

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

BỘ Y TẾ

NGUYỄN THANH HÀ

**XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG VÀ ĐÁNH
GIÁ KHẢ NĂNG PHÂN BỐ SINH HỌC CỦA
PACLITAXEL TỪ CHẾ PHẨM THUỐC TIÊM SẴN
XUẤT TẠI VIỆT NAM**

Ngành: Kiểm nghiệm thuốc và độc chất

Mã số: 62720410

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Thành phố Hồ Chí Minh, năm 2020

Công trình được hoàn thành tại:

Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS Lê Minh Trí

PGS.TS Nguyễn Thiện Hải

Phản biện 1:

Phản biện 2

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường họp tại Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh vào hồi giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Khoa học Tổng hợp TP. HCM
- Thư viện Đại học Y Dược TP. HCM

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Đặt vấn đề

Paclitaxel (PTX), hoạt chất chiết từ vỏ cây thông đỏ (*Taxus brevifolia*) với những nghiên cứu ban đầu những năm 60 cho thấy có khả năng gây độc tế bào. Các nghiên cứu sau đó đã chứng minh PTX điều trị hiệu quả một số loại ung thư. Năm 1992, FDA phê duyệt dùng PTX điều trị ung thư buồng trứng, vú, phổi (dạng tế bào không nhỏ) và ung thư cổ tử cung dưới dạng dung dịch đậm đặc pha tiêm truyền (Taxol®). Tuy nhiên, do PTX có phân tử lượng lớn, độ tan và hấp thu kém nên sinh khả dụng thấp, độc tính cao. Bên cạnh đó dạng dung dịch đậm đặc pha tiêm phải sử dụng dung môi hòa tan là ethanol cùng với tỷ lệ chất diện hoạt cao nên có nhiều độc tính trên gan, thận. Mặc dù có một số tác dụng phụ và độc tính, PTX vẫn sử dụng khá phổ biến trong phác đồ điều trị ung thư hiện nay. Vì vậy các nghiên cứu về cải thiện độ tan, sinh khả dụng, phân bố và mô đích tác động, giảm độc tính, dạng bào chế mới tiện dụng của PTX đã và đang được quan tâm nghiên cứu gần đây trong đó việc tạo dạng bào chế tiện dụng, ít độc tính và phân bố thuốc vào mô đích tác động đang được chú trọng.

Đề tài: ***“Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng và đánh giá khả năng phân bố sinh học của paclitaxel từ chế phẩm thuốc tiêm sản xuất tại Việt Nam”*** được thực hiện nhằm mục tiêu nghiên cứu bào chế dạng bột đông khô pha tiêm truyền chứa PTX, xây dựng quy trình kiểm soát, đánh giá chất lượng và nghiên cứu khả năng phân bố sinh học, góp phần phát triển mô hình nghiên cứu tiền lâm sàng của dạng bào chế chứa PTX sản xuất tại Việt Nam. Để giải quyết mục tiêu đề ra, các nội dung cụ thể cần thực hiện:

- Xây dựng công thức và quy trình điều chế thuốc tiêm truyền chứa PTX với hai dạng bào chế là dung dịch đậm đặc và bột đông khô.
- Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng và đánh giá độ ổn định của hai chế phẩm nghiên cứu.
- Đánh giá thông số dược động và phân bố sinh học trong một số mô động vật của hai chế phẩm nghiên cứu so với thuốc đối chứng.

