy đủ, do vậy là một vạch sáng và tối của phổ nhiễu xạ. Kích cỡ tỷ lệ thuận với nồng độ được tính theo g/l trong trường hợp gia tăng chiết suất có thể được giả thiết là bằng nhau đối với tất cả các loại hạt, đây là trường hợp đối với các mẫu là các nguyên liệu hóa học đồng nhất đơn giản có mặt trong phân bố đa phân tán:

$$dc = d\phi \cdot \lambda \cdot \frac{1}{l \frac{dn}{dc}} \quad (4)$$

Trong đó ϕ là nồng độ trong đơn vị rời chuyển vận, λ là chiều dài bước sóng của tia laze, l là chiều rộng của cuvet, và $\frac{dn}{dc}$ là mức gia tăng chiết suất của chất hòa tan trong một dung môi nhất định. Do tính tỷ lệ thuận này, nồng độ trong phương trình (3) có thể được thể hiện trực tiếp ở dạng nồng độ khối lượng.

$g(s)$ (hoặc dạng đã lấy tích phân của nó $G(s)$) về nguyên tắc có thể tính được theo phép biến đổi tọa độ từng lần quét và tính tọa độ y theo phương trình (3); thu được kết

quả chung bằng cách lấy trung bình các lần quét chính, mà chủ yếu là thừa. Vì vậy, sẽ là hợp lý nếu thực hiện việc điều chỉnh toàn bộ dữ liệu ở tất cả các lần quét. Nhờ đó, các âm tạp không phụ thuộc vào thời gian và không gian được tách và các âm tạp thống kê khác được phân bố để thu được $g(s)$ tốt nhất từ toàn bộ dữ liệu đo. Phần mềm SedFit v12.4. do Peter Schuck cung cấp được sử dụng để điều chỉnh dữ liệu.

7.5.2.4 Giải thích phân bố hệ số lắng

Phân bố hệ số lắng ở dạng hàm $g(s)$ đã mang lại thông tin về sự phân bố này; thông thường mong muốn biến đổi thông số đo lường chính s thành đường kính hoặc khối lượng của hạt. Hệ số lắng có liên quan đến phân tử lượng theo phương trình SVEDBERG

$$M = \frac{s R T}{D (1 - \bar{v} \rho)} \quad (5)$$

thông qua hệ số sự khuếch tán. Đối với các đối tượng hình cầu, chẳng hạn như liposom theo sáng chế, hệ số khuếch tán có thể được thay bằng đường kính của hình cầu, do đó cần phải xem xét xem liệu liposom có được nạp nước - không góp phần vào sự lắng nhưng lại góp phần vào sự ma sát.

Nếu hệ số khuếch tán trong phương trình 5 được thay bằng phương trình STOKES-EINSTEIN

$$D = 6 \pi \eta R_h \quad (6)$$

và coi như đường kính $d=2R_h$ đối với hình cầu và phần thể tích nước là Φ ; thì phương trình SVEDBERG trở thành

$$d = \sqrt{\frac{18 \eta s}{(1 - \Phi)(\rho_s - \rho)}} \quad (7)$$

trong đó η là độ nhớt của dung môi và ρ_s là tỷ trọng của chất hòa tan.

Để chuyển hóa mức phân bố hệ số lắng thành phân bố kích cỡ, đòi hỏi rằng sự trương nở và tỷ trọng của liposom không thay đổi hoặc được đưa ra như là một phân

bổ phụ thuộc vào hệ số lắng. Do vậy, tỷ trọng này được xác định theo thực nghiệm.

7.5.2.5 Phân tích sự thay đổi tỷ trọng

Tỷ trọng của các hạt lắng có thể được xác định theo phương pháp siêu ly tâm phân tích trong hai dung môi có tỷ trọng khác nhau. Trong các dung môi có tỷ trọng thấp hơn, hạt thường có trị số s nhỏ hơn – hạt lắng chậm hơn, nếu khác biệt về tỷ trọng với dung môi xung quanh giảm. Cả hai trị số s , liên quan đến cùng một hạt, đưa vào phương trình (7) với các thông số cho dung môi tương ứng. Đối với hai dung môi (chỉ số 1 và chỉ số 2), phương trình sau đây được áp dụng:

$$\frac{\eta_1 s_1}{[\Phi \rho_1 + (1 - \Phi) \rho_s] - \rho_1} = \frac{\eta_2 s_2}{[\Phi \rho_2 + (1 - \Phi) \rho_s] - \rho_2} \quad (8)$$

Tỷ trọng khô của hạt ρ_s và thông số độ trương nở Φ ở cả hai vế của phương trình là giống nhau, do chúng đề cập đến cùng một đối tượng. Các hạt giống hệt nhau được định nghĩa là yếu tố của phân bố hệ số lắng với tọa độ y giống hệt $G(s)$.

