



(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)



1-0025050

(51)⁷ A61K 9/14; A61K 31/4709; A61K 47/24; A61K 47/38; A61K 47/40; B82Y 5/00; A61L 29/00; A61L 31/00; A61P 9/10; B82Y 40/00; A61K 31/405; A61K 9/10 (13) B

(21) 1-2016-00608

(22) 07/08/2014

(86) PCT/JP2014/070841 07/08/2014

(87) WO2015/020139A1 12/02/2015

(30) 2013-163895 07/08/2013 JP

(45) 25/08/2020 389

(43) 25/05/2016 338A

(73) 1. KINKI UNIVERSITY (JP)

4-1, Kowakae 3-chome, Higashiosaka-shi, Osaka 577-8502, Japan

2. Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. (JP)

9, Kanda Tsukasa-machi 2-chome, Chiyoda-ku, TOKYO 101-8535, JAPAN

(72) ITO, Yoshimasa (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT HẠT NANO HOẶC CHẾ PHẨM CHỨA HẠT NANO

(57) Sáng chế mô tả chế phẩm chứa hạt nano được sản xuất bằng quy trình được đặc trưng bởi bước hòa tan hợp chất ít tan trong nước hoặc chất tương tự trong điều kiện nhiệt độ cao và áp suất cao, và nghiền huyền phù hoặc dung dịch tương tự chứa tinh thể đồng nhất thu được bằng cách làm mát dung dịch thu được. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình trên.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất hạt nano của sản phẩm thuốc hoặc chế phẩm chứa hạt nano của sản phẩm thuốc trong đó sản phẩm thuốc này không tan trong nước hoặc ít tan trong nước; hạt nano; và chế phẩm chứa hạt nano này. Cụ thể là, sáng chế đề xuất phương pháp bao gồm hòa tan hợp chất không tan trong nước hoặc ít tan trong nước hoặc hợp chất tương tự ở nhiệt độ cao và trong điều kiện áp suất cao, làm mát dung dịch thu được để tạo ra huyền phù chứa tinh thể đồng nhất của hợp chất này, hoặc sau đó, phân tách để tạo ra tinh thể được phân tách, và nghiền huyền phù hoặc tinh thể được phân tách này; hạt nano thu được bằng phương pháp này; và chế phẩm chứa hạt nano này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Dược chất tan trong nước hoặc dung môi khả dụng để dùng có thể được bào chế thành dung dịch với nước hoặc dung môi thích hợp để sản xuất sản phẩm thuốc như thuốc tiêm, có thể được sử dụng. Trong khi đó, trong trường hợp dược chất ít tan trong nước hoặc dung môi khả dụng để dùng, dược chất có thể hòa tan bằng cách bổ sung chất hòa tan để sản xuất dung dịch thuốc, nếu có (ví dụ tài liệu sáng chế 1), hoặc dược chất được nghiền thành vi hạt và được bào chế thành huyền phù để sử dụng (ví dụ tài liệu sáng chế 2). Tuy nhiên, trong một số trường hợp, một số dược chất không được hòa tan hoặc được hòa tan không đủ ngay cả khi bổ sung lượng thông thường chất hòa tan, hoặc trong các trường hợp khác, một số chất làm tan có thể làm cho trị số pH của dung dịch của nó vượt ra ngoài độ trung tính khả dụng sinh học.

Tuy nhiên, Ngoài ra, phương pháp sử dụng huyền phù không cần quy trình chung bởi vì trong một số trường hợp kích thước hạt không đủ nhỏ, hoặc trong các trường hợp khác hạt có thể được kết tụ nhanh chóng sau khi điều chế hoặc trong quá trình bảo quản. Cụ thể là, nếu huyền phù được sử dụng để tiêm,

bước khử trùng như lọc vô trùng là cần thiết, và do đó cần thiết để sản xuất huyền phù chứa được chất ở dạng hạt nano ổn định mà kích thước hạt của chúng là 0,2µm (200nm) hoặc nhỏ hơn khả dụng để khử trùng bằng cách lọc. Tuy nhiên, trong thực tế không dễ dàng sản xuất huyền phù chứa được chất ở dạng hạt nano ổn định như vậy, cụ thể là khó sản xuất huyền phù tiêm được chứa được chất ít tan.

Liên quan đến những thay đổi về lối sống gần đây, các bệnh xơ cứng động mạch như nhồi máu tim, đau thắt ngực, đột quy, và bệnh mạch ngoại vi đang gia tăng. Tái tạo hình mạch tim bằng ống soi sáng luôn qua da (sau đây được gọi là "PTA-*Percutaneous transluminal angioplasty*") đã được sử dụng rộng rãi làm phương pháp đáng tin cậy trong điều trị bệnh xơ cứng động mạch bằng cách nong các phần mạch máu bị chít hẹp hoặc bị bít kín bằng phẫu thuật, phương pháp này được đại diện bởi, ví dụ, tái tạo hình mạch động mạch vành bằng ống soi sáng luôn qua da ở động mạch vành trong tim. PTA là kỹ thuật khôi phục dòng máu, trong đó ống thông trên đầu có gắn bóng (ống có bóng ở đầu ống) hoặc stent được luồn từ động mạch tay hoặc đùi, ống này được đặt vào chỗ hít hẹp của động mạch vành, sau đó bóng được gắn vào đầu ống được thổi lên để làm rộng mạch máu chít hẹp. Tuy nhiên, mạch máu được xử lý bằng PTA bị tổn thương như làm bong tế bào màng trong và làm tổn thương lớp màng mỏng đàn hồi, và lớp màng nội mạch phát triển do phản ứng làm lành tổn thương trong thành mạch, do đó người bệnh mà vị trí tổn thương chít hẹp được nong bằng PTA có thể bị tái chít hẹp với tỷ lệ 30 đến 40%.

Do đó, đã có đề xuất là cố gắng làm giảm tỷ lệ tái chít hẹp bằng cách giải phóng được chất khu trú trong thời gian dài tại vị trí đặt lumen, bằng cách sử dụng loại dụng cụ y tế hòa tan được chất để đặt vào lumen trong đó thuốc kháng viêm hoặc chất ức chế sự tăng sinh tế bào cơ trơn được đặt trên bề mặt của stent hoặc ống thông trên đầu có gắn bóng được làm bằng vật liệu kim loại hoặc polyme (tài liệu sáng chế 3, 4). Ví dụ, tài liệu sáng chế 3 đề xuất stent giải hấp thuốc (sau đây, được gọi tắt là "DES") trong đó thân stent được phủ bởi hạt nano tương thích sinh học chứa hợp chất có hoạt tính sinh học để điều trị, và quy trình

điều chế chúng, tài liệu này bộc lộ kỹ thuật kết tinh hình cầu là quy trình sản xuất hạt nano tương thích sinh học. Tuy nhiên, khó có được lượng có hiệu quả hạt nano của dược chất ít tan trong nước như xilostazol vẫn giữ được hoạt tính chống huyết khối làm hạt nano trên bề mặt của stent hoặc bóng. Nhiều phương pháp phủ khác nhau đã được thử nghiệm, nhưng vẫn chưa tìm ra quy trình hữu dụng bất kỳ nào.

Tài liệu sáng chế 1 WO 2009/017259

Tài liệu sáng chế 2 WO 2006/052018

Tài liệu sáng chế 3 JP-A-2007-215620

Tài liệu sáng chế 4 WO 2011/024831

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề được giải quyết bởi sáng chế

Như được mô tả trên đây, vẫn còn khó để sản xuất sản phẩm thuốc dạng lỏng ổn định như thuốc tiêm chứa dược chất ít tan, và cụ thể là có thể mong muốn tạo ra phương pháp sản xuất huyền phù ổn định (dung dịch phân tán được) chứa dược chất ở dạng hạt nano ổn định khả dụng để khử trùng bằng cách lọc, và phương pháp phủ stent và phương pháp tương tự bằng hạt nano.

Phương pháp giải quyết vấn đề

Bằng các nghiên cứu khác nhau, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra phương pháp sản xuất hạt nano ổn định của hợp chất không tan trong nước hoặc ít tan trong nước hoặc chế phẩm chứa hạt nano để hoàn thành sáng chế. Cụ thể là, các tác giả sáng chế đã phát hiện phương pháp mới bao gồm bắt các hợp chất không tan trong nước hoặc ít tan trong nước hòa tan trong nước hoặc nước chứa etanol hoặc dung dịch tương tự ở nhiệt độ cao trong điều kiện áp suất cao, làm mát dung dịch thu được để tạo ra huyền phù chứa tinh thể đồng nhất của hợp chất này, hoặc sau đó, phân tách để tạo ra tinh thể được phân tách, và nghiền sản phẩm thu được tinh thể được phân tách để tạo ra dung dịch phân tán hoặc bột rắn chứa hợp chất dưới dạng hạt nano.

Sáng chế đề cập đến giải pháp sau.

[1] Phương pháp sản xuất hạt nano hoặc chế phẩm chứa hạt nano, bao gồm:

Bước (1): hòa tan hợp chất không tan trong nước hoặc ít tan trong nước, dung môi chấp nhận được để sản xuất sản phẩm thuốc hoặc hỗn hợp của nó ở nhiệt độ cao trong điều kiện áp suất cao;

Bước (2): làm mát dung dịch thu được để tạo ra huyền phù chứa tinh thể đồng nhất của hợp chất này, hoặc sau đó, phân tách để tạo ra tinh thể được phân tách; và

Bước (3): nghiền huyền phù thu được hoặc tinh thể được phân tách này.

[2] Phương pháp nêu trong mục [1], trong đó, huyền phù thu được trong bước (2) và huyền phù thu được này được nghiền trong bước (3) bằng quy trình nghiền trong nước. Cụ thể là, đó là phương pháp sản xuất hạt nano hoặc chế phẩm chứa hạt nano (có nghĩa là, dung dịch phân tán chứa hạt nano), bao gồm:

Bước (1): hòa tan hợp chất không tan trong nước hoặc ít tan trong nước, dung môi chấp nhận được để sản xuất sản phẩm thuốc hoặc hỗn hợp của nó ở nhiệt độ cao trong điều kiện áp suất cao;

Bước (2): làm mát dung dịch thu được để tạo ra huyền phù chứa tinh thể đồng nhất của hợp chất này; và

Bước (3): nghiền huyền phù thu được bằng quy trình nghiền trong nước.

[3] Phương pháp nêu trong mục [1], trong đó tinh thể được phân tách thu được trong bước (2) và tinh thể được phân tách này được nghiền trong bước (3) bằng quy trình nghiền khô hoặc nghiền ướt. Cụ thể là, đó là phương pháp sản xuất hạt nano hoặc chế phẩm chứa hạt nano (có nghĩa là, tinh thể), bao gồm:

Bước (1): hòa tan hợp chất không tan trong nước hoặc ít tan trong nước, dung môi chấp nhận được để sản xuất sản phẩm thuốc hoặc hỗn hợp của nó ở nhiệt độ cao trong điều kiện áp suất cao;

Bước (2): làm mát dung dịch thu được để tạo ra huyền phù chứa tinh thể đồng nhất của hợp chất này, sau đó phân tách tinh thể từ huyền phù này; và

Bước (3): nghiền tinh thể được phân tách này bằng quy trình nghiền khô hoặc nghiền ướt.

[4] Phương pháp nêu trong mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [3], trong đó kích thước hạt trung bình của hạt nano là 200nm hoặc nhỏ hơn.

[5] Phương pháp nêu trong mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [4], trong đó xyclodextrin, chất phân tán, và/hoặc chất trung hòa điện tích có trong dung môi hòa tan trong bước (1).