2. Tính cấp thiết của đề tài

Theo xu hướng chung của thế giới về nghiên cứu cải thiện dạng bào chế, sinh khả dụng, giảm độc tính của chế phẩm chứa các dược chất nói chung và PTX nói riêng, Việt Nam bước đầu đã có một số nghiên cứu về cải thiện sinh khả dụng của PTX như tạo hệ nano, vi nhũ tương, liposome chứa PTX, tuy nhiên chưa có công bố nào về dạng bào chế bột đông khô chứa PTX. Việc nghiên cứu dạng bột đông khô pha tiêm truyền chứa PTX, xây dựng quy trình kiểm soát, đánh giá chất lượng và nghiên cứu khả năng phân bố sinh học là hết sức cần thiết do dạng bột đông khô không chứa dung môi ethanol nên làm giảm độc tính khi tiêm, bảo quản thuận tiện và có thể phân liều thích hợp trong mỗi đơn vị bào chế, dùng 1 lần/ 1 đơn vị theo chỉ định mà không cần pha loãng. Các kết quả nghiên cứu về dược động học, phân bố sinh học góp phần phát triển mô hình nghiên cứu tiền lâm sàng giúp kiểm soát, đánh giá chất lượng, độc tính và thông số dược động của sản phẩm. Bên cạnh đó, việc nghiên cứu đầy đủ cơ chế dược động học của thuốc trên động vật thí nghiệm sẽ giúp tiên đoán một số định hướng về hiệu quả tác động đích và độc tính của thuốc trước khi tiến hành trên con người, tránh các thử nghiệm không cần thiết trên lâm sàng và đóng góp kinh nghiệm cho việc nghiên cứu những sản phẩm tương tự.

3. Những đóng góp mới của luận án

3.1. Về bào chế: Đã xây dựng công thức và quy trình bào chế bột đông khô pha tiêm truyền chứa PTX qui mô 50 lọ cho mỗi lô.

3.2. Về phân tích kiểm nghiệm:

- Đã xây dựng tiêu chuẩn chất lượng chế phẩm bột đông khô PTX.
- Đã xây dựng và thẩm định quy trình định lượng PTX trong dịch chiết từ huyết tương và dịch mô động vật thí nghiệm bằng phương pháp HPLC. Ứng dụng đánh giá các thông số dược động và phân bố của thuốc từ hai chế phẩm bào chế trên động vật thí nghiệm. Các kết quả nghiên cứu cung cấp dữ liệu về đặc tính dược động, tạo tiền đề cho nghiên cứu dược động và lâm sàng trên người.

4. Bố cục của luận án

Luận án gồm: 122 trang. Đặt vấn đề 2 trang, tổng quan 26 trang, đối

tượng - phương pháp nghiên cứu 21 trang, kết quả 55 trang, bàn luận 16 trang, kết luận và kiến nghị 3 trang. Luận án có 53 bảng, 22 hình, 70 tài liệu tham khảo (02 tiếng Việt, 68 tiếng Anh), và 11 phụ lục.

NỘI DUNG LUẬN ÁN

Chương 1: TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về Paclitaxel (PTX)

PTX không tan trong nước, tan rất kém trong hầu hết các dung môi dùng trong dược phẩm. Tan trong ethanol khoảng 46 mM, logP là 3.

1.2. Định hướng cải tiến công thức bào chế thuốc tiêm PTX

Hướng nghiên cứu trên thế giới cho đến nay chủ yếu cải thiện độ tan, cải thiện sinh khả dụng, dạng bào chế mới của PTX.

1.3. Tổng quan về Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP- β -CyD)

Cyclodextrin (CyD) là oligosaccharid dạng vòng gồm 6 (α -CyD), 7 (β -CyD), 8 (γ -CyD) đơn vị glucopyranose liên kết với nhau. HP- β -CyD là dẫn chất bán tổng hợp nhằm cải thiện độ tan β -CyD, được ứng dụng phổ biến hiện nay để cải thiện độ tan các dược chất khó tan dùng cho bào chế dung dịch thuốc tiêm, tiêm truyền, thuốc nhỏ mắt.

1.4. Phương pháp kiểm nghiệm chế phẩm dung dịch đậm đặc và bột đông khô – Đánh giá độ ổn định

Tham khảo Dược điển: Việt Nam, Mỹ, Châu Âu và quy định ICH.

1.5. Nghiên cứu tiền lâm sàng trên động vật thí nghiệm

Tiến hành theo hướng dẫn của EMA và FDA về phân tích dược chất trong dịch sinh học.

1.6. Tổng quan một số công trình nghiên cứu về PTX

Các nghiên cứu về các lĩnh vực bào chế, định lượng hoạt chất trong dịch sinh học, thông số dược động học trên động vật thí nghiệm.

Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Chế phẩm bào chế dạng dung dịch đậm đặc và bột đông khô, thuốc đối chứng Stragen® và Anzatax®.
- Thỏ và chuột nhắt trắng được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm Thuốc Tp.HCM và Viện Pasteur Tp.HCM.

2.2. Nguyên vật liệu, thiết bị

- Paclitaxel (Jiangsu yew pharmaceutical Co., Ltd (Trung Quốc) đạt tiêu chuẩn USP. Chất đối chiếu PTX, diazepam, carbamazepin do Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP.HCM thiết lập. Tạp chuẩn B (10-deacetyl-7epipaclitaxel (10-DAP)) nguồn gốc châu Âu (EP) và USP .
- Dung môi, hóa chất sử dụng đạt tiêu chuẩn dược dụng, tinh khiết phân tích.
- Thiết bị bào chế, phân tích và kiểm nghiệm (đã được hiệu chuẩn) tại Đại học Y Dược TP.HCM, Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP.HCM.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Xây dựng công thức và quy trình điều chế thuốc tiêm truyền chứa PTX với hai dạng bào chế là dung dịch đậm đặc (ddđđ) và bột đông khô (bđk)

2.3.1.1. Xây dựng công thức và qui trình bào chế ddđđ chứa PTX

- Khảo sát tính chất lý hóa của chế phẩm đối chứng
Khảo sát các chỉ tiêu về cảm quan, hàm lượng (USP), độ ổn định ít nhất 24 giờ sau khi pha loãng trong NaCl 0,9% hoặc glucose 5% ở các nồng độ 0,3; 0,6 và 1,2 mg/ mL theo hướng dẫn sử dụng.
- Xây dựng công thức và qui trình bào chế ddđđ chứa PTX
Khảo sát lựa chọn chất diện hoạt, chất ổn định để bào chế ddđđ có nồng độ PTX 6 mg/ mL (lọ 5 mL) đạt độ ổn định sau khi pha loãng như thuốc đối chứng. Phương pháp bào chế là hòa tan đơn giản.

2.3.1.2. Nghiên cứu bào chế dạng bđk pha tiêm truyền chứa PTX

- Nguyên tắc tạo ddđđ chứa PTX đạt độ ổn định sau khi pha loãng. Nghiên cứu đông khô ddđđ.

- Khảo sát tỷ lệ HP- β -CyD tạo phức bao PTX, tá dược ổn định phức bao, tá dược tạo khối và ảnh hưởng của dung môi lên quá trình đông khô. Bđk PTX đạt độ ổn định sau khi pha loãng như thuốc đối chứng.

2.3.1.3. Nâng cỡ lô, xây dựng quy trình bào chế và kiểm tra, đánh giá chất lượng của 2 sản phẩm bào chế

- Đánh giá sản phẩm về cảm quan: dạng bào chế ddđđ phải trong suốt; dạng bđk phải đạt hình thức bánh thuốc đông khô.
- Đánh giá độ ổn định sau khi pha: Độ tan, độ trong của dung dịch; pH, độ ổn định hàm lượng PTX trong 24, 48 và 72 giờ của dung dịch

sau khi pha loãng với NaCl 0,9%, glucose 5%.

2.3.2. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng và đánh giá độ ổn định của hai chế phẩm nghiên cứu

2.3.2.1. Xây dựng quy trình định lượng PTX và tạp trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC

- Định lượng PTX và tạp trong chế phẩm bằng HPLC: Điều kiện sắc ký được khảo sát bao gồm cột và các thông số liên quan, tỷ lệ pha động, thể tích tiêm mẫu, tốc độ dòng và bước sóng phát hiện dựa trên chuyên luận riêng của PTX trong dược điển USP hiện hành.

- Thẩm định quy trình định lượng PTX và tạp B trong chế phẩm. Tiến hành theo USP và ICH. Khảo sát tính đặc hiệu, tính phù hợp hệ thống, tính tuyến tính, độ chính xác và độ đúng. Với tạp 10-DAP khảo sát giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ).