Vì vậy, phương trình (8) có thể được sắp xếp lại và đơn giản hóa để thu được tỷ trọng khô:

$$\rho_s = \frac{\eta_1 s_1 \rho_2 - \eta_2 s_2 \rho_1}{s_1 \eta_1 - s_2 \eta_2} \quad (9)$$

Đường kính có thể thu được theo phương trình sau:

$$d = \sqrt{\frac{18 (\eta_1 s_1 - \eta_2 s_2)}{(1 - \Phi) \cdot (\rho_1 - \rho_2)}} \quad (10)$$

Để giải phương trình (10), cần phải có thông tin độc lập như đường kính của hạt, mà có thể được xác định theo thử nghiệm nhờ thử nghiệm tán xạ ánh sáng động lực học như nêu trên.

7.5.3 Kết quả

Bảng 17: Tỷ trọng khô của chế phẩm liposom

22325

Hành trình sản xuất	Mẫu	Tỷ trọng khô (g/ml)
Hành trình 1	Mẫu 1	1,183
Hành trình 2	Mẫu 1	1,174
	Mẫu 2	1,154
	Mẫu 3	1,223

Tài liệu tham khảo

- Antonietti, M. and S. Forster (2003). "Vesicles and liposomes: A self-assembly principle beyond lipids." *Advanced Materials* **15**(16): 1323-1333.
- Bangham A. D., Standish M. M., Watkins, J.C. (1965). "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids", *J. Mol. Biol.* **13**: 238-52.
- Cabral, E. C. et al. (2003). "Preparation and characterization of diacetylene polymerized liposomes for detection of autoantibodies." *J Liposome Res* **13**(3-4): 199-211.
- De Gier, J. (1993). "Osmotic behaviour and permeability properties of liposomes." *Chem Phys Lipids* **64**(1-3): 187-196.
- Ertel, A., A. G. Marangoni, et al. (1993). "Mechanical properties of vesicles. I. Coordinated analysis of osmotic swelling and lysis." *Biophysical Journal* **64**(2): 426-434.
- Evans, D.F. and Wennerström H. (1994). "The Colloidal Domain", VHC Publishers, Inc., New York, pp 48-49.
- Goormaghtigh, E. and G. A. Scarborough (1986). "Density-based separation of liposomes by glycerol gradient centrifugation." *Anal Biochem* **159**(1): 122-31.
- Gregoriadis G. (1995). "Engineering liposomes for drug delivery: Progress and problems". *Trends in biotechnology* **13** (12): 527-537.
- Hallett, F. R., J. Marsh, et al. (1993). "Mechanical properties of vesicles. II. A model for osmotic swelling and lysis." *Biophysical Journal* **64**(2): 435-442.
- Huang, C.H., Charlton, J.P. (1971) "Determination of partial specific volumes by sedimentation velocity method", *The Journal of Biological Chemistry*, **246**(8): 2555-2560.
- Koppel, D. E. (1972). "Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: the method of cumulants." *Journal of Chemical Physics* **57**(11): 4814-4820.
- New et al. (1990). *Liposomes. A Practical Approach*. Oxford University Press. Pages 33-104).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình điều chế chế phẩm liposom bao gồm các bước:

a) tạo ra chế phẩm liposom thứ nhất chứa huyền phù liposom trong pha nước, trong đó liposom này chứa ít nhất một màng, trong đó màng này bao ngoài thể tích pha nước được bao nang trong liposom và pha nước này bao gồm ít nhất một chất có hoạt tính thẩm thấu và có nồng độ thẩm thấu toàn phần ban đầu là O_1 , trong đó chế phẩm liposom thứ nhất bao gồm ít nhất một taxan trong màng liposom,

b) sau đó tạo ra gradien nồng độ thẩm thấu trong pha nước của chế phẩm nêu trên, trong đó nồng độ thẩm thấu của pha nước bên ngoài thể tích được bao nang trong liposom, $O_{ngoài}$, thấp hơn nồng độ thẩm thấu của pha nước bên trong thể tích được bao nang trong liposom, O_{trong} , để tạo ra chế phẩm liposom thứ hai, và trong đó ít nhất một taxan được kết hợp vào màng liposom của chế phẩm liposom thứ hai,

trong đó, chế phẩm liposom này là chế phẩm liposom cation.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này còn bao gồm bước loại nước chế phẩm liposom thứ hai để thu được chế phẩm được loại nước.