[6] Phương pháp nêu trong mục [5], trong đó xyclodextrin là 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD), và/hoặc chất phân tán là methylxenluloza được thể thấp được thể thấp, và/hoặc chất trung hòa điện tích là Na docusat.

[7] Phương pháp nêu trong mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [6], trong đó xyclodextrin, chất phân tán, và/hoặc chất trung hòa điện tích được bổ sung trong bước nghiền của bước (3).

[8] Phương pháp nêu trong mục [7], trong đó xyclodextrin là 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD), và/hoặc chất phân tán là methylxenluloza được thể thấp, và/hoặc chất trung hòa điện tích là Na docusat.

[9] Phương pháp nêu trong mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [8], trong đó nhiệt độ cao trong bước (1) là 120°C đến 140°C.

[10] Phương pháp nêu trong mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [9], trong đó điều kiện áp suất cao trong bước (1) là áp suất thu được bằng cách bịt kín dung môi hòa tan chứa hợp chất trong bình và đun nóng bình đến nhiệt độ cao.

[11] Phương pháp nêu trong mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [10], trong đó hợp chất không tan trong nước hoặc ít tan trong nước là xilostazol, tranilast, indometaxin, axemetaxin hoặc muối dược dụng của nó.

[12] Phương pháp nêu trong mục [11], trong đó hợp chất không tan trong nước hoặc ít tan trong nước là xilostazol hoặc muối dược dụng của nó.

[13] Hạt nano hoặc chế phẩm chứa hạt nano được sản xuất bằng phương

pháp nêu trong mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [12].

[14] Hạt nano của xilostazol hoặc chế phẩm chứa hạt nano của xilostazol được sản xuất bằng phương pháp bao gồm:

Bước (1): hòa tan xilostazol trong nước, dung môi chấp nhận được để sản xuất sản phẩm thuốc hoặc dung dịch hỗn hợp của nó ở nhiệt độ cao trong điều kiện áp suất cao;

Bước (2): làm mát dung dịch thu được để tạo ra huyền phù chứa tinh thể đồng nhất của xilostazol, hoặc sau đó, phân tách để tạo ra tinh thể được phân tách; và

Bước (3): nghiền huyền phù thu được hoặc tinh thể được phân tách này.

[15] Xilostazol ở dạng hạt nano có kích thước hạt trung bình là 200nm hoặc nhỏ hơn.

[16] Tác nhân tiêm được để điều trị chứng nhồi máu não, bao gồm xilostazol ở dạng hạt nano có kích thước hạt trung bình là 200nm hoặc nhỏ hơn.

[17] Stent hoặc ống thông trên đầu có gắn bóng được phủ bằng hạt nano hoặc chế phẩm chứa hạt nano được sản xuất bằng phương pháp nêu trong mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [12].

[18] Stent hoặc ống thông trên đầu có gắn bóng nêu trong mục [17], trong đó hợp chất không tan trong nước hoặc ít tan trong nước là xilostazol hoặc muối được dụng của nó.

Hiệu quả của sáng chế

Sáng chế cho phép sản xuất thuốc tiêm chứa nước ổn định chứa hợp chất, thậm chí là hợp chất không tan trong nước hoặc ít tan trong nước, trong đó hạt hợp chất này ở dạng hạt nano khả dụng để khử trùng bằng cách lọc. Thuốc tiêm chứa nước được đề xuất theo sáng chế có thể được đông khô để tạo ra chế phẩm tiêm được được chuẩn bị vào thời điểm sử dụng.

Chế phẩm chứa bột hạt nano thu được bằng cách phân tách tinh thể trong bước (2) và nghiền tinh thể này trong bước (3) có thể được sản xuất thành chế phẩm tiêm được được chuẩn bị vào thời điểm sử dụng và có thể cũng được dùng

làm dung dịch rưới vết thương.

Xilostazol ở dạng hạt nano có kích thước hạt trung bình là 200nm hoặc nhỏ hơn được mong muốn là được dùng làm tác nhân mới để điều trị chứng nhồi máu não như được thể hiện trong ví dụ thử nghiệm 2 được mô tả dưới đây.

Lượng có hiệu quả của chế phẩm chứa hạt nano này theo sáng chế có thể được tải và giữ trên bề mặt của stent hoặc bóng. Chế phẩm theo sáng chế có thể làm giảm lượng polyme thường được sử dụng để phủ dụng cụ y tế đến số lượng rất nhỏ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

[Hình 1]

Hình 1 thể hiện ảnh hiển vi trước và sau khi nghiền khối bột xilostazol, là kết quả của ví dụ 3.

[Hình 2]

Hình 2 thể hiện ảnh hiển vi trước và sau khi nghiền tinh thể xilostazol thu được bằng cách kết tinh từ dung môi nước, là kết quả của ví dụ 3.

[Hình 3]

Hình 3 thể hiện ảnh hiển vi trước và sau khi nghiền tinh thể xilostazol thu được bằng cách kết tinh từ dung môi etanol 50%, là kết quả của ví dụ 3.

[Hình 4]

Hình 4 thể hiện ảnh hiển vi trước và sau khi nghiền khối bột tranilast, là kết quả của ví dụ 3.

[Hình 5]

Hình 5 thể hiện ảnh hiển vi trước và sau khi nghiền tinh thể tranilast thu được bằng cách kết tinh từ dung môi nước, là kết quả của ví dụ 3.

[Hình 6]

Hình 6 thể hiện ảnh hiển vi trước và sau khi nghiền tinh thể tranilast thu được bằng cách kết tinh từ dung môi etanol 50%, là kết quả của ví dụ 3.

[Hình 7]

Hình 7 thể hiện động học và các thông số trong máu của xilostazol, là kết

quả của ví dụ thử nghiệm 1. CLZ trong hình là xilostazol; ký hiệu tương tự có thể được sử dụng sau đây.

[Hình 8]

Hình 8 thể hiện hiệu quả của việc dùng trong mạch dung dịch phân tán chứa hạt nano xilostazol lên dòng máu trong não, là kết quả của ví dụ thử nghiệm 2.

[Hình 9]

Hình 9 thể hiện chế phẩm chứa thuốc mỡ xilostazol trong ví dụ thử nghiệm 3.

[Hình 10]

Hình 10 thể hiện khả năng thấm của thuốc mỡ xilostazol đối với da chuột và da giả *in vitro*, là kết quả của ví dụ thử nghiệm 3.

[Hình 11]

Hình 11 thể hiện kết quả phân tích động học về khả năng thấm thuốc mỡ xilostazol của da chuột *in vitro*, là kết quả của ví dụ thử nghiệm 3.

[Hình 12]

Hình 12 thể hiện dụng cụ bôi thuốc mỡ lên bụng chuột.

[Hình 13]

Hình 13 thể hiện được động học trong máu về tính thấm của thuốc mỡ xilostazol đối với da chuột *in vivo*, là kết quả của ví dụ thử nghiệm 3.

[Hình 14]

Hình 14 thể hiện được động học trong máu về tính thấm của thuốc mỡ xilostazol đối với da chuột *in vivo*, là kết quả của ví dụ thử nghiệm 3.

[Hình 15]

Hình 15 thể hiện sự thay đổi theo thời gian của hiện tượng phù chân chuột sau khi dùng thuốc mỡ gel tranilast, là kết quả của ví dụ thử nghiệm 4. Đồ thị A thể hiện sự thay đổi của chân phải và đồ thị B thể hiện sự thay đổi của chân trái. Trong hình, TRA là tranilast, chứng phù chân chỉ hiện tượng phù chân, và ngày sau khi tiêm tá dược là số ngày sau khi tạo ra chứng viêm khớp do tá dược; thuật ngữ tương tự có thể được sử dụng sau đó.

[Hình 16]

Hình 16 thể hiện tính thấm thuốc mỡ gel tranilast của da chuột *in vitro*, là kết quả của ví dụ thử nghiệm 4.

[Hình 17]

Hình 17 thể hiện mức tranilast trong máu sau khi dùng thuốc mỡ gel tranilast, là kết quả của ví dụ thử nghiệm 4.

[Hình 18]

Hình 18 thể hiện mức tồn lưu của tranilast trong da sau khi dùng thuốc mỡ gel tranilast, là kết quả của ví dụ thử nghiệm 4.

Mô tả chi tiết sáng chế

"Hợp chất không tan trong nước hoặc ít tan trong nước" theo sáng chế không bị giới hạn miễn là hợp chất này không tan hoặc ít tan trong nước, cụ thể là mong muốn là hợp chất thuốc mà không tan hoặc ít tan trong nước, bao gồm, ví dụ, xilostazol, tranilast, indometaxin, axemetaxin và muối dược dụng của nó. Nhờ công nghệ của sáng chế, đặc biệt mong muốn là chế phẩm dùng qua đường miệng chứa xilostazol có hoạt tính chống huyết khối được dùng làm thuốc tiêm và chế phẩm dùng qua đường miệng chứa tranilast có hoạt tính chống dị ứng được dùng để rưới vết thương.

"Hạt nano" theo sáng chế chỉ hạt có kích thước hạt trung bình là loại nano (nhỏ hơn 1µm) thường là 200nm hoặc nhỏ hơn khả dụng để khử trùng bằng cách lọc, tốt hơn là 100nm hoặc nhỏ hơn.

"Chế phẩm chứa hạt nano" theo sáng chế chỉ chế phẩm chứa hạt nano, và bao gồm, ví dụ, huyền phù chứa hạt nano, cũng như hạt nano bao gồm thành phần dược dụng bổ sung khác và huyền phù chứa nó. Chính hạt nano được chứa trong chế phẩm chứa hạt nano.

Trong số các huyền phù chứa hạt, huyền phù mà trong đó hạt là hạt nano thường được định nghĩa là "dung dịch phân tán được" ở trạng thái giữa huyền phù và dung dịch.

Cụ thể là, "xilostazol ở dạng hạt nano có kích thước hạt trung bình là 200nm hoặc nhỏ hơn" theo sáng chế thể hiện hiệu quả chữa bệnh cao hơn khi

dùng trong tĩnh mạch trên mô hình thiếu máu não cục bộ so với dùng dung dịch xilostazol trong đó xilostazol được hòa tan hoàn toàn, như được thể hiện trong ví dụ thử nghiệm 2 được mô tả dưới đây, và được mong đợi là tác nhân mới để điều trị chứng nhồi máu não thay cho tPA. Việc dùng trong mạch được sử dụng ở đây bao gồm việc dùng qua đường truyền.

"Dung môi chấp nhận được để sản xuất sản phẩm thuốc" được sử dụng trong bước (1) theo sáng chế không bị giới hạn miễn là dung môi này là dung môi thông thường được sử dụng trong sản xuất sản phẩm thuốc, và thường bao gồm dung môi chứa nước, ví dụ, rượu như etanol, keton như axeton, nitril như axetonitril, và ete như dietyl ete và THF, tốt hơn là etanol.

"Nước, dung môi chấp nhận được để sản xuất sản phẩm thuốc hoặc hỗn hợp của nó" trong bước (1) theo sáng chế bao gồm tốt hơn là nước hoặc hỗn hợp gồm dung môi chấp nhận được để sản xuất sản phẩm thuốc và nước, cụ thể là nước hoặc hỗn hợp gồm etanol và nước.

Nếu huyền phù thu được trong bước (2), huyền phù này được nghiền trong bước (3), và dung dịch phân tán được thu được được khử trùng bằng cách lọc để sản xuất thuốc tiêm, sau đó "nước, dung môi chấp nhận được để sản xuất sản phẩm thuốc hoặc dung dịch hỗn hợp" tốt hơn là nước.