2.3.2.2. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng

Tiêu chuẩn chất lượng của dạng chế phẩm bột đông khô được xây dựng dựa theo ĐVN V, USP 40 và kết quả nghiên cứu gồm tính chất, pH, định tính, hàm lượng nước, độ trong, giới hạn tiểu phân, độ đồng đều khối lượng, định lượng, tạp chất liên quan.

2.3.2.3. Đánh giá độ ổn định của hai chế phẩm nghiên cứu bào chế

Bảng 2.1. Điều kiện theo dõi ổn định của 2 chế phẩm

Sản phẩm bào chế	Dđ đậm đặc chứa PTX	Bột đông khô chứa PTX
Điều kiện dài hạn	30 °C ± 2 °C/75% ± 5% RH	5 °C ± 3 °C
Thời điểm lấy mẫu	0; 3; 6; 12; 18; 24 tháng	0; 3; 6; 12; 18; 24 tháng
Điều kiện lão hóa	40 °C ± 2 °C/75% ± 5% RH	25 °C ± 2 °C/60% ± 5% RH
Thời điểm lấy mẫu	0; 3; 6 tháng	0; 3; 6 tháng

Đánh giá các chỉ tiêu: Cảm quan, pH, hàm lượng, tạp liên quan (trong các giai đoạn), nội độc tố và độ vô khuẩn (giai đoạn đầu và cuối). Số lượng mẫu thử tối thiểu 3 lọ mỗi thời điểm.

2.3.3. Nghiên cứu thông số dược động học và đánh giá phân bố sinh học trong một số mô của hai chế phẩm bào chế chứa PTX so sánh với chế phẩm đối chứng

2.3.3.1. Xác định độc tính cấp của 2 chế phẩm bào chế

Thăm dò liều cao nhất không gây độc (LD₀) và liều thấp nhất gây độc (LD₁₀₀) 100% chuột thí nghiệm. Từ kết quả liều thăm dò, thử tiếp

trên 64 con chuột, theo dõi hoạt động của chuột sau khi dùng thuốc, ghi lại những biểu hiện ngộ độc, mức độ nghiêm trọng, sự xuất hiện độc tính, tiến triển dẫn tới phục hồi hoặc chết trong thời gian theo dõi là 72 giờ. Tính kết quả LD₅₀ theo phương pháp Karber và Behrens.

2.3.3.2. Xây dựng quy trình định lượng PTX trong huyết tương và trong mô của thỏ và chuột thử nghiệm

- Định lượng PTX trong huyết tương và trong mô của thỏ và chuột thử nghiệm bằng phương pháp HPLC. Các điều kiện sắc ký đã được khảo sát để phù hợp với đối tượng mẫu (huyết tương, mô của thỏ và chuột) và phù hợp với thực tế.

- Thẩm định quy trình định lượng PTX trong huyết tương và mô của thỏ và chuột thử nghiệm: Tiến hành theo quy định EMA và FDA. Khảo sát tính đặc hiệu, tính phù hợp hệ thống, giới hạn định lượng dưới, khoảng xác định, độ đúng và độ chính xác (trong ngày và liên ngày), hiệu suất chiết, độ ổn định của dung dịch chuẩn, độ ổn định của hoạt chất trong mẫu phân tích và độ ổn định ở 3 chu kỳ.

2.3.3.3. Khảo sát nồng độ PTX trong huyết tương và trong mô của thỏ và chuột thử nghiệm

- Sau khảo sát thăm dò liều, tiến hành lấy mẫu trong huyết tương và mô động vật thử nghiệm tại các thời điểm theo bảng 2.2.