3. Quy trình theo điểm 2, trong đó quy trình này còn bao gồm bước hydrat hóa lại chế phẩm đã được loại nước.

4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó bước b) được thực hiện bằng cách làm giảm nồng độ thẩm thấu toàn phần ban đầu O_1 của pha nước của chế phẩm liposom ở bước a) để tạo ra chế phẩm liposom đã được tạo ứng suất có nồng độ thẩm thấu toàn phần O_2 , thấp hơn nồng độ thẩm thấu O_1 .

5. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó bước b) được thực hiện bằng cách pha loãng chế phẩm liposom ở bước a) bằng môi trường nước có nồng độ thẩm thấu thấp hơn O_1 .

6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó bước b) được thực hiện bằng cách thẩm tách chế phẩm ở bước a) vào lại môi trường nước có nồng độ

thẩm thấu thấp hơn O_1 .

7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó bước b) được thực hiện bằng cách:

b1) loại nước chế phẩm liposom ở bước a) để thu được chế phẩm liposom đã được loại nước, và

b2) hydrat hóa lại chế phẩm liposom đã được loại nước trong các điều kiện để thu được chế phẩm liposom được tạo ứng suất.

8. Quy trình theo điểm 7, trong đó bước hydrat hóa lại được thực hiện trong môi trường nước.

9. Quy trình theo điểm 7 hoặc 8, trong đó thể tích của môi trường nước được dùng để hydrat hóa lại lớn hơn thể tích của chế phẩm liposom đã được loại nước để thu được lượng tương ứng chế phẩm liposom đã được loại nước.

10. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 9, trong đó O_2 nhỏ hơn O_1 ít nhất là 10mOsm.

11. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 9, trong đó O_2 nhỏ hơn O_1 ít nhất là 50mOsm.

12. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 9, trong đó O_2 nhỏ hơn O_1 ít nhất là 100 mOsm.

13. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó gradien thẩm thấu giữa pha nước bên ngoài thể tích được bao nang trong liposom và pha nước bên trong thể tích được bao nang trong liposom được biến đổi một hoặc vài lần ở các giai đoạn khác nhau trong suốt quy trình sản xuất chế phẩm liposom.

14. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó bước loại nước được thực hiện ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ trong phòng.

15. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó bước loại nước được thực hiện bằng cách sấy phun.

16. Quy trình sản xuất chế phẩm liposom chứa ít nhất một taxan, quy trình này gồm các bước:

i) tạo ra chế phẩm liposom được tạo ứng suất, và

ii) ủ chế phẩm liposom được tạo ứng suất này với ít nhất một taxan, bằng cách đó thu được chế phẩm liposom được tạo ứng suất với ít nhất một taxan được kết hợp vào màng liposom này,

trong đó, nồng độ thẩm thấu của pha nước bên ngoài thể tích được bao nang trong liposom $O_{ngoài}$ thấp hơn nồng độ thẩm thấu của pha nước bên trong thể tích được bao nang trong liposom O_{trong} ,

trong đó, chế phẩm liposom này là chế phẩm liposom cation.

17. Quy trình theo điểm 16, trong đó quy trình này còn bao gồm bước tách hợp chất không hòa tan ra khỏi chế phẩm liposom.

18. Quy trình theo điểm 16, trong đó quy trình này còn bao gồm bước tách hợp chất không hòa tan ra khỏi chế phẩm liposom bằng cách lọc hoặc ly tâm.

19. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm 16 đến 18, trong đó bước ii) được thực hiện với taxan ở dạng không được hòa tan

20. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 16 đến 19, trong đó bước i) được thực hiện bằng cách tạo ra chế phẩm liposom, trong đó ít nhất một chất có hoạt tính thẩm thấu chứa trong pha nước của chế phẩm và trong đó pha nước có nồng độ thẩm thấu ở bên trong thể tích được bao nang trong liposom cao hơn so với nồng độ thẩm thấu ở bên ngoài thể tích được bao nang trong liposom.

21. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 20, trong đó ít nhất một chất có hoạt tính thẩm thấu có mặt ở bên trong và bên ngoài liposom.

22. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21, trong đó chất có hoạt tính thẩm thấu được chọn từ nhóm bao gồm sacarit, rượu đường, axit amin, peptit, protein, polyme tan trong nước, muối hữu cơ hoặc vô cơ, ion và hỗn hợp của chúng.

23. Quy trình theo điểm 22, trong đó sacarit được chọn từ monosacarit, đisacarit, oligosacarit hoặc polysacari.

24. Quy trình theo điểm 23, trong đó sacarit là trehaloza.

25. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 24, trong đó taxan là paclitaxel.

26. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 25, trong đó taxan chỉ có mặt trong ngăn màng của liposom.

27. Chế phẩm liposom chứa huyền phù liposom trong pha nước, trong đó liposom này gồm ít nhất một màng, trong đó ít nhất một taxan có mặt trong màng liposom này và ít nhất một chất có hoạt tính thẩm thấu có mặt trong pha nước, trong đó nồng độ thẩm thấu của pha nước bên trong liposom, O_{trong} , lớn hơn nồng độ thẩm thấu của pha nước bên ngoài liposom, $O_{\text{ngoài}}$.

28. Chế phẩm liposom theo điểm 27, trong đó chênh lệch giữa O_{trong} và $O_{\text{ngoài}}$ ít nhất là 10mOsm.

29. Chế phẩm liposom theo điểm 27, trong đó chênh lệch giữa O_{trong} và $O_{\text{ngoài}}$ ít nhất là 50mOsm và lên tới 2000mOsm.

30. Chế phẩm liposom chứa huyền phù liposom trong pha nước, trong đó liposom gồm ít nhất một màng, trong đó ít nhất một taxan có mặt trong màng liposom và ít nhất một chất có hoạt tính thẩm thấu có mặt trong pha nước, trong đó pha nước bên trong thể tích được bao nang trong liposom có tỷ trọng cao hơn pha nước bên ngoài thể tích được bao nang trong liposom,

trong đó chế phẩm liposom này là chế phẩm liposom cation.

31. Chế phẩm liposom chứa huyền phù liposom trong pha nước, trong đó liposom này gồm ít nhất một màng, trong đó ít nhất một taxan có mặt trong màng liposom và ít nhất một chất có hoạt tính thẩm thấu có mặt trong pha nước, trong đó màng liposom này chịu ứng suất kéo,

trong đó, chế phẩm liposom này là chế phẩm liposom cation.

32. Chế phẩm liposom theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 27 đến 31, trong đó chất có hoạt tính thẩm thấu được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm 22 đến 24.

33. Chế phẩm liposom theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 27 đến 32, trong đó taxan là paclitaxel.

34. Chế phẩm liposom chứa taxan và huyền phù liposom trong dung dịch nước, thu được bằng cách hydrat hóa lại chế phẩm liposom đã được loại nước, đặc trưng ở chỗ sự thay đổi đường kính trung bình ($Z_{\text{trung bình}}$) với hệ số không lớn hơn 1,5, và sự thay đổi chỉ số đa phân tán (PI) với hệ số không lớn hơn 2 so với chế phẩm liposom được đưa vào quy trình loại nước để thu được chế phẩm liposom được loại nước,

trong đó, nồng độ thẩm thấu của pha nước bên ngoài thể tích được bao nang trong liposom, $O_{\text{ngoài}}$ thấp hơn nồng độ thẩm thấu của pha nước bên trong thể tích được bao nang trong liposom O_{trong} ,

trong đó, chế phẩm liposom này là chế phẩm liposom cation.

35. Chế phẩm liposom theo điểm 34, trong đó PI tại thời điểm 1 giờ sau khi hoàn nguyên nhỏ hơn 0,4, nhỏ hơn 0,3 hoặc nhỏ hơn 0,25.

36. Chế phẩm liposom chứa taxan và huyền phù liposom trong pha nước, thu được bằng cách hydrat hóa lại chế phẩm liposom đã được loại nước, đặc trưng ở chỗ sự thay đổi đường kính trung bình ($Z_{\text{trung bình}}$) với hệ số không lớn hơn 1,5, hoặc không lớn hơn 1,25 và sự thay đổi chỉ số đa phân tán (PI) với hệ số không lớn hơn 2, không lớn hơn 1,5 hoặc không lớn hơn 1,25 trong 24 giờ ở nhiệt độ 25°C,

trong đó, nồng độ thẩm thấu của pha nước bên ngoài thể tích được bao nang trong liposom, $O_{\text{ngoài}}$ thấp hơn nồng độ thẩm thấu của pha nước bên trong thể tích được bao nang trong liposom O_{trong} ,

trong đó, chế phẩm liposom này là chế phẩm liposom cation.

