



(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)



**2-0002424**

(51) **A61K 31/722**  
2020.01

(13) **Y**

---

(21) 2-2020-00177

(22) 09/12/2016

(67) 1-2016-04828

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/06/2018 363A

(76) Nguyễn Đại Hải (VN)

01 Mạc Đĩnh Chi, quận 1, thành phố Hồ Chí Minh

---

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT HẠT NANO LIPOSOM TỪ LECITHIN ĐẬU NÀNH MANG  
PACLITAXEL**

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hạt nano liposom từ lecithin đậu nành mang paclitaxel. Quy trình theo sáng chế tạo hạt nano liposom từ lecithin đậu nành mang paclitaxel bằng phương pháp hydrat hóa màng mỏng lipit và giảm kích thước sản phẩm tạo thành bằng phương pháp siêu âm kết hợp đồng hóa áp lực cao. Hạt nano liposom từ lecithin đậu nành mang paclitaxel thu được ổn định, kích thước nhỏ, đồng đều và có khả năng mang paclitaxel cao lên đến 94,48%.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế thuộc lĩnh vực hoá học điều chế các hợp chất có hoạt tính trị liệu đặc hiệu, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất hạt nano liposom từ lecithin đậu nành làm chất mang thuốc, cụ thể là hạt mang paclitaxel.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Ung thư, một trong những căn bệnh nan y nguy hiểm và gây tỷ lệ tử vong cao nhất, là một trong những chủ đề được y học quan tâm nhiều nhất. Các phương pháp điều trị ung thư truyền thống tuy mang đến kết quả trong việc tiêu diệt và hạn chế sự phát triển của tế bào ung thư nhưng chúng đều giết chết không ít mô lành, gây nguy hại đến sức khỏe của người bệnh sau khi điều trị. Cho nên cần tìm ra một phương pháp trị liệu hiệu quả giúp tăng liều lượng của hóa chất tại mô, giảm các tác dụng ngoại ý, từ đó nâng cao hiệu quả điều trị và cải thiện chất lượng cuộc sống. Một trong những phương pháp trị liệu đó là tạo ra hạt nano ứng dụng mang thuốc chống ung thư. Liposom được cấu thành từ phospholipit và cholesterol. Cấu tạo của liposom bao gồm một nhân nước ở giữa và một hay nhiều lớp vỏ phospholipit kép bao quanh. Vì vậy, nó phù hợp làm chất mang cho cả dược chất thân nước và thân dầu. Liposom hiện được coi như “đòn bẩy” tối ưu của công nghệ nano trong việc ứng dụng vào các chế phẩm y dược. Paclitaxel là hoạt chất hóa dược thân dầu có tác dụng chữa ung thư (ung thư phổi, ung thư buồng trứng, v.v.) hữu hiệu hiện nay. Do paclitaxel kém tan trong nước nên tính sinh khả dụng của dạng thuốc quy ước không cao. Nhiều hướng nghiên cứu được đặt ra để tăng sinh khả dụng của thuốc, trong đó sử dụng liposom làm chất mang thuốc để tăng hấp thu qua da hoặc niêm mạc là một hướng đi triển vọng, có tính khoa học và thực tiễn.

Hiện nay các chế phẩm thuốc liposom đang được đầu tư nghiên cứu ở Việt Nam. Đã có một số hoạt chất được nang hóa thành công vào tiểu phân liposom ở quy mô phòng thí nghiệm và được thử nghiệm *in vivo* trên động vật. Tại trường Đại học Dược

Hà Nội, Khoa Dược - Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh và Viện Khoa Học Vật Liệu Ứng Dụng tại Viện Hàn Lâm Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam cũng đã có những nghiên cứu tiếp cận ban đầu đối với liposom.