Bảng 2.2. Thời điểm lấy mẫu huyết tương và mô

Thông số	Huyết tương		Mô	
	Thỏ	Chuột	Thỏ	Chuột
Liều thăm dò (mg/ kg)	3 - 6	6 - 12 - 24	3 - 6	6 - 12 - 24
Liều tiêm (mg/ kg)	6	12	6	12
Lượng mẫu lấy	≥ 1,2 mL	≥ 1,2 mL	≥ 1,0 g	≥ 1,0 g
Thời điểm lấy mẫu sau khi tiêm (phút)	5-10-15-20-30-60-120-180-240-360	5-10-15-30-60-120-180-360	30-120-240-480	30-60-120-360-480

- Quy trình xử lý mẫu bao gồm các giai đoạn đồng nhất mẫu, chiết trong dung môi, bay hơi tạo cặn và hòa tan lại trong dung môi đưa vào phân tích. Thông số của quá trình khảo sát gồm dung môi chiết, thời gian và tốc độ ly tâm, nhiệt độ cô mẫu.

2.3.4. Xử lý kết quả

2.3.4.1. Thông số được động học

So sánh các thông số dược động của chế phẩm bào chế với thuốc đối chứng về nồng độ đỉnh trong dịch sinh học ($C_{\max}$), hằng số tốc độ thanh thải (k), thời gian bán thải của pha thải trừ ($t_{1/2}$), thể tích phân bố (V_d), diện tích dưới đường cong trong khoảng 0 tới t ($AUC_{0 \rightarrow t}$), diện tích dưới đường cong trong khoảng 0 tới ∞ ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$).

2.3.4.2. Xác định nồng độ PTX trong huyết tương và mô chuột và thỏ

- Dịch đồng nhất sau khi định lượng sẽ có đơn vị là $\mu\text{g PTX/ mL}$ dịch đồng nhất. Nồng độ PTX ($\mu\text{g/ mL}$) trong huyết tương được xác định bằng phương pháp chuẩn nội sử dụng tỉ số diện tích đỉnh và phương trình hồi quy.

- Để đưa về đơn vị có ý nghĩa cho sự phân bố thuốc trong mô, mẫu được quy về đơn vị $\mu\text{g PTX/ g}$ mô theo tỷ lệ dung dịch đồng nhất hóa

Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Nghiên cứu bào chế thuốc tiêm chứa PTX dạng dddđ và bđk

3.1.1. Nghiên cứu công thức bào chế dddđ chứa PTX

Dung dịch đạt độ ổn định sau pha loãng 24 giờ cần tiếp tục khảo sát cải thiện độ ổn định theo thời gian.

Bảng 3.1. Thành phần công thức và kết quả khảo sát dddđ chứa PTX

Công thức (Tỷ lệ chất diện hoạt và ethanol khảo sát)	Kết quả cảm quan và hàm lượng PTX (%) của các dung dịch sau khi pha loãng trong NaCl 0,9% hoặc glucose 5% theo thời gian (Nồng độ dung dịch pha loãng 0,6 mg/ mL)								
	Tween 80/ Ethanol (T80/E)				Kolliphore ELP/ Ethanol (K/E)				
	NaCl 0,9%		Glucose 5%		NaCl 0,9%		Glucose 5%		
	0 giờ	24 giờ	0 giờ	24 giờ	0 giờ	24 giờ	0 giờ	24 giờ	
T1 (1:4)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	K1
T2 (1:3)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	K2
T3 (1:2)	(-)	(-)	(-)	(-)	88,60(±)	60,33(-)	90,01(±)	83,57(-)	K3
T4 (1:1)	92,73(+)	68,01(-)	103,82(+)	86,12(-)	98,64(+)	93,89(+)	99,17(+)	94,69(+)	K4
T5 (2:1)	98,93(+)	97,21(+)	100,82(+)	97,70(+)	95,34(+)	94,64(+)	93,85(+)	92,74(+)	K5
T6 (3:1)	99,14(+)	93,15(+)	93,98(+)	93,71(+)	97,84(+)	95,41(+)	102,49(+)	98,40(+)	K6
T7 (4:1)	95,70(+)	91,96(+)	95,87(+)	94,12(+)	97,70(+)	96,34(+)	95,63(+)	94,52(+)	K7
(-): dung dịch tủa đục (+): dung dịch trong (±): dung dịch đục mờ									