"Nước" được sử dụng ở đây là loại được sử dụng trong sản xuất sản phẩm thuốc và bao gồm nước tinh sạch.

"Nhiệt độ cao và áp suất cao" theo sáng chế không bị giới hạn miễn là hợp chất không tan hoặc ít tan trong nước được hòa tan trong nước, dung môi chấp nhận được để sản xuất sản phẩm thuốc hoặc hỗn hợp của nó ở nhiệt độ cao này trong điều kiện áp suất cao này, và hợp chất này không bị phân hủy, bao gồm, ví dụ, 40 đến 150°C, tốt hơn là 60 đến 140°C, 80 đến 140°C hoặc 100 đến 140°C, tốt hơn nữa là 120 đến 140°C, còn tốt hơn nữa là 120 đến 130°C, và điều kiện áp suất cao tốt hơn là áp suất mà thu được bằng cách bịt kín dung môi hòa tan chứa hợp chất trong bình và đun nóng bình đến nhiệt độ cao.

Thời gian cần để hòa tan trong bước (1) theo sáng chế là thời gian cho đến khi hợp chất được hòa tan, thường là khoảng 10 phút đến 2 giờ.

"Làm lạnh" trong bước (2) theo sáng chế bao gồm việc làm lạnh bằng nước, nước đá, và không khí, tốt hơn là làm lạnh bằng nước.

"Tinh thể được phân tách" trong bước (2) theo sáng chế đề cập đến tinh thể mà thu được trên màng lọc sau khi lọc huyền phù thu được trong bước (2). Tinh thể này cũng có thể thu được bằng cách làm lắng bằng ly tâm, sau đó gạn.

Đối với "việc nghiền" trong bước (3) theo sáng chế, huyền phù được nghiền bằng, ví dụ, quy trình nghiền trong nước, và tinh thể được phân tách này được nghiền bằng, ví dụ, quy trình nghiền khô hoặc quy trình nghiền ướt.

Quy trình nghiền trong nước được sử dụng ở đây được thực hiện bằng dụng cụ nghiền như máy nghiền hạt và thiết bị hóa vi lỏng. Quy trình nghiền khô được thực hiện bằng dụng cụ nghiền như máy nghiền bi và máy nghiền con lăn. Quy trình nghiền ướt được thực hiện bằng dụng cụ nghiền như máy nghiền bi và máy nghiền con lăn.

Chế phẩm chứa hạt nano theo sáng chế có thể chứa các thành phần khác nhau có thể được bổ sung vào chế phẩm ngoài hợp chất thuốc. Các thành phần này bao gồm tốt hơn là tác nhân hòa tan, chất phân tán, và chất trung hòa điện tích, và cụ thể là xyclodextrin (ví dụ 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin) làm chất hòa tan, methylxenluloza được thể thấp làm chất phân tán, và Na docusat làm chất trung hòa điện tích.

Lượng các thành phần cho chế phẩm để bổ sung ở đây không bị giới hạn miễn là các lượng này không làm ảnh hưởng đến hoạt tính của sản phẩm thuốc và sự tạo hạt nano, ví dụ, tổng lượng các thành phần cho chế phẩm là 5000% (khối lượng/khối lượng) hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 10% (khối lượng/khối lượng) đến 2000% (khối lượng/khối lượng), mỗi lượng hợp chất thuốc.

Phương pháp bổ sung các thành phần không bị giới hạn, nhưng việc bổ sung trong bước (1) có thể được ưu tiên để thu được huyền phù trong bước (2) hoặc việc bổ sung trong bước (3) có thể được ưu tiên để thu được tinh thể được phân tách này trong bước (2).

Nồng độ của hợp chất trong bước (1) theo sáng chế không bị giới hạn miễn là hợp chất này được hòa tan ở nhiệt độ cao trong điều kiện áp suất cao,

sau đó là sự kết tủa tinh thể của hợp chất này bằng cách làm lạnh trong bước (2), bao gồm 5% (khối lượng/thể tích) hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 2% (khối lượng/thể tích) hoặc nhỏ hơn, còn tốt hơn nữa là 2 đến 0,2% (khối lượng/thể tích).

Theo sáng chế, dụng cụ y tế như stent và ống thông trên đầu có gắn bóng có thể được phủ bằng công nghệ phủ thông thường, ví dụ, biến đổi bằng điện như phương pháp điện di hoặc phương pháp phun như phun sương siêu âm, phun và quét khí.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được minh họa bằng các ví dụ, các ví dụ tham chiếu, và các ví dụ thử nghiệm chi tiết dưới đây, các ví dụ này không nhằm làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Ví dụ 1. Kết tinh sản phẩm thuốc ít tan từ nước

Các sản phẩm thuốc ít tan trong nước, xilostazol, tranilast, indometaxin, và axemetaxin, được sử dụng để sản xuất mỗi huyền phù chứa mỗi tinh thể đồng nhất trong các điều kiện nêu trong bảng 1 (tương ứng với bước (1) đến bước (2) trong phương pháp sản xuất theo sáng chế).

Trong quá trình kết tinh mỗi sản phẩm thuốc từ nước, mỗi thành phần trong bảng 1 được trộn trong điều kiện nêu trong bảng 1 trong chai thủy tinh 100 ml kín áp có mũ đỉnh vít. Hỗn hợp này được hòa tan hoàn toàn trong điều kiện gia nhiệt và áp suất, và sau đó, hỗn hợp này được làm lạnh nhanh chóng bằng nước lạnh để thúc đẩy sự kết tủa của tinh thể sản phẩm thuốc. Dạng tinh thể được kết tủa được quan sát, và trong tất cả các ví dụ trừ các ví dụ 1-1, 1-4, 1-7, và 1-10, tinh thể được lọc trên giấy lọc nhờ sự hút, và sau đó được làm khô trong điều kiện áp suất giảm ở 60°C để thu hồi tinh thể. Tỷ lệ thu hồi được tính bằng cách cân khối lượng tinh thể; tỷ lệ thu hồi được xem là 100% trong các ví dụ 1-1, 1-4, 1-7, và 1-10 trong đó tinh thể không được phân tách.

Tinh thể khô phân tách được ngoài các ví dụ 1-1, 1-4, 1-7, và 1-10 được sử dụng để sản xuất sản phẩm thuốc dạng hạt nano bằng quy trình nghiền khô

trong ví dụ 2 sau đây. Huyền phù chứa tinh thể trong các ví dụ 1-1, 1-4, 1-7 hoặc 1-10 được sử dụng để sản xuất sản phẩm thuốc dạng hạt nano bằng quy trình nghiền trong nước trong ví dụ 2 sau đây.

Bảng 1-1

Bảng 1

Ví dụ	Sản phẩm thuốc	Hàm lượng	Môi trường phân tán	Điều kiện hòa tan	Dạng tinh thể	Tỷ lệ thu hồi
1-1	Xilostazol	0,5%	5% HP- β -CD, 0,5% methyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	121°C, 30 phút	Hình kim	100%
1-2	Xilostazol	0,5%	Nước tinh sạch	130°C, 2 giờ	Hình kim	98,5%
1-3	Xilostazol	2,0%	Etanol 50%	100°C, 20 phút	Hình kim	93,7%

Bảng 1-2

1-4	Tranilast	0,5%	5% HP- β -CD, 0,5% methyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	140°C, 2 giờ	Hình lập phương	100%
1-5	Tranilast	0,2%	Nước tinh sạch	150°C, 2 giờ	Hình lập phương	97,3%
1-6	Tranilast	2,0%	Etanol 50%	120°C, 20 phút	Hình lập phương	98,7%
1-7	Indometaxin	0,5%	5% HP- β -CD, 0,5% methyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	121°C, 30 phút	Hình kim	100%

1-8	Indometaxin	0,5%	Nước tinh sạch	120°C, 2 giờ	Hình kim	96,8%
1-9	Indometaxin	2,0%	Etanol 50%	90°C, 20 phút	Hình kim	98,8%
1-10	Axemetaxin	0,5%	5% HP- β -CD, 0,5% metyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	121°C, 30 phút	Hình kim	100%
1-11	Axemetaxin	0,5%	Nước tinh sạch	120°C, 2 giờ	Hình kim	98,9%
1-12	Axemetaxin	2,0%	Etanol 50%	90°C, 20 phút	Hình kim	96,4%

Ví dụ 2. Sự tạo hạt nano bằng cách nghiền sản phẩm thuốc dạng tinh thể thu được bằng cách kết tinh từ nước

Các tinh thể sản phẩm thuốc theo các ví dụ 1-1 đến 1-12 thu được trong ví dụ 1 nêu trên được nghiền trong các điều kiện tương ứng với các ví dụ 2-1 đến 2-12 trong bảng 2 (tương ứng với bước (3) trong phương pháp sản xuất theo sáng chế).

Trong các ví dụ 2-1, 2-4, 2-7, và 2-10, huyền phù thu được trong ví dụ 1 được nghiền bằng quy trình nghiền trong nước, trong khi đó trong các ví dụ 2-2, 2-3, 2-5, 2-6, 2-8, 2-9, 2-11, và 2-12, tinh thể được làm khô thu được trong ví dụ 1 được nghiền bằng quy trình nghiền khô. Quy trình nghiền khô được thực hiện sau khi bổ sung các chất hỗ trợ trong bảng 2; các chất hỗ trợ được mô tả trong bảng 2 đối với quy trình nghiền trong nước tương ứng với môi trường phân tán được sử dụng trong ví dụ 1.

Kích thước hạt trung bình và sự phân bố kích thước hạt của tinh thể hạt nano thu được được tính toán, trị số của chúng được thể hiện trong bảng 2. Tỷ lệ thu hồi được tính toán dựa trên các hạt được lọc qua màng lọc (kích thước lỗ 200nm).

Tất cả kích thước hạt trung bình của sản phẩm thuốc được tạo hạt nano trong bảng 2 là hạt nano 150nm hoặc nhỏ hơn, và hạt nano thu được được phân tán trong nước, và sau đó được lọc qua màng lọc (kích thước lỗ 200nm) để thu được dịch lọc. Mọi tỷ lệ thu hồi được chất trong dịch lọc đều cao, và tỷ lệ thu hồi hạt nano được điều chế bằng quy trình nghiền trong nước là đặc biệt cao (90% hoặc lớn hơn).