37. Chế phẩm liposom theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 34 đến 36, trong đó

liposom chứa paclitaxel với lượng lên tới khoảng 5%mol, hoặc lên tới 3%mol trong màng liposom.

38. Chế phẩm liposom theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 34 đến 37, trong đó liposom chứa DOTAP, DOPC và paclitaxel.

39. Chế phẩm liposom theo điểm 38, trong đó liposom chứa DOTAP, DOPC và paclitaxel với tỷ lệ mol là 50:47:3

40. Huyền phù liposom chứa liposom bao gồm DOTAP, DOPC, và paclitaxel ở nồng độ lipid tổng bằng 10mM, và trehaloza, được tạo huyền phù trong pha nước chứa 10mg/ml, hoặc 9,79mg/ml trehaloza, trong đó liposom này được đặc trưng bởi tỷ trọng khô ít nhất bằng 1,1g/ml,

trong đó, nồng độ thẩm thấu của pha nước bên ngoài thể tích được bao nang trong liposom, $O_{\text{ngoài}}$ thấp hơn nồng độ thẩm thấu của pha nước bên trong thể tích được bao nang trong liposom O_{trong} ,

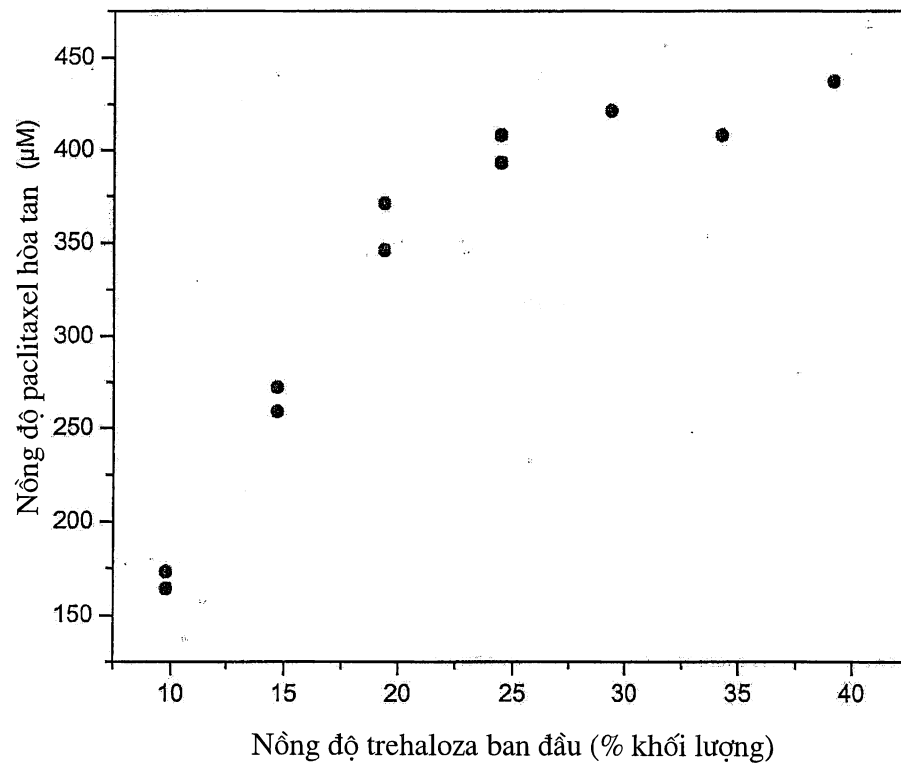
trong đó, chế phẩm liposom này là chế phẩm liposom cation.

41. Huyền phù liposom theo điểm 40, trong đó DOTAP, DOPC, và paclitaxel được chứa với tỷ lệ mol là 50:47:3.

42. Huyền phù liposom theo điểm 40 hoặc 41, trong đó huyền phù liposom này bao gồm axit xitric.

43. Huyền phù liposom theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 40 đến 42, trong đó liposom này có $Z_{\text{trung bình}}$ bằng 140nm.

Hình 1



Hình 2