



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

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

(11)



**2-0002563**

(51)<sup>7</sup> **A61K 31/14; A61K 9/00**

(13) **Y**

---

(21) 2-2017-00269

(22) 31/08/2017

(45) 25/02/2021 395

(43) 25/03/2019 372A

(73) Lê Quang Huấn (VN)

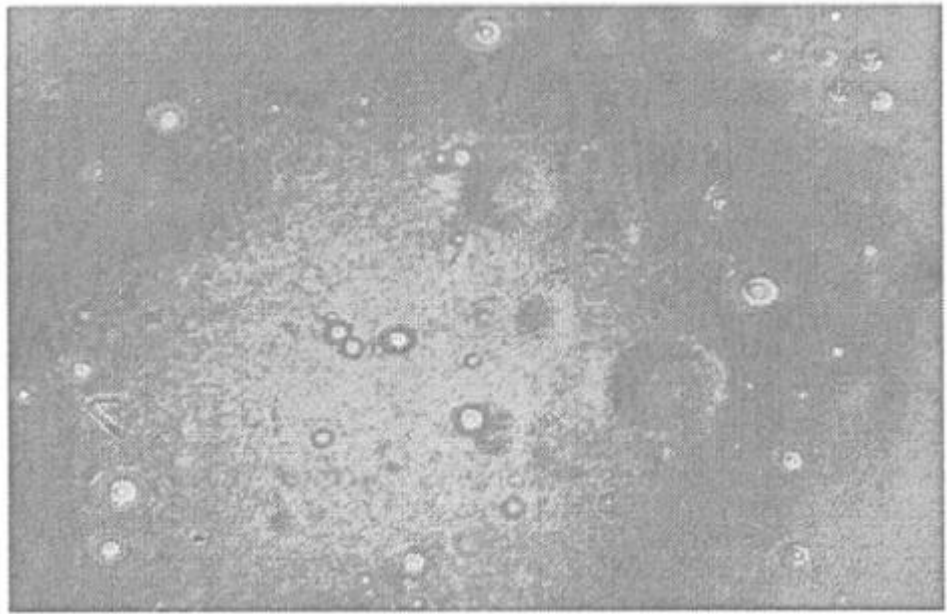
Số 8, ngõ 87, tổ 20 phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

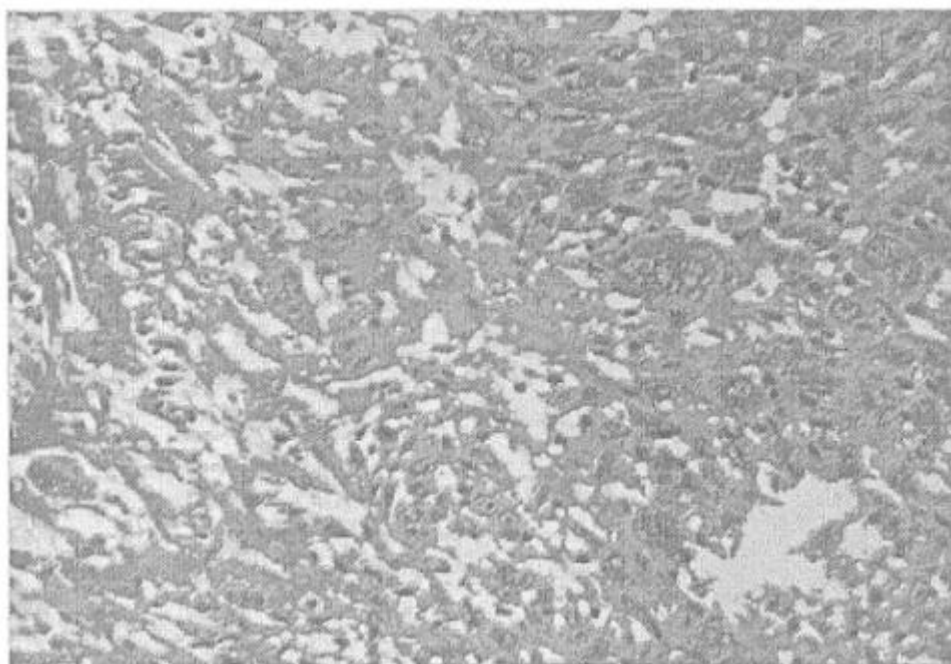
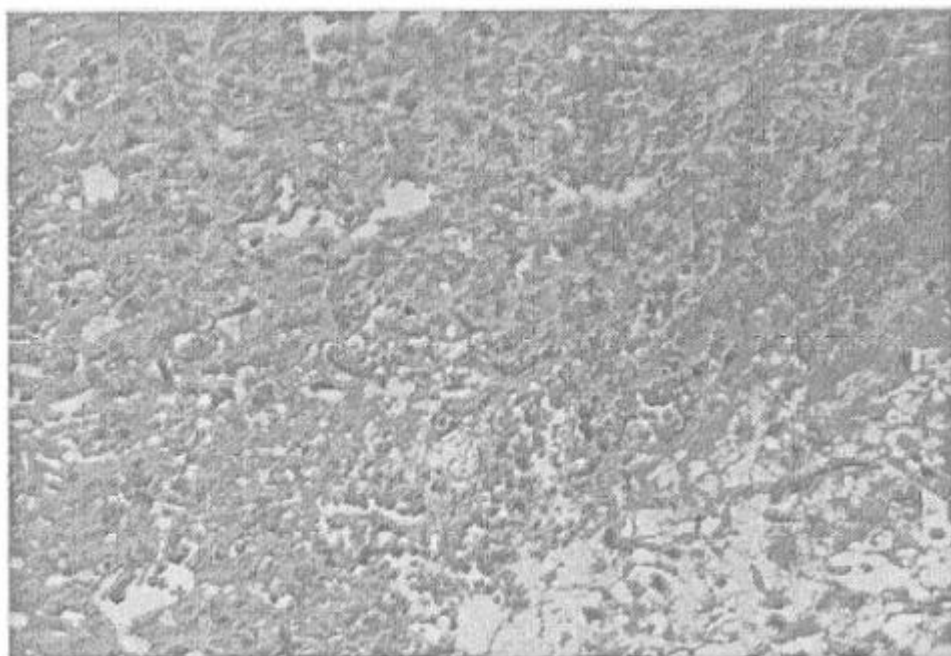
(72) Lê Quang Huấn (VN); Đái Duy Ban (VN).