Bảng 2-1

Bảng 2

Ví dụ	Sản phẩm thuốc	Hàm lượng	Chất bổ trợ	Quy trình nghiền	Kích thước hạt	Tỷ lệ thu hồi (kích thước hạt là 200nm hoặc nhỏ hơn)
2-1	Xilostazol	0,5%	5% HP- β -CD, 0,5% methyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiền trong nước (nghiền hạt, hạt ziriconi đioxit 0,1mm, 5.500 vòng/phút, 10 phút, 2°C)	92,2 $\pm$ 41,5nm	97,6%

2-2	Cilostazol	80%	19,9% methyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiền khô (máy nghiền ziriconi đioxit tự động hóa, 300 vòng/phút, 14 giờ, 22°C)	137 ±87,6nm	87,3%
2-3	Cilostazol	80%	19,9% methyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiền khô (máy nghiền ziriconi đioxit tự động hóa, 300 vòng/phút, 14 giờ, 22°C)	119 ±55,7nm	92,0%
2-4	Tranilast	0,5%	5% HP-β- CD, 0,5% methyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiền trong nước (nghiền hạt, hạt ziriconi đioxit 0,1mm, 5.500 vòng/phút, 10 phút, 2°C)	84,7 ±31,2nm	99,2%

2-5	Tranilast	80%	19,9% metyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiên khô (máy nghiền ziriconi đioxit tự động hóa, 300 vòng/phút, 14 giờ, 22°C)	103 ±47,8nm	94,6%
2-6	Tranilast	80%	19,9% metyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiên khô (máy nghiền ziriconi đioxit tự động hóa, 300 vòng/phút, 14 giờ, 22°C)	96,9±40,8 nm	97,7%

Bảng 2-2

2-7	Indometaxin	0,5%	5% HP-β- CD, 0,5% metyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiên trong nước (nghiên hạt, hạt ziriconi đioxit 0,1mm, 5.500 vòng/phút, 10 phút, 2°C)	111 ±44,7nm	96,4%
-----	-------------	------	--	---	----------------	-------

2-8	Indometaxin	80%	19,9% methyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiền khô (máy nghiền ziriconi đioxit tự động hóa, 300 vòng/phút, 14 giờ, 22°C)	127 ±68,7nm	86,5%
2-9	Indometaxin	80%	19,9% methyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiền khô (máy nghiền ziriconi đioxit tự động hóa, 300 vòng/phút, 14 giờ, 22°C)	102 ±44,2nm	90,6%
2-10	Axemetaxin	0,5%	5% HP-β- CD, 0,5% methyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiền trong nước (nghiền hạt, hạt ziriconi đioxit 0,1mm, 5.500 vòng/phút, 10 phút, 2°C)	90,2 ±55,4nm	96,5%
2-11	Axemetaxin	80%	19,9% methyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiền khô (máy nghiền ziriconi đioxit tự động hóa, 300 vòng/phút, 14 giờ, 22°C)	147 ±95,7nm	78,5%

2-12	Axemetaxin	80%	19,9% metyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiên khô (máy nghiền ziriconi đioxit tự động hóa, 300 vòng/phút, 14 giờ, 22°C)	127 ±74,2nm	91,7%
------	------------	-----	--	--	----------------	-------

Ví dụ so sánh 1. Hạt được nghiền không kết tinh từ nước

Để kiểm tra hiệu quả của việc kết tinh từ nước theo sáng chế, sản phẩm thuốc bột khối (không được đưa vào kết tinh) được nghiền bằng quy trình nghiền trong nước hoặc quy trình nghiền khô không kết tinh từ nước để điều chế hạt, và kích thước hạt của hạt và tỷ lệ thu hồi được xác định. Các điều kiện nghiền, và kích thước hạt và tỷ lệ thu hồi của hạt thu được được thể hiện trong bảng 3.

Kích thước hạt lớn, sự thay đổi kích thước hạt rộng, và tỷ lệ thu hồi hạt nano có kích thước 200nm hoặc nhỏ hơn là thấp (2 đến 30%) trong các ví dụ so sánh 3-1 đến 3-8 được nghiền mà không kết tinh từ nước, so với kích thước hạt trong mỗi ví dụ trong ví dụ 2 được tạo hạt nano theo hai bước kết tinh từ nước và nghiền.

Bảng 3

Bảng 3

Ví dụ so sánh	Sản phẩm thuốc	Hàm lượng	Chất bổ trợ	Quy trình nghiên	Kích thước hạt	Tỷ lệ thu hồi (kích thước hạt là 200nm hoặc nhỏ hơn)
------------------	-------------------	--------------	-------------	---------------------	----------------------	--

3-1	Bột khối xilostazol	0,5%	5% HP- β - CD, 0,5% metyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiền trong nước (nghiền hạt, hạt ziriconi đioxit 0,1mm, 5.500 vòng/phút, 10 phút, 2°C)	193 ± 105 nm	30,7%
3-2	Bột khối xilostazol	80%	19,9% metyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiền khô (máy nghiền ziriconi đioxit tự động hóa, 300 vòng/phút, 14 giờ, 22°C)	272 ± 185 nm	8,7%
3-3	Bột khối tranilast	0,5%	5% HP- β - CD, 0,5% metyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiền trong nước (nghiền hạt, hạt ziriconi đioxit 0,1mm, 5.500 vòng/phút, 10 phút, 2°C)	257 ± 117 nm	20,8%

3-4	Bột khối tranilast	80%	19,9% methyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiền khô (máy nghiền ziriconi đioxit tự động hóa, 300 vòng/phút, 14 giờ, 22°C)	214 ±181nm	13,3%
3-5	Bột khối indometaxin	0,5%	5% HP-β- CD, 0,5% methyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiền trong nước (nghiền hạt, hạt ziriconi đioxit 0,1mm, 5.500 vòng/phút, 10 phút, 2°C)	317 ±185nm	2,1%
3-6	Bột khối indometaxin	80%	19,9% methyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiền khô (máy nghiền ziriconi đioxit tự động hóa, 300 vòng/phút, 14 giờ, 22°C)	288 ±147nm	5,5%

3-7	Bột khối axemetaxin	0,5%	5% HP- β - CD, 0,5% metyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiền trong nước (nghiền hạt, hạt ziriconi đioxit 0,1mm, 5.500 vòng/phút, 10 phút, 2°C)	267 ± 147 nm	10,9%
3-8	Bột khối axemetaxin	80%	19,9% metyl xenluloza được thể thấp, 0,1% Na docusat	Quy trình nghiền khô (máy nghiền ziriconi đioxit tự động hóa, 300 vòng/phút, 14 giờ, 22°C)	227 ± 113 nm	17,2%

Ví dụ 3. Sự thay đổi đặc tính nghiền của xilostazol và tranilast do sự tái kết tinh

Mỗi 1g bột khối xilostazol (CLZ), CLZ tái kết tinh từ nước (các tinh thể thu được trong ví dụ 1-2), CLZ tái kết tinh từ etanol 50% (các tinh thể thu được trong ví dụ 1-3), bột khối tranilast (TRA), TRA tái kết tinh từ nước (các tinh thể thu được trong ví dụ 1-5), và TRA tái kết tinh từ etanol 50% (các tinh thể thu được trong ví dụ 1-6) được cân để bổ sung vào vĩa agat, sau đó nghiền bằng tay trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét (trong đó, độ phóng đại là 100 lần, và kích thước thực được thể hiện theo tỷ lệ). Các kết quả được thể hiện trên hình 1 đến hình 6. Trong trường hợp bất kỳ, các tinh thể được tái kết tinh là các tinh thể được nghiền mịn hơn.

Ví dụ thử nghiệm 1. Dược động học trong máu sau khi dùng trong tĩnh mạch dung dịch phân tán chứa hạt nano xilostazol

Các thử nghiệm sau được thực hiện để nghiên cứu sự khác nhau về động

học trong máu giữa khi dung dịch phân tán chứa hạt nano xilostazol được dùng qua đường trong tĩnh mạch và khi dung dịch xilostazol trong đó xilostazol được hòa tan hoàn toàn với HP- β -CD được dùng qua đường trong tĩnh mạch.

Dung dịch phân tán chứa hạt nano xilostazol (0,5%) thu được như ví dụ 2-1 trong bảng 2 và dung dịch xilostazol (0,05% trong dung dịch HP- β -CD 10%) được khử trùng bằng cách lọc (màng lọc kích thước lỗ 0,2 μ m) để tiêm vào tĩnh mạch đuôi của các con chuột đực Wistar (trọng lượng: khoảng 200g) với lượng 0,6 mg/kg (là xilostazol). Máu được lấy theo thời gian từ tĩnh mạch cổ và được động học trong máu được phân tích.

Mức xilostazol thu được trong máu được thể hiện trên hình 7. Cả hạt nano xilostazol và dung dịch xilostazol thể hiện đặc tính phân tán hai pha. Không có sự khác biệt đáng kể được ghi nhận giữa chúng về các thông số động học được phân tích bằng mô hình 2 ngăn (hình 7), và dung dịch phân tán chứa hạt nano có thể so sánh được một cách xấp xỉ với dung dịch chứa xilostazol về mặt được động học trong máu.

Ví dụ thử nghiệm 2. Hiệu quả điều trị bệnh trên chứng nhồi máu não sau khi dùng trong tĩnh mạch dung dịch phân tán chứa hạt nano xilostazol

Để thử nghiệm hoạt tính chống huyết khối của xilostazol theo sáng chế, dung dịch phân tán chứa hạt nano xilostazol (0,5%) theo ví dụ thử nghiệm 1 và dung dịch xilostazol (0,05% trong dung dịch HP- β -CD 10%) được dùng trong tĩnh mạch cho mô hình thiếu máu não cục bộ ở chuột sau đây để nghiên cứu hiệu quả chữa bệnh của chúng so với nhau.

(Chuẩn bị mô hình thiếu máu cục bộ não trước ở chuột)

Các con chuột được gây tê bằng somnopentyl (29,8 mg/kg, i.p.), động mạch cảnh thường hai bên của chúng được bộc lộ và dòng máu của nó được chặn bằng kẹp động mạch. Sau 15 phút tái tưới máu được thực hiện, và sau 20 phút, dung dịch phân tán chứa hạt nano xilostazol và dung dịch xilostazol được dùng trong tĩnh mạch (trong khi đó tĩnh mạch đuôi được bộc lộ). Bụng được khâu, và dòng máu não được đo sau 24 giờ.

(Đo dòng máu não)

Các con chuột thử nghiệm được gây tê bằng uretan (1,2mg/kg, i.p.), và đầu được rạch và tạo một lỗ trong xương sọ. Dòng máu não được đo bằng lưu lượng kế máu mô laze OMEGAFLO FLO-N1 (được sản xuất bởi Omegawave, Inc.), và dòng máu, thể tích máu, và vận tốc máu được tính toán từ các phương trình sau.

$$\text{Dòng máu} = k_1 \int \omega P(\omega) d\omega / I^2$$

$$\text{Thể tích máu} = \ln[1 - k_2 \int P(\omega) d\omega] / I^2$$

$$\text{Vận tốc máu} = k_3 [\text{dòng máu} / \text{thể tích máu}]$$

k_1 - k_3 : Hằng số tỷ lệ

ω : Tần số góc ($2\pi f$)

$P(\omega)$: Phổ năng lượng tín hiệu

I : Lượng ánh sáng nhận được

(Kết quả)

Các kết quả được thể hiện trên hình 8. Việc dùng dung dịch phân tán chứa hạt nano thể hiện hiệu quả chữa bệnh cao hơn trong các con chuột mô hình thiếu máu não cục bộ so với hiệu quả chữa bệnh của dung dịch xilostazol mà mong đợi có hiệu quả chữa bệnh cao hơn, và theo kết quả trên hình 8, việc cải thiện dòng máu não và thể tích máu não được ghi nhận chỉ ở việc dùng trong tĩnh mạch dung dịch phân tán chứa hạt nano xilostazol với liều 0,6 mg/kg.

Ví dụ thử nghiệm 3. Dược động học trong máu sau khi dùng qua đường dưới da thuốc mỡ gel chứa hạt nano xilostazol

Các thử nghiệm sau được thực hiện để so sánh động học trong máu của việc dùng dưới da thuốc mỡ gel chứa nước chứa hạt nano xilostazol với động học trong máu của việc dùng thuốc mỡ gel chứa bột khối xilostazol.

Thuốc mỡ gel chứa nước chứa hạt nano xilostazol, thuốc mỡ PEG, và thuốc mỡ gel chứa bột khối xilostazol được sản xuất theo chế phẩm được thể hiện trên hình 9.