Tại trường Đại học Dược Hà Nội nhóm nghiên cứu của PGS.TS. Phạm Thị Minh Huệ đã thực hiện đề tài “*Nghiên cứu bào chế liposom dùng làm chất mang thuốc điều trị ung thư*” (Đề tài cấp Bộ 2009-2011) phát triển trên hoạt chất doxorubicin và chủ trì đề tài cấp nhà nước K.C10 “*Nghiên cứu bào chế thuốc tiêm liposom doxorubicin và amphotericin B*”. Ngoài ra, nhóm nghiên cứu của Đại học Dược Hà Nội còn nghiên cứu liposom acyclovir, liposom nifedipin, liposom diclofenac. Liposom doxorubicin được bào chế bằng phương pháp hydrat hóa lớp màng mỏng lipit với các tá dược là phosphatidylcholin kết hợp với cholesterol và sử dụng phương pháp chênh lệch pH để đưa doxorubicin vào liposom. Hiệu suất liposom hóa của các mẫu bào chế trên 70%, ảnh hưởng bởi tỷ lệ lipit/dược chất và tỷ lệ phosphatidylcholin/cholesterol. Liposom có cấu trúc nhiều lớp với kích thước từ 200-800 nm. Dược chất giải phóng chậm từ liposom ở pH=5,5 cao hơn ở pH=7,4. Đánh giá tác dụng của thuốc tiêm liposom doxorubicin trên chuột mang khối u tiền liệt tuyến, kết quả thực nghiệm cho thấy liposom doxorubicin có khả năng ức chế sự phát triển khối u tiền liệt tuyến trên chuột thiếu hụt miễn dịch. Chất mang liposom có kích thước 100-300 nm có khả năng đi qua các mạch máu của khối u, do vậy nâng cao hiệu quả điều trị. Không có sự khác biệt đáng kể về khả năng ức chế tốc độ phát triển khối u giữa sản phẩm liposom doxorubicin nghiên cứu và sản phẩm thương mại LIPO-DOX cùng dạng bào chế.

Nghiên cứu về liposom quốc tế, trong công bố Đơn sáng chế số CN 102258470 A (2011), Gong Liansheng đã bộc lộ nghiên cứu tổng hợp hạt nano liposom mang thuốc doxorubicin. Liposom được chuẩn bị từ doxorubicin, lecithin từ lòng đỏ trứng, cholesterol, chất chống oxy hóa, hệ đệm và đường. Phương pháp được sử dụng để tạo liposom là hydrat màng mỏng. Kết quả đã cho ra hạt nano liposom kích thước 232-310 nm có tính ổn định cao.

Năm 2012, Zawada đã nghiên cứu sự hình thành liposom từ quá trình hydrat hóa lecithin dầu đậu nành bằng phương pháp bay hơi pha đảo. Trong điều kiện tối ưu của việc tổng hợp liposom, hiệu quả mang thuốc lên tới 50%. Nồng độ của thuốc mang bởi liposom cao hơn trong dung dịch đậm. Kết quả được mô tả chi tiết trong tài liệu: Zawada, Zygmunt H. *Liposomes from hydrogenated soya lecithin formed in sintered glass pores*. Acta Pol. Pharm 69.1 (2012): 107-111.

Năm 2012, Moghimipour và đồng nghiệp đã sử dụng lecithin từ đậu nành và cholesterol tạo màng mỏng điều chế liposom mang thuốc celecoxib, một thuốc chống viêm được dùng để điều trị viêm khớp, mục đích của nghiên cứu là tìm công thức và đặc điểm của các túi liposom được tẩm thuốc celecoxib. Lecithin và cholesterol được hoà tan trong dung môi clorofom-metanol (1:1) và thêm vào dung dịch 5 mg celecoxib, sau đó đem đi cô quay. Lớp màng mỏng hình thành dưới đáy bình cầu sẽ được hydrat hoá với đệm phosphat. Đánh xoáy trong vòng 30 phút và đánh siêu âm trong một giờ. Tác giả đã sử dụng phương pháp màng thấm tách để xác định lượng thuốc được phóng thích. Phương pháp phân tích nhiệt vi sai và kính hiển vi điện tử truyền qua được dùng để xác định tính chất và kích thước hạt. Kết quả cho thấy hiệu quả mang thuốc là 67,34% và lượng thuốc được phóng thích sau 24 giờ là 67,17%. Kết quả xác định kích thước hạt cho thấy kích thước trung bình là 677 nm và ảnh TEM cho thấy các hạt nano hình cầu. Nghiên cứu cho thấy những đặc tính về khả năng ứng dụng của các liposom lót celecoxib trong hệ thống dẫn truyền thuốc. Kết quả được mô tả chi tiết trong tài liệu: Moghimipour, Eskandar, et al. *Preparation and characterization of liposoms containing essential oil of Eucalyptus camaldulensis leaf*. Jundishapur journal of natural pharmaceutical Products 7.3 (2012): 117-122.