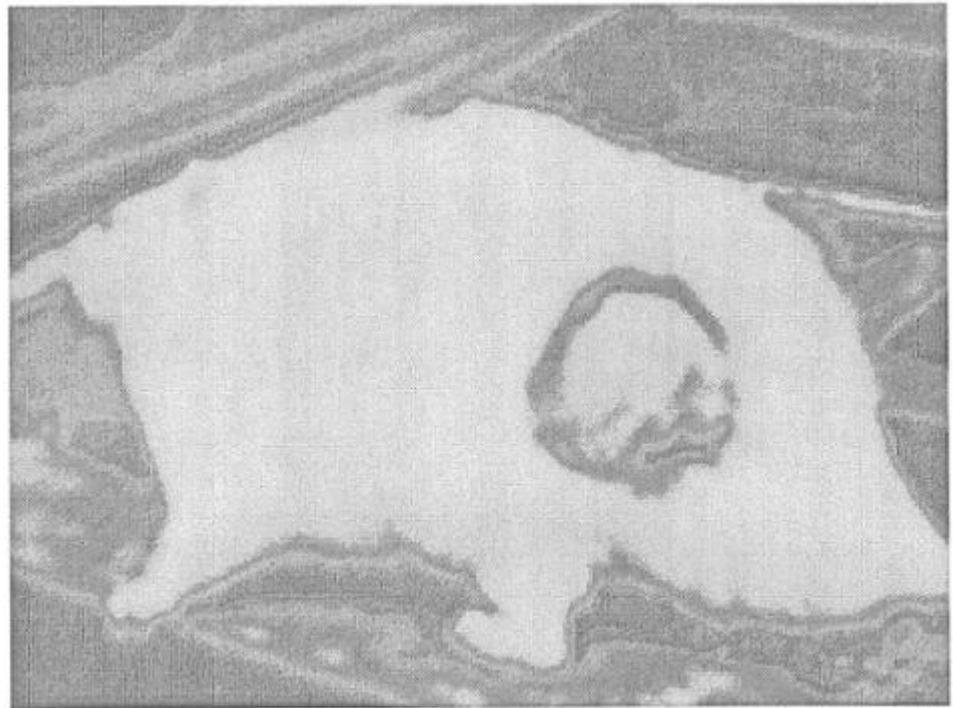
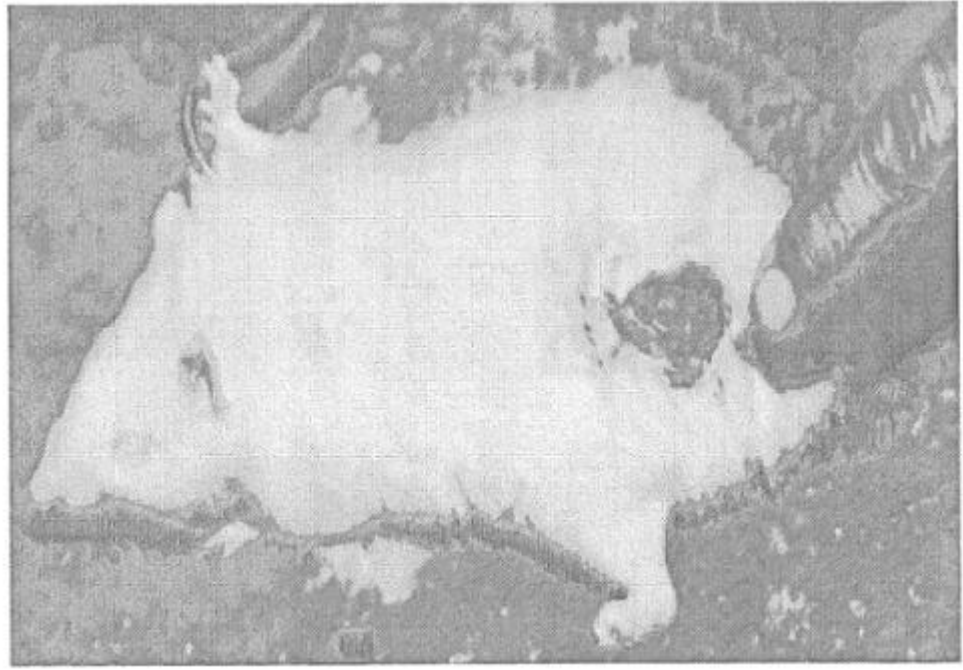
---

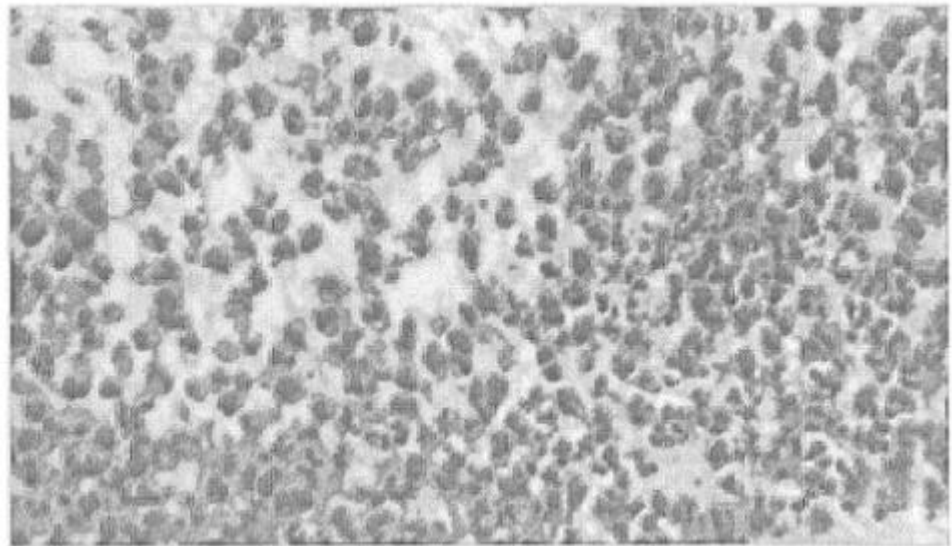
(54) **CHẾ PHẨM LIPOSOM ĐÓNG GÓI ARTEMISININ VÀ ASPIRIN ĐỂ ĐIỀU TRỊ KHỐI U**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm liposom đóng gói hai hoạt chất là artemisinin từ cây thanh hao hoa vàng và aspirin để điều trị khối u. Chế phẩm theo giải pháp hữu ích bao gồm 30% L- $\alpha$ -phosphatidylcholin, 10% cholesterol, 30% artemisinin, 28% aspirin và 2% tá dược, trong đó artemisinin, aspirin và tá dược được đóng gói trong cấu trúc liposom bao gồm 30% L- $\alpha$ -phosphatidylcholin và 10% cholesterol. Chế phẩm liposom theo giải pháp hữu ích có hiệu quả trong việc tiêu khối u, thích hợp để điều trị bệnh ung thư.









### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ y sinh, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm liposom để tăng cường phân phối sinh học và độ sinh khả dụng của dược chất ateminsinin và aspirin để điều trị khối u.

### Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Ung thư là một căn bệnh mà cơ chế kiểm soát sự phân chia bình thường trong tế bào bị rối loạn. Các tế bào sinh sôi nảy nở không bình thường tạo thành một nhóm tế bào di căn vào các mô ngoại vi hay cơ quan nội tạng khác từ một vị trí ban đầu, từ đó làm mất chức năng bình thường, gây rối loạn hoạt động hóa sinh của cơ thể dẫn đến tử vong. Có nhiều phương pháp nhằm phát triển và đưa thuốc tiêu diệt đặc hiệu các khối u nhằm điều trị triệt để bệnh ung thư. Tuy nhiên, hiện vẫn gặp nhiều hạn chế trong việc phát triển các thuốc đặc hiệu, trong đó khó khăn thứ nhất là cần phát triển được các dược chất đặc hiệu với khối u và khó khăn thứ hai là vận chuyển được dược chất này đến được tế bào đích.

Đã biết một số phương pháp nhằm loại bỏ tác dụng phụ của dược chất, trong đó, đã biết một số phương pháp đóng gói các thuốc sử dụng trong hóa trị liệu trong các hệ dẫn thuốc hướng đích thụ động (trong liposom, các mixel) hoặc hướng đích thụ động là các hệ hướng đích thụ động có gắn thêm các yếu tố nhận biết các tế bào ung thư (xem tài liệu: Kim Thach Nguyen, Thu Ha Nguyen, Dinh Ho Do and Quang Huan Le, (2016). Characterization of the paclitaxel loaded chitosan graft Pluronic F127 copolymer micelles conjugate with a DNA aptamer targeting HER-2 overexpressing breast cancer cells. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.*; Thi Thuy Duong Le, Thu Hong Pham, Trong Nghia Nguyen, Thi Hong Giang Ngo, Thi My Nhung Hoang and Quang Huan Le, (2016). Evaluation of anti-HER2 scFv-conjugated PLGA-PEG nanoparticles on 3D tumor spheroids of BT474 and HCT116 cancer cells. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* 7: 025004).

Trong các hệ dẫn thuốc, liposom là hệ dẫn thuốc được nghiên cứu sớm nhất và được các nhà nghiên cứu đặc biệt quan tâm do chúng có những ưu điểm nhất định. Liposom là những tiểu phân tử hình cầu có kích thước nano, có lõi chứa các hoạt chất

dinh dưỡng, được bao bọc phía ngoài bởi một hoặc nhiều lớp màng phospholipit kép. Liposom được xem là một hệ vận chuyển lý tưởng với khả năng chứa; bảo vệ; vận chuyển và giải phóng những hoạt chất dinh dưỡng vào những vị trí mong muốn trong cơ thể một cách chính xác và đúng liều lượng.

Liposom đã được nghiên cứu rộng rãi để vận chuyển thuốc và thực phẩm chức năng có độ hòa tan nước kém thông qua sự cải thiện tính ổn định, hiệu quả lâm sàng và sinh khả dụng của chúng (xem tài liệu: Brandl M, (2001). Liposoms as drug carriers: a technological approach. *Biotechnol. Annu Rev.* 7, 59–85; Lazar AN, Mourtas S, Youssef I, Parizot C, Dauphin A, Delatour B, Antimisiaris SG, Duyckaerts C, (2013). Curcumin-conjugated nanoliposomes with high affinity for A $\beta$  deposits: possible applications to Alzheimer disease. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 9, 712–721; Li L, Ahmed B, Mehta K, Kurzrock R, (2007). Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer. *Mol. Cancer Ther.* 6, 1276–1282; Saul JM, Annapragada A, Natarajan JV, Bellamkonda RV, (2003). Controlled targeting of liposomal doxorubicin via the folate receptor in vitro. *Journal Controlled Release*, 92, 49–67). Giống như các túi hình cầu gồm hai lớp màng, liposom có thể mang cả chất ưa nước bằng cách đóng gói trong pha nước và các chất kỵ nước bằng cách tương tác chèn vào các vùng kỵ nước. Ngay cả các chất kỵ nước có thể được hình thành ở trạng thái ổn định trong môi trường nước do sự phân tán cao trong hệ liposom. Hơn nữa, các chất được đóng gói trong liposom có thể xâm nhập và vượt qua các rào cản sinh học một cách hiệu quả để xâm nhập vào tế bào và mô vì liposom có một sự tương tự cấu trúc như màng tế bào (xem tài liệu, Brandl M, (2001). Liposoms as drug carriers: a technological approach. *Biotechnol. Annu Rev.* 7, 59–85).

Liposom được ứng dụng nhiều trong lĩnh vực bào chế thuốc nhờ 4 tính năng: hòa tan hiệu quả các khoáng chất khó tan như sắt, magie, kẽm, v.v.; tăng khả năng hấp thu của màng tế bào với hoạt chất; giảm thiểu tác dụng phụ của thuốc điều trị ung thư với cơ thể; cung cấp phospholipit giúp bảo vệ dạ dày, tá tràng khỏi viêm loét.

Trong y học, có nhiều loại thuốc mà khoảng cách từ liều “điều trị hiệu quả” đến liều “gây độc” khá gần nhau. Với các loại thuốc này, việc tăng liều cho bệnh nhân khá nguy hiểm. Thách thức đặt ra với các nhà khoa học, là tìm cách nâng cao hiệu quả của

thuốc mà không phải tăng liều điều trị, thậm chí còn giảm liều để bảo vệ sức khoẻ bệnh nhân.

Liposom có thể được sử dụng như các chất mang các dược phẩm và các sản phẩm khác. Ví dụ, các hợp chất hòa tan có thể được đóng gói trong môi trường nước của liposom; trong khi các hợp chất không hòa tan có thể được kết hợp vào lớp lipid kép của liposom. Sản phẩm liposom có thể được sử dụng bằng nhiều cách khác nhau. Ví dụ, dược phẩm liposom có thể tiêm vào tĩnh mạch; vaccin liposom có thể được tiêm vào da; dược phẩm liposom có thể được uống; và mỹ phẩm liposom có thể được sử dụng dưới dạng kem xoa tại chỗ. Liposom đã được công nhận là chất mang an toàn và hiệu quả cho nhiều loại sản phẩm khác nhau.

Các đặc tính của liposom chịu ảnh hưởng bởi thành phần hoá học của các thành phần được sử dụng để tạo liposom. Các yếu tố quan trọng nhất là sự lựa chọn và thành phần lipid được sử dụng, và phương pháp cụ thể được sử dụng để chuẩn bị liposom. Ví dụ, việc lựa chọn các phospholipid hydro hóa với nhiệt độ chuyển tiếp cao thường sản sinh liposom ổn định hơn so với liposom được điều chế bằng các phospholipid không bão hòa.

Liposom đã được sử dụng thành công trong việc vận chuyển các chất chống ung thư. Các liposom vận chuyển doxorubicin (Myocet, Doxil) và daunorubicin (DaunoXome) đã được phê duyệt của Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) cho sử dụng lâm sàng. Phát triển các công thức liposomal cho các tác nhân chống ung thư rất quan tâm đến nghiên cứu vì họ có lợi thế nhất định.