(-): dung dịch tủa đục

(+): dung dịch trong

(±): dung dịch đục mờ

Bảng 3.2. Kết quả cải thiện ổn định K4 và T5 bằng acid citric 0,01M

Công thức khảo sát	Dung dịch sau khi pha loãng	Hàm lượng PTX (%) các dung dịch sau khi pha loãng trong NaCl 0,9% hoặc glucose 5% ở các nồng độ 1,2; 0,6 và 0,3 mg/ mL theo thời gian							
		0 giờ		24 giờ		48 giờ		72 giờ	
		NaCl	Glucose	NaCl	Glucose	NaCl	Glucose	NaCl	Glucose
		0,9%	5%	0,9%	5%	0,9%	5%	0,9%	5%
T5	T5 ₁	96,73	103,10	94,07	99,43	94,01	92,93	93,93	92,25
	T5 ₂	98,33	96,02	96,36	95,58	94,58	95,05	94,37	92,37
	T5 ₃	101,89	103,47	99,26	97,52	95,76	97,26	93,60	93,62
T5+AC	T5 ₁ +AC	96,98	98,10	94,26	97,16	93,94	95,02	93,62 ^{***}	92,88
	T5 ₂ +AC	98,32	98,90	97,66	98,30	96,76	97,82	95,85 ^{***}	97,71
	T5 ₃ +AC	101,89	101,82	99,26	100,02	96,98	98,22	94,69	95,83
K4	K4 ₁	97,31	98,53	93,27	97,26	62,39*	83,52 ^{**}	56,22*	63,25*
	K4 ₂	100,58	100,00	95,59	92,94	91,60	85,78 ^{**}	71,43 ^{**}	76,87 ^{**}
	K4 ₃	98,29	97,11	93,57	96,60	82,80 ^{**}	91,06	75,37 ^{**}	86,73 ^{**}
K4 +AC	K4 ₁ +AC	96,11	101,03	95,05	95,08	90,67 ^{**}	93,56	82,43 ^{**}	86,09 ^{**}
	K4 ₂ +AC	99,48	98,05	98,25	97,63	94,52	94,63	93,46	90,68
	K4 ₃ +AC	99,75	101,64	98,78	98,60	95,61	96,37	92,14	93,04
Stragen®	S ₁	97,53	99,28	95,70	98,73	95,66	98,43	95,61	98,17
	S ₂	100,10	100,67	99,07	94,57	98,24	92,14	97,40	90,30
	S ₃	99,28	98,77	98,88	96,47	98,15	96,54	97,43	94,90

(*): dung dịch tủa đục (**): dung dịch đục mờ (***): dung dịch tủa li ti màu trắng

1-2-3: Nồng độ các mẫu sau khi pha loãng lần lượt tương ứng 1,2-0,6-0,3 mg PTX/ mL

Với việc thêm acid citric 0,01M (AC), kết quả bảng 3.2 cho thấy không có sự cải thiện ổn định với T5 nhưng có cải thiện rất tốt với K4 (ổn định từ 24 giờ lên đến 72 giờ). Công thức cải thiện này được lựa chọn nâng cỡ lô 50 lọ.

3.1.2. Nghiên cứu bào chế bột đông khô chứa PTX

Kết quả từ bảng 3.3 cho thấy sử dụng HP- β -CyD với nồng độ 0,4% cải thiện độ tan PTX. Độ ổn định sau khi pha bền trong vòng 0,5 giờ nên cần ổn định phức bao hình thành bằng PVP K30 với các nồng độ khảo sát từ 0 - 2%. Với nồng độ PVP 2%, dung dịch sau khi pha loãng ổn định đến 1,5 giờ vẫn chưa đạt yêu cầu nên cần cải thiện thêm bằng cách sử dụng chất trợ tan là PEG 400 (2 - 10%) và tween 80 (5- 8%) hoặc hỗn hợp tween và PEG 400 với các tỷ lệ khác nhau, kết quả tỷ lệ F10 đến F18 cho độ ổn định của sản phẩm sau khi pha loãng lên đến 72 giờ tương đương với thuốc đối chứng.