Thử nghiệm tính thấm trên da chuột và da giả *in vitro*

(Phương pháp thử nghiệm)

Các con chuột đực Wistar 7 tuần tuổi đã được xử lý trước cho thử nghiệm

này bằng cách loại bỏ lông bụng của chúng. Ngày tiếp theo, da bụng (đường kính 3,5cm) của phần không có lông được khoét nhân để được đặt trong ô khuếch tán. Riêng rẽ, các tấm cao su (độ dày 75 μm) được sử dụng làm da giả để thử nghiệm thay vì da chuột. Phần đáy của ô được nạp dung dịch đệm phosphate (pH 7,2), và thuốc mỡ (0,3 g) được bôi lên phần lớp sừng ở phần trên cùng của ô, sau đó bịt kín bằng tấm nhôm. Phần đáy của ô được khuấy bằng thanh khuấy trong khi duy trì nhiệt độ ở 37°C bằng bể ổn nhiệt, và các mẫu (100 μl) được lấy từ phần đáy của ô với thời gian sau 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 28, 32, và 50 giờ đồng thời với việc bổ sung lượng dung dịch đệm tương tự. Hàm lượng xilostazol trong các mẫu được đo bằng HPLC.

Dữ liệu thu được được áp dụng cho các công thức khuếch tán (1) và (2) sau để tính 5 thông số động học.

$$J_c = \frac{Q}{A(t - \tau)} = \frac{D \cdot K_m \cdot C_c}{\delta} = K_p \cdot C_c \quad (1)$$

$$D = \frac{\delta^2}{6\tau} \quad (2)$$

J_c chỉ tốc độ thấm của dược chất, K_m chỉ hệ số chia phần của da/chế phẩm, D chỉ hệ số khuếch tán trong da, τ chỉ thời gian quấy phá, δ chỉ độ dày (trung bình 0,071 cm) của da, A chỉ vùng có hiệu quả (2,01 cm^2) của da được sử dụng, Q chỉ lượng dược chất tích tụ thấm qua phần đáy của ô trong t giờ, và C_c chỉ mức xilostazol trong chế phẩm thuốc mỡ xilostazol. Hệ số thấm của da K_p được tính từ J_c/C_c .

(Đo mức xilostazol bằng HPLC)

Mẫu (10 μl) và dung dịch metylphenytoin (15 $\mu\text{g/ml}$, 90 μl) làm nội chuẩn được trộn, khuấy, và sau đó ly tâm (4°C, 20 phút, 15000 vòng/phút). Phép đo được thực hiện với dịch nổi thu được. HPLC gồm sắc ký lỏng hiệu năng cao LC-10AD (Shimadzu Corporation), khoang sắc ký CTO-6A được duy trì ở 35°C, và Inertsil ODS-3 (2,1 $\times$ 50 mm, GL Sciences Inc.) được chạy trước với pha động là $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}=35/15/50$ (thể tích/thể tích/thể tích). Tốc độ dòng

của pha động là 0,25 ml/phút, lượng mẫu bơm là 4 μ l, và mẫu được bơm tự động lên cột bằng vòi phun tự động SIL-9A. Xilostazol được phát hiện bằng bộ dò tế bào qua dòng chảy SPD-10A ở bước sóng hấp thụ là 254nm và được ghi bằng sắc ký EPC-500.

(Các kết quả)

Các kết quả được thể hiện trên hình 10 và hình 11. Thuốc mỡ gel chứa nước và thuốc mỡ PEG chứa hạt nano xilostazol thể hiện tính thấm của xilostazol trên da chuột cao hơn thuốc mỡ gel tương tự chứa bột khối xilostazol. Thuốc mỡ bất kỳ không thấm trên da giả có cao su silicon có độ dày là 75 μ m. Điều này thể hiện rằng tính thấm trên da của hạt nano xilostazol không dựa trên sự khuếch tán đơn giản của dược chất mà còn dựa vào sự chuyển giữa các tế bào của tế bào cấu tạo nên màng sinh học.

Thử nghiệm hấp thụ qua da *in vivo*

Dược động học của xilostazol trong máu sau khi dùng dưới da được đánh giá *in vivo*.

(Phương pháp thử nghiệm)

Các con chuột đực Wistar 7 tuần tuổi đã được xử lý trước cho thử nghiệm này bằng cách loại bỏ lông bụng của chúng và thông tĩnh mạch cổ của chúng (quy trình thông tĩnh mạch cổ được mô tả dưới đây). Ngày tiếp theo, thuốc mỡ (0,22 g) được bôi lên các phần không có lông bằng dụng cụ được thể hiện trên hình 12. Dụng cụ này được tạo ra bằng tấm gồm silicon và giấy nhôm (được sản xuất bởi Nippon Foil Mfg. Co., Ltd.), tấm gồm silicon này được cắt thành hình tròn có đường kính ngoài là 24 mm và đường kính trong là 18 mm. Máu được lấy từ tĩnh mạch cổ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 28, 32, và 50 giờ sau khi bôi thuốc mỡ. Máu thu được được ly tâm (4°C, 15000 vòng/phút, 20 phút) để thu dịch nổi, và dịch nổi này được đo trong điều kiện HPLC của thử nghiệm *in vitro* được đề cập trên đây.

(Quy trình thông tĩnh mạch cổ)

Máu thu được từ chuột bằng quy trình thông tĩnh mạch cổ. Các con chuột được gây mê bằng somnopentyl (30 mg/kg, i.p.) để giữ chúng ở vị trí nằm ngửa,

tạo một đường rạch trên da ở phần cổ khoảng 1,5 cm ở bên phải, và tách riêng các cơ bằng nhíp để bộc lộ tĩnh mạch cổ ngoài. Ống Phycon (SH No.00) được nạp heparin (10 IU/ml thuốc tiêm natri heparin) sau đó được đâm xuyên dưới da từ sau cổ qua ngoài cơ thể để nối với ống xi lanh. Tĩnh mạch cổ ngoài sau đó được nối lại bằng hai mũi khâu, một trong hai mũi khâu ở phía tim được kéo để cố định và chặn dòng máu và mũi khâu còn lại ở phía phần cổ được gắn chặt. Mạch máu được bộc lộ được tạo đường cắt bằng kéo và ống Phycon được luồn vào trong khoảng 3cm. Sau khi dòng máu trong ống được quan sát bằng ống xi lanh, mũi khâu ở phía tim được gắn chặt. Vị trí rạch được khâu lại. Sự thay đổi mức độ máu sau khi bôi thuốc mỡ được đánh giá mà không gây mê. Máu được lấy theo thời gian. Khoảng 0,2ml máu thu được được đặt trong ống nhỏ 0,5ml, và ly tâm bằng máy ly tâm (MX-200 TOMY) trong điều kiện 4°C, 20 phút, và 15000 vòng/phút. Dịch nổi thu được được phân tích về lượng thuốc bằng HPLC.

Các kết quả được thể hiện trên hình 13 và 14. Nhận thấy rằng mức xilostazo trong máu và tốc độ hấp thu dưới da cao hơn ở thuốc mỡ gel chứa nước và thuốc mỡ PEG chứa hạt nano xilostazol. Cụ thể là, thuốc mỡ gel chứa nước thể hiện tốc độ hấp thụ (k_a) và tỷ lệ hấp thụ cao hơn. Tuy nhiên, xilostazol không thể quan sát được trong máu đối với thuốc mỡ gel chứa bột khối xilostazol.

Ví dụ thử nghiệm 4. Sản xuất thuốc mỡ gel chứa hạt nano tranilast và hiệu quả chữa bệnh của chúng trên chuột viêm khớp do tá được trong việc dùng dưới da

Hiệu quả chữa bệnh của tranilast đối với hoạt tính chống dị ứng được nghiên cứu để so sánh việc dùng dưới da thuốc mỡ gel chứa nước chứa hạt nano tranilast với thuốc mỡ gel chứa nước chứa bột khối tranilast trên mô hình chuột viêm khớp dạng thấp sau.

(Chuẩn bị mô hình chuột viêm khớp dạng thấp)

Các con chuột Dark Agouti (DA) 7 tuần tuổi được sử dụng trong thử nghiệm này. Các con chuột DA được gây mê bằng cách xông hít, và sau đó mỗi tá được 50 μ l được tiêm vào chân phải phía sau và đuôi của chúng để tạo ra

chuột viêm khớp dạng thấp (AA) do tá dược. Tá dược được điều chế như sau. Vi khuẩn bất hoạt *Mycobacterium butyricum* (100 mg; DIFCO LABORATORIES) được đặt trong máy nghiền agat để nghiền, và sau đó Bayol F (được sản xuất bởi Wako; 10 ml) được bổ sung vào máy nghiền với lượng nhỏ. Hỗn hợp được nghiền thêm có kèm khuấy. Huyền phù thu được được chia mỗi 500 μ l vào lọ Prastic Cryogenic (được sản xuất bởi IWAKI & Co., Ltd.). Lọ này được bọc bằng giấy nhôm và khử trùng bằng nồi hấp (120°C, 15 phút), và sau đó được giữ trong tủ lạnh đến khi sử dụng.

(Sản xuất thuốc mỡ gel chứa nước chứa hạt nano tranilast và thuốc mỡ gel chứa nước chứa bột khối tranilast)

Carbopol 934 (Nhãn hiệu đăng ký, carboxyvinyl polyme) được hòa tan trong nước tinh sạch để tĩnh trong 1 giờ, và sau đó được trung hòa bằng cách bổ sung nước amoniac 5% có kèm khuấy. Dung dịch phân tán chứa hạt nano tranilast được bổ sung vào đó bằng cách bổ sung tùy ý nước tinh sạch để sản xuất thuốc mỡ gel chứa nước chứa hạt nano tranilast.

Thuốc mỡ gel chứa nước chứa bột khối tranilast được sản xuất theo quy trình nêu trên với huyền phù chứa bột khối tranilast thay vì dung dịch phân tán chứa hạt nano tranilast.

Đánh giá chứng phù ở chuột

(Phương pháp thử nghiệm)

Thuốc mỡ (0,3g) chỉ được bôi lên chân phải vào lúc 9:00 mỗi sáng một lần một ngày từ ngày 14 sau khi dùng tá dược. Kích thước chân được đánh giá để thể hiện mức độ viêm ở khớp chuột. Kích thước chân được đánh giá bằng dung dịch được sản xuất bằng cách hòa tan một thìa cà phê natri carboxymetylxenluloza trong nước tinh sạch (400 ml) và nhuộm bằng 3 hoặc 4 bột Evans Blue. Ngâm chân trong dung dịch này để đánh giá sự thay đổi của chứng phù.

Thử nghiệm sự thấm dưới da *in vitro*

(Phương pháp thử nghiệm)

Các con chuột đực Wistar 7 tuần tuổi đã được xử lý trước cho thử nghiệm

này bằng cách loại bỏ lông bụng của chúng. Ngày tiếp theo, da bụng (đường kính là 3,5cm) của phần không có lông được khoét nhân để được đặt trong ô khuếch tán. Phần đáy của ô được nạp dung dịch đệm phosphat (pH 7,2), và thuốc mỡ (0,3g) được bôi lên phần lớp sừng ở phần trên cùng của ô, sau đó bịt kín bằng tấm nhôm. Phần đáy của ô được khuấy bằng thanh khuấy trong khi duy trì nhiệt độ ở 37°C bằng bể ổn nhiệt, và các mẫu (100 μ l) được lấy từ phần đáy của ô đồng thời với việc bổ sung lượng dung dịch đệm tương tự theo thời gian. Hàm lượng tranilast trong các mẫu được đo bằng HPLC.