Hợp chất artemisinin đã được chiết từ cây thanh hao hoa vàng *Artemisia annua* L thuộc họ Asteriaceae và đã được chứng minh là có tác dụng kháng siêu vi khuẩn, ức chế sự phát triển của nhiều loài vi khuẩn, ngăn ngừa ung thư và gây ra khả năng tự hủy của nhiều loại tế bào. Hoạt chất này đã được sử dụng để tạo thuốc chống sốt rét, và gần đây một số nghiên cứu đã chứng minh khả năng sử dụng artemisinin để điều trị bệnh ung thư. Tuy nhiên, artemisinin lại có độ sinh khả dụng kém do độ hòa tan thấp cả trong môi trường nước và dầu. Artemisinin có hiệu ứng bùng nổ ban đầu và nồng độ đỉnh trong huyết tương cao, nhưng nó nhanh chóng bị chuyển hóa trong cơ thể (xem tài liệu: Chen Y, Xianfu L, Hyunjin P, Greever R, (2009). Study of artemisinin nanocapsules as anticancer drug delivery systems, *Nanomedicine* 5, pp. 316–322).



Ngoài ra, artemisinin không ổn định và dễ phân hủy do dễ mở vòng lacton (xem tài liệu: Klaiman DL, (1985). Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China, Science 228, pp.1049–1055).

Aspirin đã được biết đến rộng rãi là hợp chất có tác dụng hạ sốt và giảm đau. Aspirin là một salicylat và là thuốc kháng viêm không steroid (NSAID). Aspirin hoạt động bằng cách ngăn chặn một loại vật chất tự nhiên trong cơ thể của bạn để giảm đau và sưng. Đã có nghiên cứu chỉ ra rằng người dùng aspirin hàng ngày có tỷ lệ ung thư đại trực tràng thấp hơn. Các nghiên cứu cho thấy đối với người sử dụng aspirin thường xuyên sẽ làm giảm nguy cơ phát triển cả ung thư đại trực tràng và thực quản tương ứng là 19% và 15% (Xem tài liệu: Vilar E, Maresso KC, Hawk ET, et al. Aspirin for Cancer Prevention: One Step Closer. JAMA Oncol. 2016; 2(6): 770-771; Movahedi M, Bishop DT, Macrae F, et al. Obesity, Aspirin, and Risk of Colorectal Cancer in Carriers of Hereditary Colorectal Cancer: A Prospective Investigation in the CAPP2 Study (August 17, 2015). J Clin Oncol. doi: 10.1200/JCO.2014.58.9952).

Do nhu cầu tạo ra các loại thuốc mới có khả năng điều trị khối u, tuy nhiên, việc sử dụng các hoạt chất như artemisinin và aspirin không cho hiệu quả điều trị khối u mong muốn. Có nhiều vấn đề cần giải quyết nhằm đưa các chất này đến tế bào đích vì chúng không tan trong nước, nên tính khả dụng sinh học thấp. Hơn nữa chúng lại nhanh chóng bị phân rã trong đường tiêu hóa hoặc trong đường tuần hoàn dưới tác động của các enzyme hoặc điều kiện axit mạnh trong dạ dày, trong ruột. Vì vậy chúng nhanh chóng bị đào thải do đó hiệu quả điều trị thấp.

Do đó, cần có phương thức nhằm tạo ra chế phẩm có hiệu quả điều trị và giải quyết được các vấn đề về tính sinh khả dụng nhằm cải thiện và tăng cường đặc tính của các hoạt chất trên để điều trị khối u.

#### **Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

Để giải quyết vấn đề nêu trên đối với các hoạt chất có hoạt tính sinh học, nhưng dễ bị phân rã và đào thải, giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm liposom với cấu trúc lớp lipit kép bọc hoạt chất nhằm tăng cường hiệu quả điều trị bệnh.

Theo đó, giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm liposom để điều trị khối u bao gồm 30% L- $\alpha$ -phosphatidylcholin, 10% cholesterol, 30% artemisinin, 28% aspirin và 2% tá

được, trong đó artemisinin, aspirin và tá dược được đóng gói trong cấu trúc liposom bao gồm 30% L- $\alpha$ -phosphatidylcholin và 10% cholesterol.

Theo một phương án, chế phẩm theo giải pháp hữu ích được phân tán trong môi trường nước tạo cấu trúc liposom với lớp lipit kép bao gồm L- $\alpha$ -phosphatidylcholin và cholesterol bọc artemisinin, aspirin và tá dược ở dạng hạt vi cầu ổn định có kích thước từ 150 đến 200 nm.

Theo một phương án ưu tiên, tá dược trong chế phẩm liposom theo giải pháp hữu ích là nước muối sinh lý hoặc nước cất khử ion.

Chế phẩm theo giải pháp hữu ích là thích hợp để kháng vi khuẩn, ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn và có khả năng gây ra sự tự hủy của nhiều loại tế bào ung thư.

#### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Hình 1 là ảnh chụp mẫu chế phẩm liposom L- $\alpha$ -phosphatidylcholin chứa artemisinin và aspirin theo giải pháp hữu ích bằng kính hiển vi điện tử quét độ phân giải cao (FESEM, S4800-Hitachi) tích hợp bộ phân tích phổ tán xạ năng lượng tia X (Emax-Horiba).

Hình 2 là ảnh chụp mẫu chuột thử nghiệm được tạo khối u trước khi thử nghiệm với chế phẩm liposom theo giải pháp hữu ích.

Hình 3 và Hình 4 là ảnh chụp giải phẫu mô bệnh học của khối u được tạo được trên chuột, trong đó cho thấy có nhiều tế bào ung thư dạng fibrosarcoma với kích thước khác nhau, nhân kiềm tính nằm trong tổ chức liên kết.

Hình 5 là ảnh chụp sự tiêu biến của khối u của chuột sau khi sử dụng chế phẩm liposom sau 15 ngày.

Hình 6 là ảnh chụp sự tiêu biến của khối u của chuột sau khi sử dụng chế phẩm liposom sau 20 ngày.

Hình 7 là ảnh chụp sự tiêu biến của khối u của chuột sau khi sử dụng chế phẩm liposom sau 25 ngày.

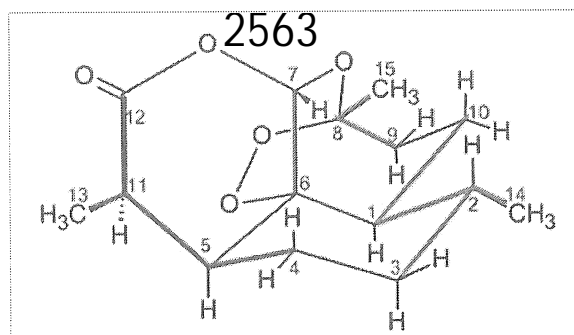
Hình 8 là ảnh chụp giải phẫu mô sau khi điều trị bằng chế phẩm liposom sau 25 ngày, kết quả cho thấy không còn tế bào ung thư.