Tác giả sáng chế cũng bắt đầu nghiên cứu phát hiện hệ mang thuốc liposom từ lecithin chiết xuất từ đậu nành mang thuốc paclitaxel. Lecithin là chất béo có màu nâu vàng có vai trò quan trọng trong ngành thực phẩm và dược phẩm. Lecithin thương mại được chiết xuất và tinh chế thành chất béo dưới dạng phospholipit. Thành phần

phospholipit chứa trong lecithin gồm: Phosphatidylcholin (PC, 14-16%); Phosphatidylethanolamin (PE, 10-15%); Phosphatidylinositol (PI, 10-15%); axit phosphatidic (Phosphatidic acid - PA, 5-12%). Tính chất quan trọng trong sử dụng tá dược thuốc: Lecithin có tính chất nhũ hóa mạnh. Với đặc tính dễ phân tán trong nước, lecithin là chất tạo kiểu nhũ tương D/N (dầu/nước) được coi là thích hợp để ứng dụng trong sản xuất hỗn dịch thuốc. Loại lipit có nguồn gốc từ đậu nành này có giá thành rẻ so với các loại lipit có nguồn gốc từ động vật. Ngoài ra, sử dụng nguồn lipit thực vật này sẽ giảm thiểu những nguy cơ nhiễm những mầm bệnh tiềm ẩn từ lipit động vật cho người bệnh. Kết quả bước đầu đã tạo ra được hạt có kích thước 100-200 nm, có khả năng tải thuốc cao, có khả năng kéo dài thời gian nhả thuốc trong khi đó lại giảm độc tính tế bào của thuốc. Việc nghiên cứu này sẽ tạo tiền đề thương mại hóa các loại thuốc, trong đó có hoạt chất lecithin thu được từ đậu nành với giá thành rẻ và chất lượng đáp ứng được nhu cầu của người bệnh.

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

Mục đích của sáng chế là đưa ra quy trình sản xuất hạt nano liposom từ lecithin đậu nành làm chất mang thuốc, cụ thể là hạt mang paclitaxel.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất hạt nano liposom từ lecithin đậu nành mang paclitaxel bằng phương pháp hydrat hóa màng mỏng lipit và giảm kích thước sản phẩm tạo thành bằng phương pháp siêu âm kết hợp đồng hóa áp lực cao.

### **Mô tả vắn tắt hình vẽ**

Hình 1 biểu diễn đường chuẩn của paclitaxel.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Quy trình sản xuất hạt nano liposom từ lecithin đậu nành làm chất mang thuốc, cụ thể là hạt mang paclitaxel theo sáng chế được mô tả một cách chi tiết dưới đây.

Hòa tan lecithin đậu nành, cholesterol và CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) trong clorofom. Trong đó, tỷ lệ lecithin đậu nành:cholesterol là 9:1 (khối lượng/khối lượng), nồng độ CTAB là 1% tổng khối lượng lipit và lượng clorofom là khoảng 1:50 so với tổng lượng lecithin và cholesterol (thể tích/khối lượng). Hòa tan paclitaxel trong clorofom, trong đó paclitaxel có nồng độ 5% khối lượng và lượng dung môi hữu cơ clorofom được sử dụng để hòa tan paclitaxel bằng khoảng 50% lượng dung môi sử dụng để hòa tan lecithin đậu nành, cholesterol và CTAB.

Nhờ các nghiên cứu với ý định phát triển quy trình sản xuất hạt nano liposom từ lecithin đậu nành làm chất mang thuốc có kích thước hạt liposom nhỏ và độ ổn định cao, tác giả sáng chế đã nhận thấy rằng khi sử dụng lecithin đậu nành:cholesterol theo tỷ lệ 9:1 (khối lượng/khối lượng) để tạo pha lipit, tiến hành cô quay thì cholesterol đan xen vào lecithin đậu nành tạo lớp màng lipit mỏng và qua đó, hạt liposom tạo thành có kích thước nhỏ. Bên cạnh đó, việc kết hợp CTAB trong quá trình tổng hợp liposom và hydrat hóa bằng nước cất có chứa chất hoạt động bề mặt thì liposom có độ ổn định cao. Vì paclitaxel rất khó tan trong nước, nên hoạt chất này được hòa tan vào pha lipit trong quá trình điều chế.