(Đo mức TRA bằng HPLC)

Mẫu (10 μ l) và etyl p-oxybenzoat (3 μ g/ml; 90 μ l) làm nội chuẩn được trộn, khuấy, và sau đó được ly tâm (4°C, 20 phút, 15000 vòng/phút). Phép đo được thực hiện với dịch nổi thu được. HPLC gồm sắc ký lỏng hiệu năng cao LC-10AD (Shimadzu Corporation), khoang sắc ký CTO-6A được duy trì ở 35°C, và Inertsil ODS-3 (2,1 $\times$ 50 mm, GL Sciences Inc.) được chạy trước với pha động là (CH₃CN/50 mM amoni axetat = 20/80). Tốc độ dòng của pha động là 0,25 ml/phút, lượng mẫu bơm là 4 μ l, và mẫu được bơm tự động lên cột bằng vòi phun tự động SIL-9A. TRA được phát hiện bằng bộ dò tế bào qua dòng chảy SPD-10A ở bước sóng hấp thụ là 230nm và được ghi bằng sắc ký EPC-500.

Thử nghiệm hấp thụ qua da *in vivo*

(Phương pháp thử nghiệm)

Các con chuột đực Wistar 7 tuần tuổi đã được xử lý trước cho thử nghiệm này bằng cách loại bỏ lông bụng của chúng và thông tĩnh mạch cổ (quy trình thông tĩnh mạch cổ được mô tả dưới đây). Ngày tiếp theo, thuốc mỡ (0,3g) được bôi lên các phần không có lông bằng dụng cụ được thể hiện trên hình 12. Dụng cụ này được tạo ra bằng tấm gốm silicon và giấy nhôm (được sản xuất bởi Nippon Foil Mfg. Co., Ltd.), tấm gốm silicon này được cắt thành hình tròn có đường kính ngoài là 24 mm và đường kính trong là 18 mm. Máu được thu từ tĩnh mạch cổ theo thời gian 0 đến 12 giờ sau khi bôi thuốc mỡ. Máu thu được được ly tâm (4°C, 15000 vòng/phút, 20 phút) để thu dịch nổi, và dịch nổi này được đo trong điều kiện HPLC của thử nghiệm *in vitro* được đề cập trên đây.

(Quy trình thông tĩnh mạch cổ)

Máu được thu từ chuột bằng quy trình thông tĩnh mạch cổ. Các con chuột được gây mê bằng somnopentyl (30 mg/kg, i.p.) để giữ chúng ở vị trí nằm ngửa, tạo một đường rạch trên da ở phần cổ khoảng 1,5cm ở bên phải, và các cơ riêng biệt bằng nhíp để bộc lộ tĩnh mạch cổ ngoài. Ống Phycon (SH No.00) được nạp heparin (10 IU/ml thuốc tiêm natri heparin) sau đó được đâm xuyên dưới da từ sau cổ qua ngoài cơ thể để nối với ống xi lanh. Tĩnh mạch cổ ngoài sau đó được nối lại bằng hai mũi khâu, một trong hai mũi khâu ở phía tim được kéo để cố định và chặn dòng máu và mũi khâu còn lại ở phía phần cổ được gắn chặt. Mạch máu được bộc lộ được tạo đường cắt bằng kéo và ống Phycon được luồn vào trong khoảng 3cm. Sau khi dòng máu trong ống được quan sát bằng ống xi lanh, mũi khâu ở phía tim được gắn chặt. Vị trí rạch được khâu lại. Sự thay đổi mức độ máu sau khi bôi thuốc mỡ được đánh giá mà không gây mê. Máu được lấy theo thời gian. Khoảng 0,2ml máu thu được được đặt trong ống nhỏ 0,5ml, và ly tâm bằng máy ly tâm (MX-200 TOMY) trong điều kiện 4°C, 20 phút, và 15000 vòng/phút. Dịch nổi thu được được phân tích về lượng thuốc bằng HPLC.

Thử nghiệm về sự tồn lưu trên da *in vivo*

(Phương pháp thử nghiệm)

Các con chuột đực Wistar 7 tuần tuổi đã được xử lý trước cho thử nghiệm này bằng cách loại bỏ lông bụng của chúng. Ngày tiếp theo, thuốc mỡ (0,3g) được bôi lên các phần không có lông bằng dụng cụ thể hiện dưới đây. Dụng cụ này được tạo ra bằng tấm gốm silicon và giấy nhôm (được sản xuất bởi Nippon Foil Mfg. Co., Ltd.), tấm gốm silicon này được cắt thành hình tròn có đường kính ngoài là 24 mm và đường kính trong là 18 mm. Mười hai giờ sau khi bôi thuốc mỡ, vùng da mà được bôi thuốc mỡ gel tranilast hoặc thuốc mỡ gel nano tranilast được lau 5 lần bằng bông thấm chứa nước muối để làm tróc lớp biểu bì của da. Sau đó, da không chứa mỡ được làm tróc. Da thu được được đặt trong ống nhỏ 0,5ml và làm đồng nhất bằng nước tinh sạch (500 µl). Dung dịch được làm đồng nhất sau đó được ly tâm bằng máy ly tâm trong điều kiện 4°C, 15000 vòng/phút, và 20 phút tạo ra dịch nổi, và dịch nổi này được đo trong điều kiện

HPLC của thử nghiệm *in vitro* được đề cập trên đây.

(Các kết quả)

Hình 15 thể hiện sự thay đổi theo thời gian của chứng phù chân chuột sau khi dùng thuốc, hình 16 thể hiện tính thấm của da chuột *in vitro* với thuốc mỡ gel tranilast sau khi dùng, hình 17 thể hiện mức tranilast trong máu sau khi dùng, và hình 18 thể hiện mức tranilast tồn lưu trên da sau khi dùng.

Kết quả trên hình 15 thể hiện rằng việc bôi dưới da thuốc mỡ gel chứa hạt nano tranilast ức chế mạnh chứng phù trong bệnh viêm khớp ở chuột do tá được trong mô hình chuột viêm khớp dạng thấp. Hiệu quả này không được ghi nhận ở thuốc mỡ chứa bột khối tranilast tương tự làm so sánh.

Kết quả trên hình 16 thể hiện rằng trong thuốc mỡ gel chứa 0,35 đến 0,75% tranilast, thuốc mỡ chứa hạt nano phân tán có tính thấm tốt hơn ở mỗi hàm lượng so với huyền phù chứa bột khối.

Kết quả trên hình 17 thể hiện rằng thuốc mỡ gel chứa nước chứa hạt nano tranilast có hệ số truyền cao hơn đáng kể trong máu so với thuốc mỡ gel chứa bột khối tranilast tương tự.

Kết quả trên hình 18 thể hiện rằng thuốc mỡ gel chứa nước chứa bột khối tranilast có mức tranilast ở da cao hơn thuốc mỡ gel chứa nước chứa hạt nano tranilast.

Mối tương quan đáp ứng liều được ghi nhận ở sự hấp thụ thuốc từ da chuột sau khi bôi thuốc mỡ gel chứa hạt nano tranilast.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất hạt nano hoặc chế phẩm chứa hạt nano, trong đó phương pháp này bao gồm:

Bước (1): hòa tan hợp chất được chọn từ xilostazol, tranilast, indometaxin, axemetaxin hoặc muối được dụng của chúng trong nước, dung môi chấp nhận được để sản xuất sản phẩm thuốc hoặc hỗn hợp của nó ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 150°C trong bình kín;

Bước (2): làm mát dung dịch thu được bằng nước để thu được huyền phù chứa tinh thể đồng nhất của hợp chất này, hoặc sau đó, phân tách để thu được tinh thể được phân tách; và

Bước (3): nghiền huyền phù thu được hoặc tinh thể được phân tách này.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó, huyền phù thu được trong bước (2) và huyền phù thu được này được nghiền trong bước (3) bằng quy trình nghiền trong nước.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tinh thể được phân tách thu được trong bước (2) và tinh thể được phân tách này được nghiền trong bước (3) bằng quy trình nghiền khô hoặc nghiền ướt.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kích thước hạt trung bình của hạt nano là 200nm hoặc nhỏ hơn.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó xyclodextrin, chất phân tán, và/hoặc chất trung hòa điện tích có trong dung môi hòa tan trong bước (1).

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó xyclodextrin là 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD), và/hoặc

chất phân tán là metylxenluloza được thể thấp, và/hoặc

chất trung hòa điện tích là Na docusat.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó xyclodextrin, chất phân tán, và/hoặc chất trung hòa điện tích được bổ sung trong

bước nghiền của bước (3).

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó xyclodextrin là 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD), và/hoặc

chất phân tán là metylxenluloza được thể thấp, và/hoặc

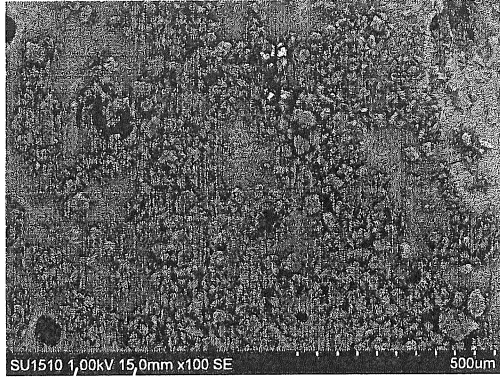
chất trung hòa điện tích là Na docusat.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó nhiệt độ trong bước (1) là 120°C đến 140°C.

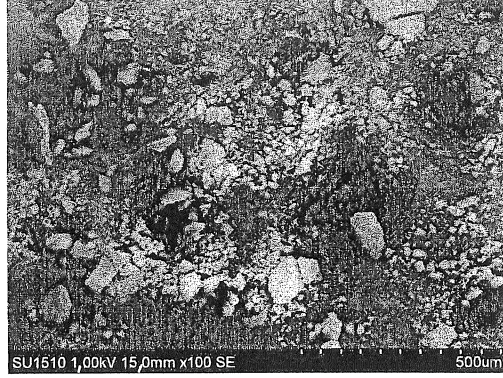
10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó hợp chất này là xilostazol hoặc muối dược dụng của nó.