#### **Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích**

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các phương án và các ví dụ thực hiện, tuy nhiên, các phương án và các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa để làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

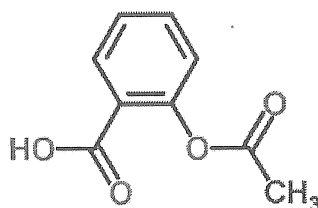
Hợp chất artemisinin được sử dụng theo giải pháp hữu ích là hoạt chất được chiết từ cây thanh hao hoa vàng *Artemisia annua* L thuộc họ Asteriaceae và đã được chứng minh là có tác dụng kháng siêu vi khuẩn, ức chế sự phát triển của nhiều loài vi khuẩn, ngăn ngừa ung thư và gây ra khả năng tự hủy của nhiều loại tế bào. Hoạt chất này đã được sử dụng để tạo thuốc chống sốt rét, và gần đây một số nghiên cứu đã chứng minh khả năng sử dụng artemisinin để điều trị ung thư. Tuy nhiên, artemisinin lại có độ sinh khả dụng kém do độ hòa tan thấp cả trong môi trường nước và dầu. Artemisinin có hiệu ứng bùng nổ ban đầu và nồng độ đỉnh trong huyết tương cao, nhưng nó nhanh chóng bị chuyển hóa trong cơ thể (xem tài liệu: Chen Y, Xianfu L, Hyunjin P, Greever R, (2009). Study of artemisinin nanocapsules as anticancer drug delivery systems, *Nanomedicine* 5, pp. 316–322). Ngoài ra, artemisinin không ổn định và dễ phân hủy do dễ mở vòng lacton (xem tài liệu: Klaiman DL, (1985). Quinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China, *Science* 228, pp.1049–1055).

Artemisinin có công thức cấu tạo  $C_{15}H_{22}O_5$  và là hợp chất đã được nghiên cứu kỹ lưỡng về mặt tiền lâm sàng và lâm sàng trong hai thập kỷ gần đây. Artemisinin và các dẫn xuất của nó cho thấy tác dụng chống ung. Cơ chế tác dụng của artemisinin là tiêu diệt ký sinh trùng sốt rét thể vô tính trong hồng cầu, giai đoạn ký sinh trùng sốt rét huỷ diệt hồng cầu, gây phản ứng rét run ở người bệnh, theo đó cầu “peroxit nội” của artemisinin kết hợp với sắt có nhiều trong hồng cầu tạo ra gốc tự do. Gốc tự do mới này có tác dụng đặc hiệu đối với protit và lipid của ký sinh trùng sốt rét. Theo nguyên lý này, artemisinin tác dụng lên bề mặt tế bào khối u, vốn có hàm lượng sắt cao trên bề mặt, và phá hủy tế bào khối u một cách đặc hiệu. Trong điều trị bệnh ung thư vú, artemisinin đã được sử dụng với muối sắt (sắt sulfat hoặc sắt citrat) tiêu diệt tế bào ung thư mà không độc với tế bào lành.



Artemisinin,  $C_{15}H_{22}O_5$

Aspirin đã được biết đến rộng rãi là hợp chất có tác dụng hạ sốt và giảm đau. Aspirin là một salicylat và là thuốc kháng viêm không steroid (NSAID). Aspirin hoạt động bằng cách ngăn chặn một loại vật chất tự nhiên trong cơ thể của bạn để giảm đau và sưng. Đã có nghiên cứu chỉ ra rằng người dùng aspirin hàng ngày có tỷ lệ ung thư đại trực tràng thấp hơn. Các nghiên cứu cho thấy đối với người sử dụng aspirin thường xuyên sẽ làm giảm nguy cơ phát triển cả ung thư đại trực tràng và thực quản tương ứng là 19% và 15% (Xem tài liệu: Vilar E, Maresso KC, Hawk ET, et al. Aspirin for Cancer Prevention: One Step Closer. JAMA Oncol. 2016; 2(6): 770-771; Movahedi M, Bishop DT, Macrae F, et al. Obesity, Aspirin, and Risk of Colorectal Cancer in Carriers of Hereditary Colorectal Cancer: A Prospective Investigation in the CAPP2 Study (August 17, 2015). J Clin Oncol. doi: 10.1200/JCO.2014.58.9952).



Aspirin

Aspirin ngay cả khi liều thấp cũng được biết là làm giảm các tế bào tiểu cầu do đó làm giảm được máu đông. Các tiểu cầu đã có chứng minh cho phép tế bào ung thư di chuyển (trợ giúp tế bào ung thư di chuyển) trong hệ tuần hoàn mà không bị phát hiện và tiêu diệt bởi các tế bào miễn dịch. Vì vậy, việc loại bỏ hoặc giảm số lượng tiểu cầu bằng aspirin sẽ giúp các tế bào miễn dịch phát hiện và tiêu diệt các tế bào ung thư.

Tuy nhiên, chưa có một tài liệu nào đề cập đến việc sử dụng aspirin và artemisinin để điều trị khối u. Một phần do artemisinin không đủ bền để tồn tại trong cơ thể đến khi tiếp cận và tác động lên khối u và chưa có cơ chế có thể đưa artemisinin

thâm nhập vào tế bào khối u một cách hiệu quả. Ngoài ra, aspirin chỉ có tác dụng tiêu diệt tế bào ung thư với liều cao, ở liều thấp chúng chỉ có tác dụng giảm đau, chống viêm.

Các tác giả đã bất ngờ phát hiện ra rằng, bằng cách kết hợp aspirin với artemisinin, hỗn hợp này thể hiện khả năng tiêu diệt tế bào khối u hiệu quả. Tuy nhiên, khi thử nghiệm trên cơ thể, chúng lại nhanh chóng bị đào thải và không thể hiện được hiệu quả hiệp đồng trong việc tiêu diệt khối u. Một phần lớn aspirin được đào thải nhanh chóng và artemisinin bị phân cắt trước khi tiếp cận được với khối u.

Theo đó, giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm liposom để điều trị khối u, chế phẩm này bao gồm 30% L- $\alpha$ -phosphatidylcholin, 10% cholesterol, 30% artemisinin, 28% aspirin và 2% tá dược. Trong đó các thành phần artemisinin, aspirin và tá dược được đóng gói trong cấu trúc liposom bao gồm L- $\alpha$ -phosphatidylcholin và cholesterol.

Để tạo ra chế phẩm theo giải pháp hữu ích, L- $\alpha$ -phosphatidylcholin và cholesterol thu được bằng cách hòa tan lòng đỏ trứng gà trong dung môi bao gồm cloroform/metanol (tỷ lệ 2:1) theo tỷ lệ lòng đỏ trứng gà/dung môi là 1/5 (thể tích/thể tích). Sau khi khuấy để thu được dung dịch đồng nhất, dung dịch này được ly tâm tách lớp thu phân lớp cloroform. Sau khi rửa bằng dung dịch KCl, ly tâm thu phân lớp cloroform, sau khi loại bỏ dung môi, thu được phần lipit chứa L- $\alpha$ -phosphatidylcholin và cholesterol theo tỷ lệ 3:1.