Tiến hành cô quay ở nhiệt độ 45°C trong vòng 4 giờ. Điều chỉnh áp suất chân không để dung môi bay hơi từ từ, không quá nhanh, để tạo lớp màng lipit mỏng và trong suốt bám xung quanh thành bình. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hóa học sẽ biết cách điều chỉnh áp suất chân không để đạt được hiệu quả như vậy.

Tiếp tục để yên trong chân không qua đêm để loại hoàn toàn lượng dung môi còn dư. Khi đã tạo được lớp màng lipit khô hoàn toàn, thực hiện hydrat hóa lớp màng lipit bằng nước cất chứa Tween 80 nồng độ 5% ở nhiệt độ 60°C đến khi lớp màng lipit mỏng bong ra hết khỏi thành bình, làm lạnh nhanh hỗn dịch thu được. Lượng nước cất được sử dụng tương đương với tổng lượng dung môi để hòa tan các hợp chất trong bước tạo lớp màng lipit.

Phương pháp này thường tạo ra các hạt liposom đa lớp và có kích thước lớn, do đó cần làm nhỏ kích thước hạt thu được. Thực hiện giảm kích thước hạt liposom bằng cách thực hiện siêu âm trong 15 phút kết hợp đồng hóa áp lực cao ở 80 MPa (800 bar) trong 10 chu kỳ. Quan sát kết quả thấy được liposom được đồng nhất hóa ở 60 MPa (600 bar) kích thước vẫn chưa đều, còn mẫu liposom đồng nhất hóa ở 100 MPa (1000 bar) hạt bị vỡ do áp suất cao quá, ở áp suất 80 MPa (800 bar) cho hạt hình cầu, kích thước <200 nm và đồng đều.

Ly tâm tốc độ 5500 vòng/phút trong 30 phút thu hạt nano liposom mang paclitaxel. Hạt nano liposom mang paclitaxel được bảo quản ở 2-8°C theo phương pháp thông thường.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Cân chính xác khối lượng các thành phần gồm 500 mg lecithin đậu nành, 56 mg cholesterol, 5 mg CTAB hòa tan trong 10 ml dung môi clorofom.

Trong lúc đó, hòa tan paclitaxel với hàm lượng là 5% khối lượng của chất mang vào 5 ml clorofom.

Tiến hành cô quay ở nhiệt độ 45°C trong vòng 4 giờ. Điều chỉnh áp suất chân không để dung môi bay hơi từ từ, không quá nhanh tạo lớp màng lipit mỏng và trong suốt bám xung quanh thành bình.

Khi đã tạo được lớp màng lipit khô hoàn toàn, hỗn hợp cần được hydrat hóa với 15 ml nước chứa 80 mg Tween 80 ở nhiệt độ 60°C, khuấy nhẹ đến khi lớp màng lipit mỏng bong ra hết khỏi thành bình, làm lạnh nhanh hỗn dịch thu được.

Thực hiện siêu âm trong 15 phút và đồng hóa ở 80 MPa (800 bar) trong 10 chu kỳ. Thực hiện ly tâm với tốc độ 5500 vòng/phút trong 30 phút để thu hạt nano liposom mang paclitaxel. Bảo quản hạt liposom mang paclitaxel thu được ở nhiệt độ 2-8°C.

Hạt liposom mang paclitaxel thu được có hình cầu, đồng đều và có kích thước  $167,6 \pm 0,65$  nm.

Kết quả mang thuốc paclitaxel được tính từ lượng thuốc tự do bên ngoài liposom bằng phương pháp đo HPLC. Đường chuẩn paclitaxel được xây dựng từ các dung dịch paclitaxel có nồng độ lần lượt là 0 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm (hình 1). Đồ thị biểu diễn tỉ lệ giữa nồng độ paclitaxel và độ hấp thu sẽ cho kết quả là một phương trình đường thẳng dạng  $y = ax + b$ , trong đó y là diện tích đỉnh (peak), x là nồng độ.