CÁC HÌNH VẼ

[Hình 1]

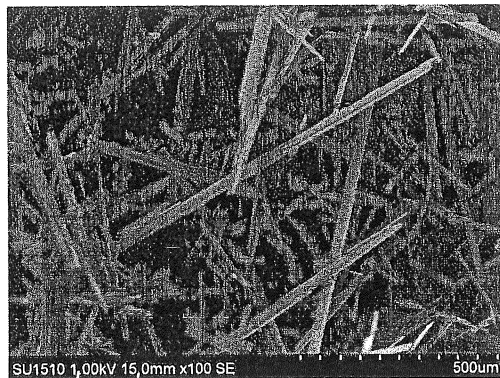


Bột khối CLZ

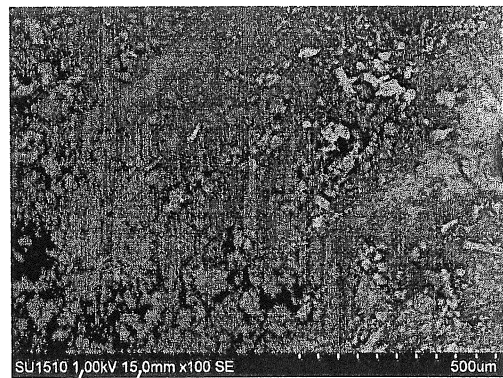


Bột khối CLZ sau khi nghiền

[Hình 2]



CLZ tái kết tinh từ dung môi nước

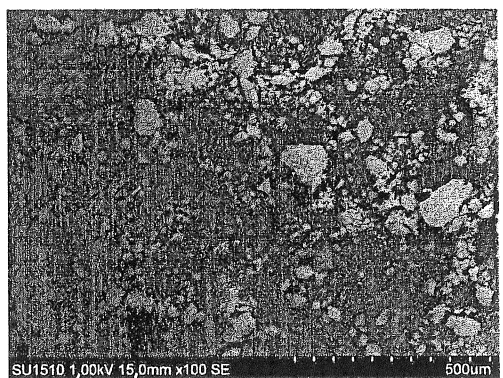


CLZ tái kết tinh từ dung môi nước sau khi nghiền

[Hình 3]

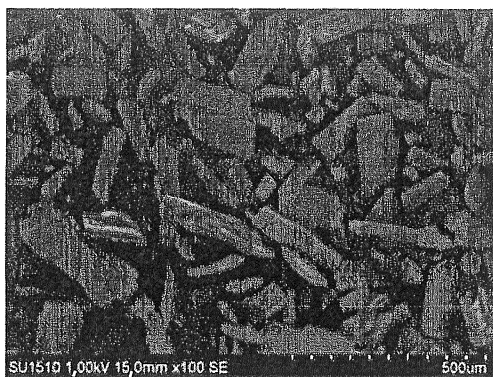


CLZ tái kết tinh từ dung môi etanol 50%

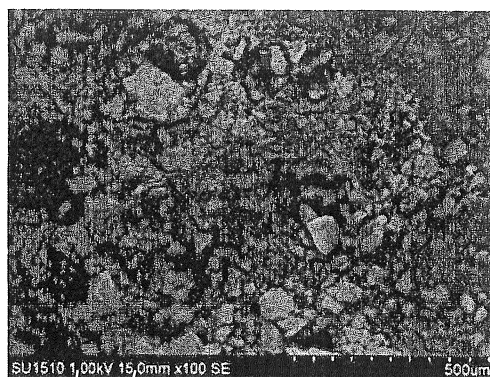


CLZ tái kết tinh từ dung môi etanol 50% sau khi nghiền

[Hình 4]

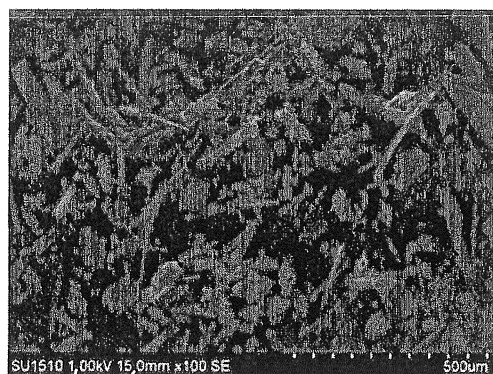


Bột khối TRA

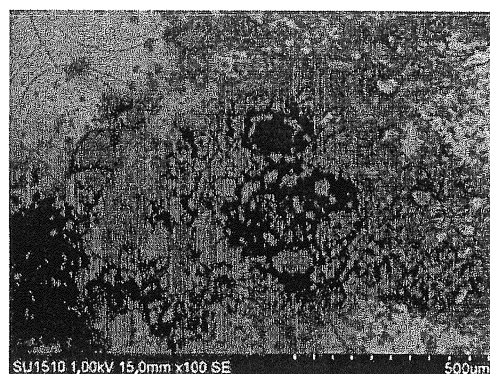


Bột khối TRA sau khi nghiền

[Hình 5]

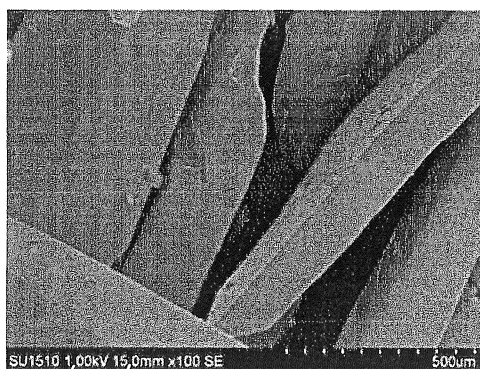


TRA tái kết tinh từ dung môi nước

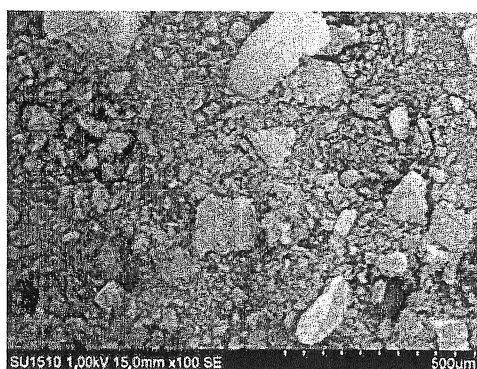


TRA tái kết tinh từ dung môi nước sau khi nghiền

[Hình 6]

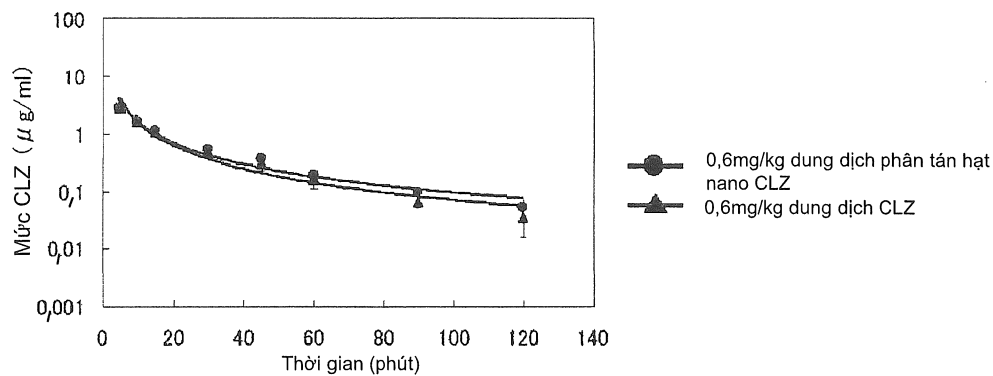


TRA tái kết tinh từ dung môi etanol 50%



TRA tái kết tinh từ dung môi etanol 50% sau khi nghiền

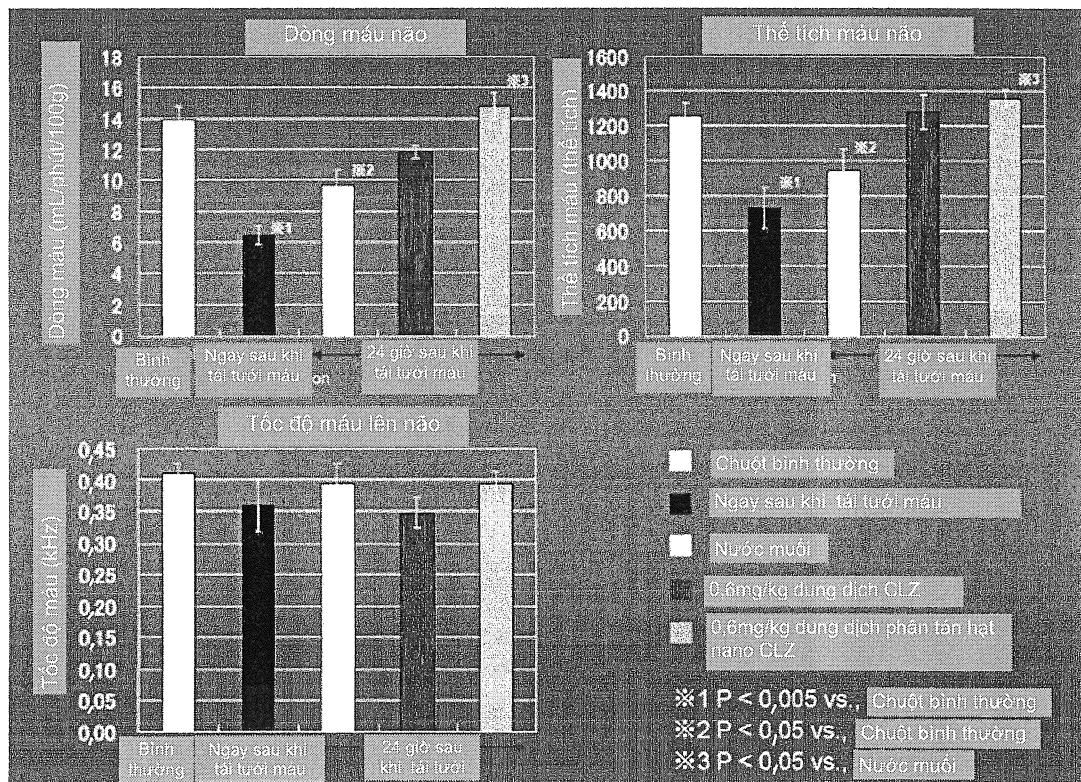
[Hình 7]



	Dung dịch	Hạt nano
A (μ g/ml)	3,866 ± 0,271	3,845 ± 0,813
α (phút ⁻¹)	0,163 ± 0,007	0,171 ± 0,004
B (μ g/ml)	1,274 ± 0,115	1,314 ± 0,102
β (phút ⁻¹)	0,034 ± 0,005	0,030 ± 0,002

$$C_p = A \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B \cdot e^{-\beta \cdot t}$$

[Hình 8]



[Hình 9]

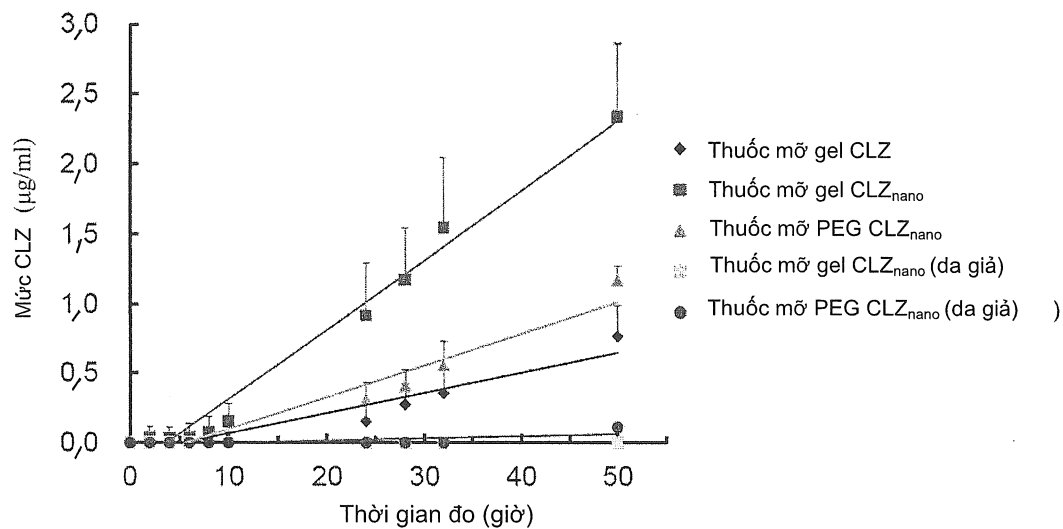
Rp.	Hàm lượng (%)						
	CLZ	HPC	Docu-Na	HP β CD	Carbopol 934	PEG 400	PEG 4000
Thuốc mỡ gel CLZ	0,5	-	-	5,0	1,5	-	-
Thuốc mỡ gel CLZ _{nano}	0,5	0,01	0,005	5,0	1,5	-	-
Thuốc mỡ PEG CLZ _{nano}	0,5	0,01	0,005	5,0	-	47,2	47,2