Phần lipit này được sử dụng để tạo cấu trúc màng lipit kép bao hoạt chất theo giải pháp hữu ích. Theo đó, phần lipit chứa L- $\alpha$ -phosphatidylcholin và cholesterol được hòa trong dung môi cloroform, tiếp đó bổ sung artemisinin và aspirin theo tỷ lệ xác định ở trên và khuấy đều trong 10 phút. Sau đó, hỗn hợp này được loại kiệt dung môi thu được màng lipit khô. Màng lipit này được hòa tan trong dung môi là dung dịch nước muối sinh lý hoá trong điều kiện siêu âm. Dung môi này đóng vai trò tá dược giúp ổn định chế phẩm. Dung dịch thu được này được ép qua màng lọc kích thước từ 120 đến 200 nm thu được chế phẩm liposom với lớp lipit kép bao gồm L- $\alpha$ -phosphatidylcholin và cholesterol đóng gói artemisinin, aspirin và tá dược ở dạng hạt vi cầu ổn định có kích thước từ 150 đến 200 nm.

#### **Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích**

##### ***Ví dụ 1: Sản xuất chế phẩm liposom đóng gói artemisinin và aspirin***

Lấy 100 g lòng đỏ trứng gà và hòa tan trong 500 ml dung dịch là phức hợp cloroform/metanol (tỷ lệ 2:1), khuấy đều trong 5 phút để thu được dung dịch đồng nhất. Tiến hành ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút, thu phân lớp cloroform. Tiếp đến bổ sung dung dịch KCl 10% theo tỷ lệ 1:1 và ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút thu phân lớp cloroform. Tiếp đó cho phần dung môi này vào thiết bị cô chân không để loại dung môi thu được lớp màng lipit chứa L- $\alpha$ -phosphatidylcholin và cholesterol. Lớp màng lipit này được kiểm tra thành phần. Kết quả cho thấy màng lipit này chứa L- $\alpha$ -phosphatidylcholin và cholesterol theo tỷ lệ 3:1.

Tiếp đến, hòa tan 30 mg artemisinin được chiết từ cây thanh hao hoa vàng với 30 ml cloroform và hòa tan 28 mg aspirin với 30 ml cloroform, sau khi phối trộn hai dung dịch này, bổ sung 40 mg màng lipit thu được ở trên và khuấy mạnh trong 10 phút. Sau đó, tiến hành loại kiệt từ từ dung môi này trong điều kiện áp suất giảm thu được màng lipit chứa hoạt chất artemisinin và aspirin. Màng lipit này được hòa tan vừa đủ trong 2 ml nước muối sinh lý trong điều kiện siêu âm với tần số 40 kHz trong 10 phút. Tiếp đó dung dịch này được ép nhanh qua màng lọc kích thước khoảng 120 nm trong điều kiện siêu âm thu được chế phẩm liposom với lớp lipit kép bao gồm L- $\alpha$ -phosphatidylcholin và cholesterol đóng gói artemisinin và aspirin ở dạng hạt vi cầu ổn định có kích thước khoảng 150 nm.

Chế phẩm thu được này được kiểm tra bằng cách chụp trên kính hiển vi điện tử quét độ phân giải cao (FESEM, S4800-Hitachi) tích hợp bộ phân tích phổ tán xạ năng lượng tia X (Emax-Horiba) (Hình 1). Kết quả cho thấy chế phẩm liposom thu được có dạng các hạt vi cầu có kích thước ổn định, các hoạt chất được bao trong màng lipit kép.

#### *Ví dụ 2: Thử độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của chế phẩm liposom*

Để đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của chế phẩm liposom thu được từ Ví dụ 1, tiến hành thử nghiệm độc tính trên chuột nhắt chủng Swiss, giống đực có trọng lượng từ 18 đến 22 g/con.

Chế phẩm thu được theo Ví dụ 1 được pha loãng với nước muối sinh lý đến nồng độ 10% được sử dụng để thử nghiệm, đối chứng sử dụng giả dược là nước muối sinh lý.

Đánh giá độc tính cấp:

Chuột được chia ngẫu nhiên thành 10 lô, mỗi lô 10 con, lô thử nghiệm, mỗi con được tiêm vào dưới da 0,5 mL chế phẩm thử nghiệm theo sáng chế, lô đối chứng, tiêm cho mỗi con chuột 0,5 mL nước muối sinh lý. Chuột được theo dõi về thể trạng trong 72 giờ. Chỉ tiêu theo dõi bao gồm thể trọng, trạng thái và tình trạng kích ứng tại vị trí tiêm. Chuột được cho ăn theo khẩu phần tiêu chuẩn.

Đánh giá độc tính bán trường diễn:

Chuột được thử nghiệm được tiến hành tương tự như thử nghiệm đánh giá độc tính cấp. Tuy nhiên, hàm lượng sử dụng được giảm còn  $5 \times 10^{-6}$  mg/kg thể trọng. Lô đối chứng được tiêm nước muối sinh lý cùng thể tích, chuột được tiêm và theo dõi liên tục trong 28 ngày. Chỉ tiêu theo dõi bao gồm thể trọng, trạng thái và tình trạng kích ứng tại vị trí tiêm. Chuột được cho ăn theo khẩu phần tiêu chuẩn.

Kết quả thu được cho thấy, cả trong thử nghiệm đánh giá độc tính cấp và đánh giá độc tính bán trường diễn đều không nhận thấy sự khác biệt, các con chuột đều khỏe mạnh, không nhận thấy có sự giảm cân hoặc bỏ ăn. Vị trí tiêm không phát hiện thấy có mức độ kích ứng bất thường ở cả hai lô thử nghiệm. Điều này có thể thấy rằng, chế phẩm theo giải pháp hữu ích không gây độc đến chuột thử nghiệm.

### *Ví dụ 3: Thử nghiệm khả năng tiêu khối u của chế phẩm liposom*

Để đánh giá tác dụng tiêu khối u trên chuột, sử dụng chuột bạch dòng Swiss khỏe mạnh, trọng lượng khoảng 20g. Mỗi con chuột được tiêm vào dưới da lưng một lượng 1 mL/con dung dịch hóa chất (metylcholanthren pha trong dầu oliu với nồng độ 0,1 mg/mL) để tạo khối u. Kết quả khối u được tạo ra ở chuột được thể hiện trên Hình 2. Mẫu khối u được kiểm tra bằng phương pháp nhuộm với hemotoxylin. Kết quả chụp mẫu sinh thiết khối u được thể hiện trên Hình 3 và Hình 4 cho thấy, có nhiều tế bào ung thư dạng fibrosarcoma với kích thước to, nhỏ khác nhau, nhân kiềm tính nằm trong tổ chức liên kết. Kích thước khối u có đường kính khoảng 5-8 cm.