Từ đường chuẩn xây dựng được ta có thể tính được lượng thuốc paclitaxel còn dư bên ngoài liposom thông qua diện tích peak đo được từ sắc ký đồ. Hiệu số giữa lượng paclitaxel ban đầu và lượng còn dư chính là lượng thuốc paclitaxel đã được mang vào bên trong liposom.

Bảng 1. Kết quả mang thuốc paclitaxel

Mẫu	Lượng thuốc thừa (mg)	Lượng thuốc được mang (mg)
liposom-paclitaxel	1,764	30,236

Theo đó, hiệu suất mang thuốc và khả năng tải của liposom được tính theo công thức:

Hiệu suất mang thuốc:

$$DLE(\%) = [(khối\ lượng\ thuốc\ được\ mang\ vào\ liposom) / (khối\ lượng\ thuốc\ ban\ đầu)] \times 100\%$$

Khả năng mang thuốc của hạt:



$DLC(\%) = [(khối\ lượng\ thuốc\ được\ mang\ vào\ liposom)/(tổng\ lượng\ liposom\ và\ lượng\ thuốc\ ban\ đầu)] \times 100\%$

Từ dữ liệu và Bảng 1, ta xác định được hiệu suất mang thuốc và khả năng tải của liposom (Bảng 2)

Bảng 2. Hiệu suất mang thuốc paclitaxel và khả năng tải của liposom

Mẫu	Khả năng tải của liposom (%)	Hiệu suất mang thuốc (%)
liposom - paclitaxel	4,48±0,47	94,48±3,2

Kết quả cho thấy khả năng tải thuốc và hiệu suất mang thuốc paclitaxel đạt 94,48%, là kết quả cao so với các nghiên cứu khác trên liposom. Đây là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo trong ứng dụng hóa trị liệu.

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

Quy trình theo sáng chế đã tổng hợp hạt nano liposom từ lecithin đậu nành làm chất mang thuốc, cụ thể là hạt mang paclitaxel ổn định, kích thước nhỏ và đồng đều. Hạt nano liposom mang paclitaxel thu được từ quy trình theo sáng chế có thể sản xuất rộng rãi với số lượng lớn, dễ dàng vì đậu nành là nguồn nguyên liệu tương đối dễ kiếm, giá thành rẻ. Việc nghiên cứu sẽ tạo tiền đề thương mại hoá các loại thuốc chống ung thư với giá thành rẻ, chất lượng, tăng độ tan và giảm độc tính của thuốc.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất hạt nano liposom từ lecithin đậu nành mang paclitaxel bao gồm các bước:

hòa tan lecithin đậu nành, cholesterol và CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) trong clorofom theo tỷ lệ lecithin đậu nành:cholesterol là 9:1 (khối lượng/khối lượng), nồng độ CTAB là 1% tổng khối lượng lipid và lượng clorofom là khoảng 1:50 so với tổng lượng lecithin và cholesterol (thể tích/khối lượng);

hòa tan paclitaxel trong clorofom, trong đó paclitaxel có nồng độ 5% khối lượng và lượng dung môi hữu cơ clorofom được sử dụng để hòa tan paclitaxel bằng khoảng 50% lượng dung môi sử dụng để hòa tan lecithin đậu nành, cholesterol và CTAB;

tiến hành cô quay ở nhiệt độ 45°C trong vòng 4 giờ, điều chỉnh áp suất chân không để dung môi bay hơi từ từ, không quá nhanh, để tạo lớp màng lipid mỏng và trong suốt bám xung quanh thành bình;

tiếp tục để yên trong chân không qua đêm đến khi tạo được lớp màng lipid khô hoàn toàn;

thực hiện hydrat hóa lớp màng lipid bằng nước cất chứa Tween 80 nồng độ 5% ở nhiệt độ 60°C đến khi lớp màng lipid mỏng bong ra hết khỏi thành bình, làm lạnh nhanh hỗn dịch thu được, trong đó lượng nước cất được sử dụng tương đương với tổng lượng dung môi để hòa tan các hợp chất trong bước tạo lớp màng lipid;

thực hiện siêu âm trong 15 phút kết hợp đồng hóa áp lực cao ở 80 MPa (800 bar) trong 10 chu kỳ;

ly tâm tốc độ 5500 vòng/phút trong 30 phút, thu hạt nano liposom từ lecithin đậu nành mang paclitaxel.

Hình 1