HPC: Hydroxypropyl xenluloza

Docu-Na: Natri di(2-etylhexyl)sulfosuccinat

HP β CD: Hydroxypropyl- β -xylodextrin

[Hình 10]



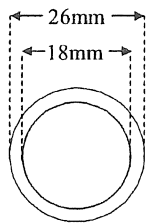
[Hình 11]

Rp.	J_c (ng/cm ² /h)	K_p ($\times 10^{-5}$ cm/h)	K_m ($\times 10^{-3}$)	τ (h)	D ($\times 10^{-4}$ cm ² /h)
Thuốc mỡ gel CLZ	104 $\pm$ 29,1	2.98 $\pm$ 0,83	13,7 $\pm$ 5,41	5,52 $\pm$ 1,95	1,83 $\pm$ 1,10
Thuốc mỡ gel CLZ _{nano}	306 $\pm$ 67,4 ^{*1,2}	8.76 $\pm$ 1,93	27,5 $\pm$ 13,4	3,75 $\pm$ 1,78	3,04 $\pm$ 2,33
Thuốc mỡ PEG CLZ _{nano}	160 $\pm$ 11,8	4.58 $\pm$ 0,34	22,2 $\pm$ 0,92	5,75 $\pm$ 0,64	1,47 $\pm$ 0,16

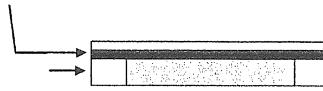
^{*1} $p < 0,005$, vs. Thuốc mỡ gel CLZ^{*2} $p < 0,05$, vs. CLZ_{nano} PEG

[Hình 12]

Tấm gôm silicon



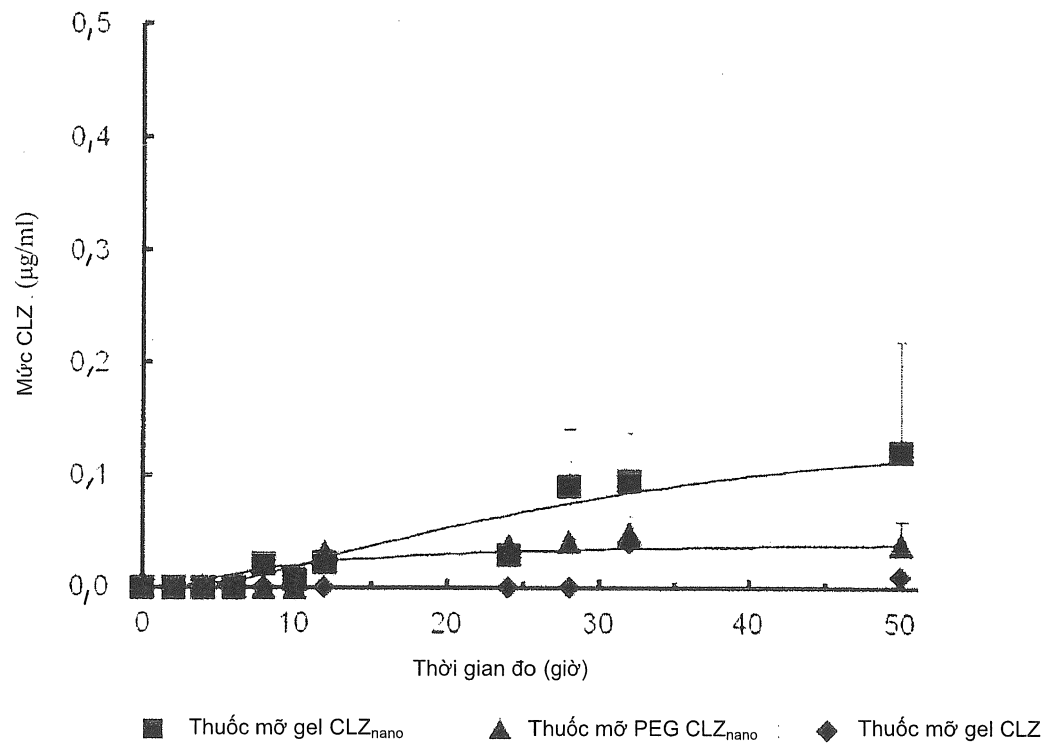
Lá nhôm

Tấm gôm silicon
(Độ dày 1mm)

Dải mặt kép

(Phần bóng biểu thị khoảng)

[Hình 13]



[Hình 14]

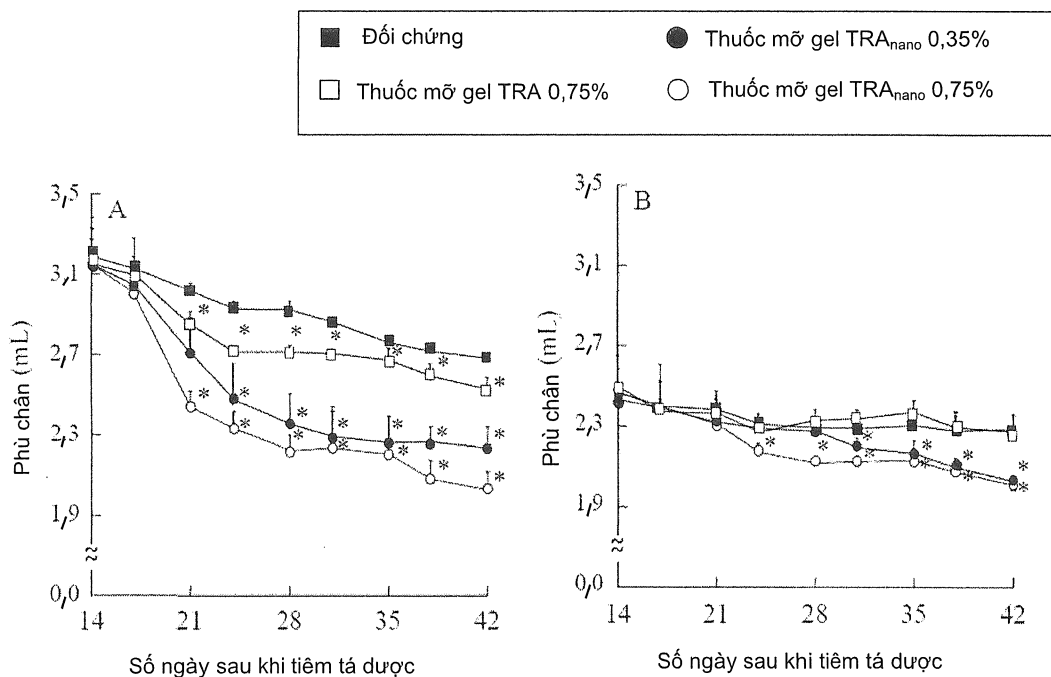
$$C_p = \frac{A \cdot k_a}{k_a - \alpha} e^{-\alpha(t-\tau)} + \frac{B \cdot k_a}{k_a - \beta} e^{-\beta(t-\tau)} - \left(\frac{A \cdot k_a}{k_a - \alpha} + \frac{B \cdot k_a}{k_a - \beta} \right) e^{-k_a(t-\tau)}$$

α : 0,163 (từ kết quả dùng qua đường i.v. dung dịch CLZ)

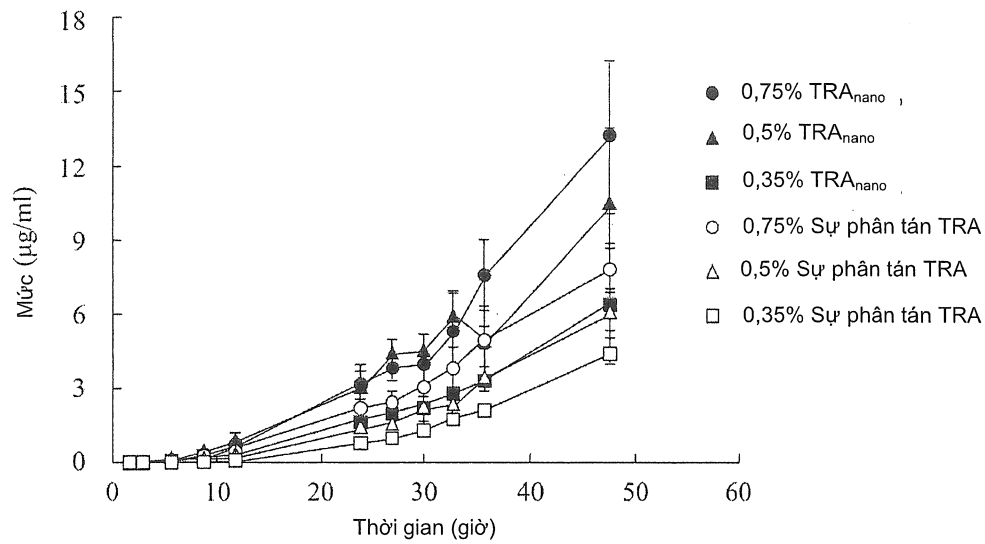
β : 0,034 (từ kết quả dùng qua đường i.v. dung dịch CLZ)

	k_a ($\times 10^{-3}/h$)	A ($\mu g/mL$)	B ($\mu g/mL$)	τ (h)
Thuốc mỡ gel CLZ _{nano}	$11,7 \pm 4,1^{1,3}$	$8,06 \pm 1,14$	$4,99 \pm 1,30$	$2,66 \pm 1,09$
Thuốc mỡ PEG CLZ _{nano}	$7,1 \pm 0,2^{2,3}$	$4,58 \pm 0,28$	$3,81 \pm 0,47$	$2,67 \pm 0,55$
Thuốc mỡ gel CLZ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

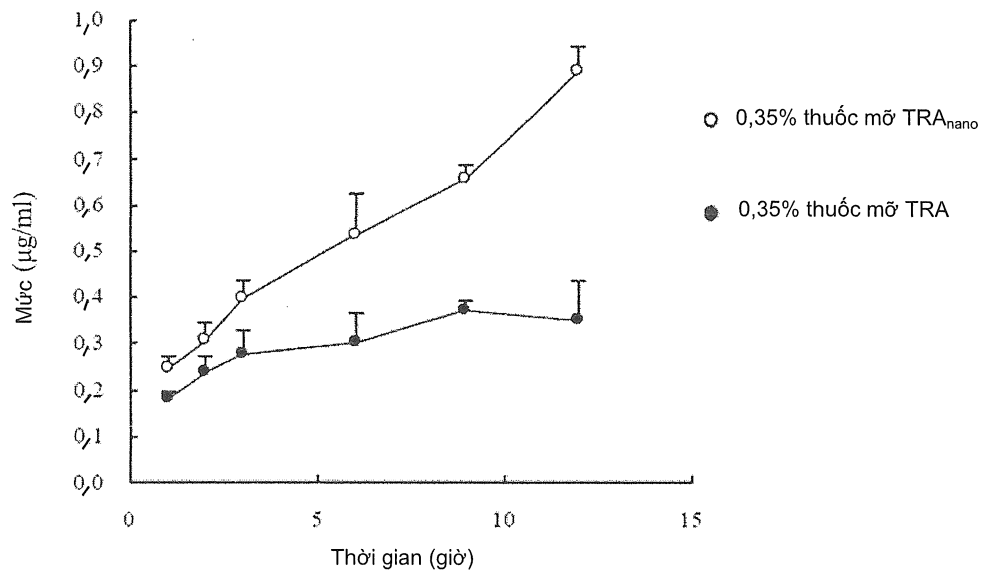
[Hình 15]



[Hình 16]



[Hình 17]



[Hình 18]