Tổng số 6 con chuột thử nghiệm được tạo khối u như trên được tiến hành thử nghiệm điều trị khối u. Số chuột này được chia thành ba nhóm. Nhóm thứ nhất (TN), tiến hành tiêm 1mL dung dịch thử nghiệm như nêu trong Ví dụ 2. Nhóm thứ hai (ĐC1) tiêm 1mL artemisinin pha trong nước muối sinh lý cùng nồng độ. Nhóm thứ ba (ĐC2) tiêm aspirin pha trong nước muối sinh lý cùng nồng độ. Các lần tiêm được thực hiện

bằng cách tiêm trực tiếp vào khối u. Số lần tiêm lặp lại sau 5 ngày. Trường hợp khối u vỡ, chế phẩm được tiêm trực tiếp vào tĩnh mạch đùi.

Kết quả đánh giá sự tiêu biến của khối u trong 30 ngày thử nghiệm. Kết quả thử nghiệm đối với chế phẩm theo giải pháp (nhóm TN) được thể hiện trên các hình từ Hình 5 đến Hình 7. Theo đó cho thấy, sau 15 ngày thử nghiệm, khối u vỡ ra, sau 20 ngày phần da chuốt được hình thành, sau 25 ngày, khối u gần như tiêu biến hoàn toàn, phần da được khôi phục.

Tuy nhiên, đối với nhóm ĐC1 và ĐC 2, khối u không có biểu hiện tiêu biến, trường hợp đối với ĐC1, khối u chỉ giảm kích thước khoảng 50% ở gần vị trí tiêm, đối với ĐC2, kích thước khối u giảm khoảng 10% ở gần vị trí tiêm.

Tiến hành sinh thiết khối u (Hình 8) cho thấy, không còn tế bào nhân quái (tế bào ung thư) ở mẫu TN, mẫu ĐC1 và mẫu ĐC2, vẫn còn tế bào nhân quái.

Kết quả trên cho thấy rằng, chế phẩm liposom theo giải pháp hữu ích có hiệu quả vượt trội trong việc điều trị khối u.

#### **Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích**

Chế phẩm liposom theo giải pháp hữu ích mở ra một hướng mới cho việc điều trị bệnh ung thư, cụ thể là điều trị khối u. Bằng phương pháp đóng gói hoạt chất artemisinin và aspirin trong cấu trúc liposom bao gồm L- $\alpha$ -phosphatidylcholin và cholesterol có nguồn gốc từ lòng đỏ trứng gà giúp tăng cường độ sinh khả dụng cũng như độ tương thích sinh học của các hoạt chất trong thử nghiệm lâm sàng.

Chế phẩm liposom theo giải pháp hữu ích cho thấy hiệu quả trong việc điều trị khối u một cách đặc hiệu, chế phẩm được thử nghiệm cho thấy không gây độc cấp cũng như gây độc bán trường diễn cho động vật thử nghiệm. Chế phẩm cho thấy tác dụng tiêu u đặc hiệu, đây là một hướng đi hiệu quả cho phương pháp điều trị u. Bằng cách phối hợp artemisinin và aspirin cho thấy có tác dụng vượt trội trong việc tiêu u. Cùng với việc sử dụng L- $\alpha$ -phosphatidylcholin và cholesterol từ lòng đỏ trứng gà, các thành phần này tạo ra cấu trúc màng lipid kép trong môi trường nước hoặc nước muối sinh lý nên dễ bào chế và bảo quản.

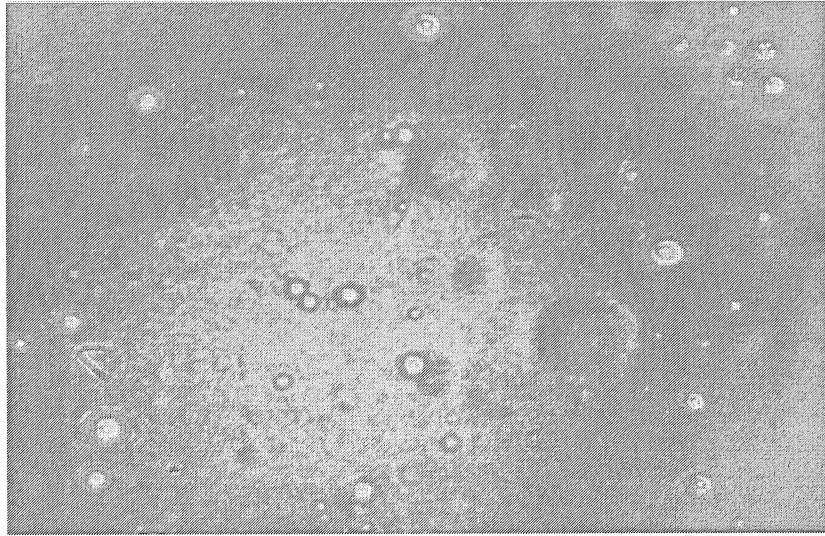


Chế phẩm liposom được sản xuất theo giải pháp hữu ích vừa có hiệu quả tiêu u, vừa dễ sản xuất, giúp giảm giá thành, giúp cho bệnh nhân mắc ung thư dễ tiếp cận với thuốc điều trị khối u có hiệu quả với chi phí hợp lý.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm liposom để điều trị khối u bao gồm 30% L- $\alpha$ -phosphatidylcholin, 10% cholesterol, 30% artemisinin, 28% aspirin và 2% tá dược, trong đó artemisinin, aspirin và tá dược được đóng gói trong cấu trúc liposom bao gồm 30% L- $\alpha$ -phosphatidylcholin và 10% cholesterol.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này được phân tán trong môi trường nước tạo cấu trúc liposom với lớp lipit kép bao gồm L- $\alpha$ -phosphatidylcholin và cholesterol bọc artemisinin, aspirin và tá dược ở dạng hạt vi cầu ổn định có kích thước từ 150 đến 200 nm.

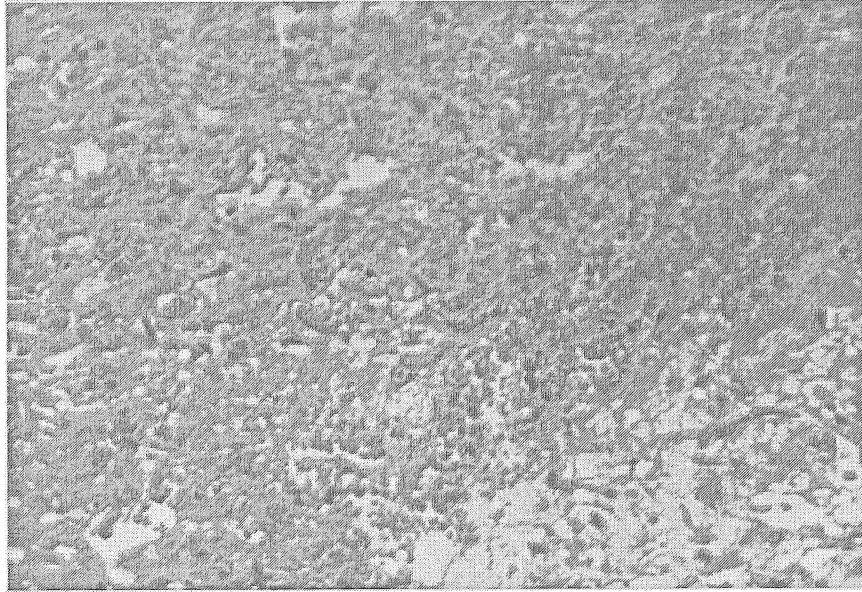
HÌNH 1



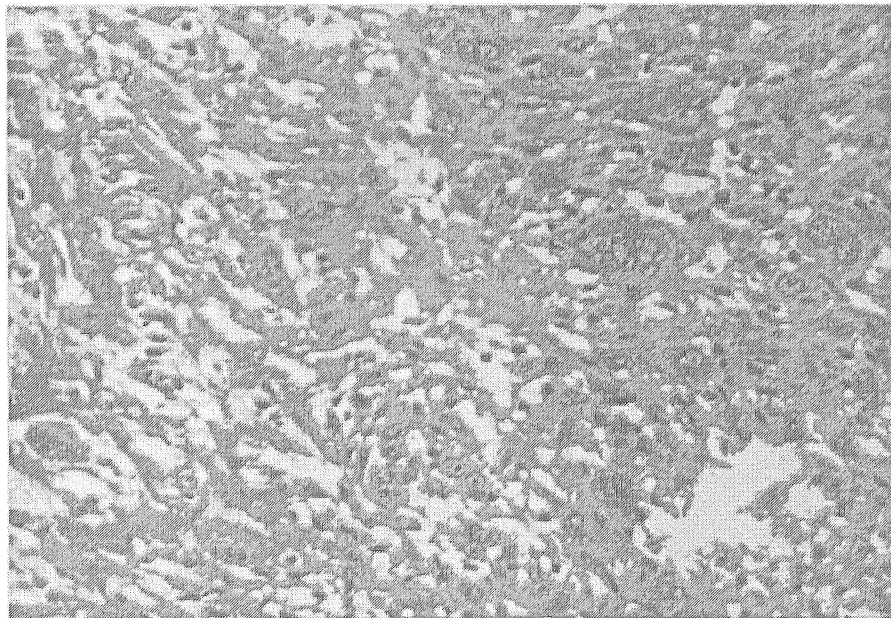
HÌNH 2



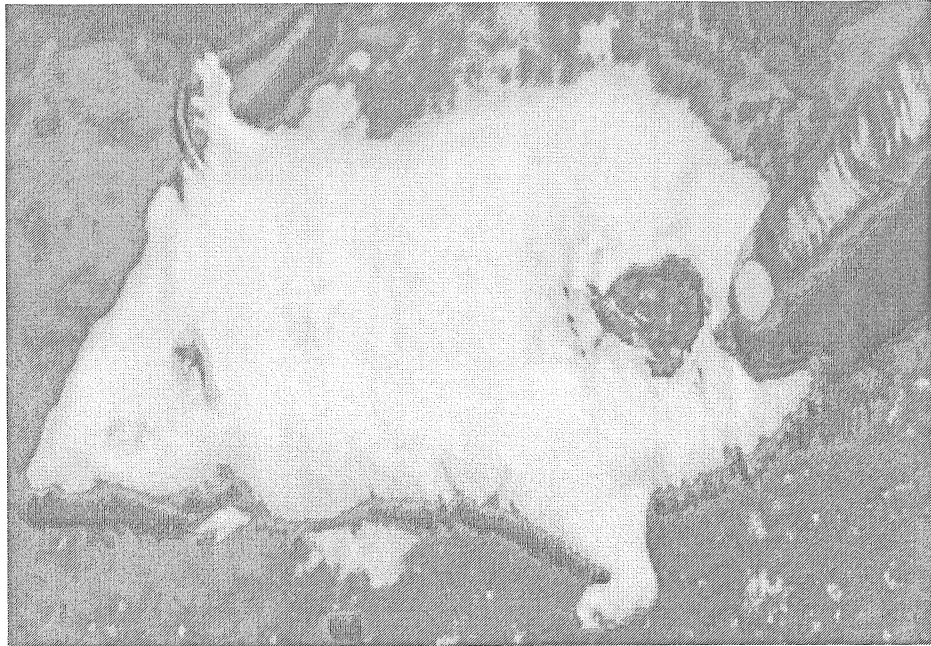
HÌNH 3



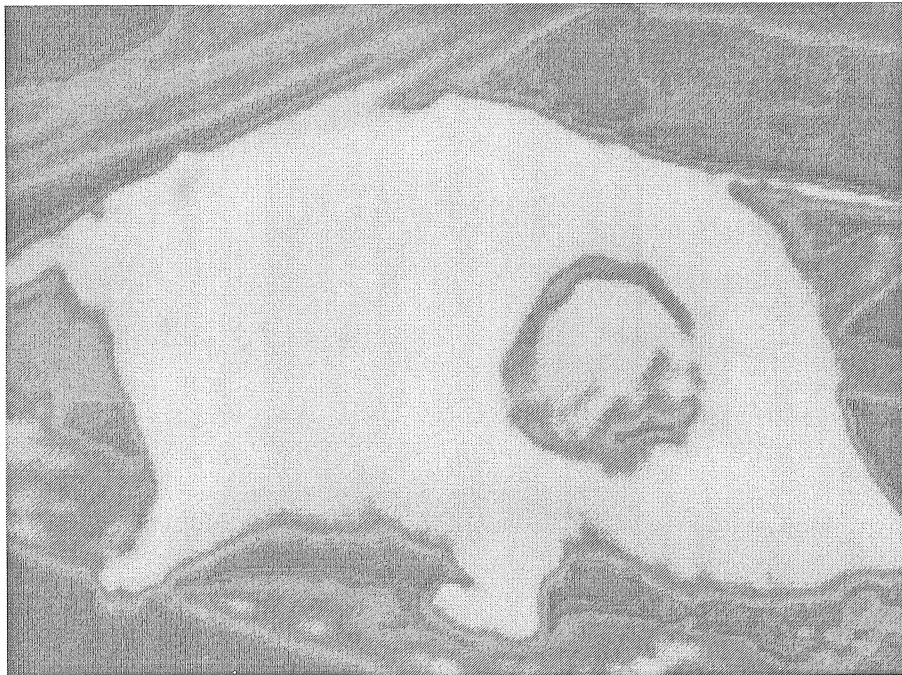
HÌNH 4



HÌNH 5



HÌNH 6



HÌNH 7



HÌNH 8