Bảng 3.3. Thành phần công thức và kết quả khảo sát bđk chứa PTX

Thành phần	F1	F2	F3	F4	F7	F10	F12	F14	F16	F18	F19	F20
PTX (mg)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	9
Ethanol (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Tertbutanol												1
HP- β -CyD (mg)	20	30	35	40	40	40	40	40	40	40	40	40
PVP K30 (mg)					200	200	200	200	200	200	200	200
PEG 400 (ml)						1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5
Tween 80 (ml)						0,5	0,8	0,7	0,6	0,5	0,6	0,6
Manitol						0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Nước cất	0,5	0,5	0,5	0,5	1,5	4	4	4	4	4	4	4
Tính chất												
Độ trong dd pha loãng từ dd phức (giờ)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
			1/6	0,5	1,5	72	72	72	72	72	72	72
Bột sau đông khô						x	x	x	x	x	✓	✓
Thời gian hòa tan bột đông khô (phút)						3	2	3	3-4	2	2	2
Độ trong dd pha loãng từ dd hoàn nguyên (giờ)						(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
						72	24	24	24	72	72	72

(-): dd đục (°): dd trong x: bột đông khô nứt/vỡ ✓: bột đông khô mịn, không rạn nứt

Các công thức F10 - F18 được thêm tá dược tạo khối là manitol rồi tiến hành đông khô với thời gian tiền đông là 48 giờ, giai đoạn làm khô với áp suất 0,0108 mbar – 0,0026 mbar. Tiếp tục nâng tỷ lệ tá dược thành phần với thông số kỹ thuật quá trình đông khô phù hợp. Kết quả khảo sát cho thấy bđk công thức F19 đạt yêu cầu đặt ra tuy nhiên có hạn chế là khả năng tải hoạt chất thấp. Việc cải thiện thay dung môi ethanol bằng tertbutanol cho thấy phức có độ ổn định cao hơn, đã tạo thuận lợi cho việc đông khô (dung dịch phức được làm đông hoàn toàn (không bị sôi) ở giai đoạn làm khô) với tỷ lệ tải PTX lên tới 1,5 lần (F20). F20 được chọn tiến hành nâng lô lên qui mô 50 lọ.

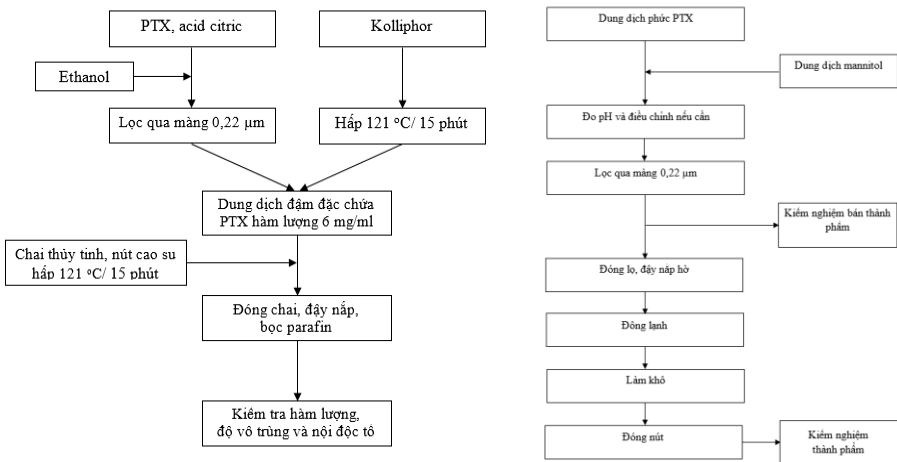
3.1.3. Nâng cỡ lô, xây dựng quy trình bào chế và kiểm tra, đánh giá chất lượng của 2 sản phẩm bào chế

Tiến hành trên 3 lô, kết quả các lô đều có cảm quan, pH, độ trong dung dịch hợp thành (đối với bột đông khô) và hàm lượng đạt yêu cầu, chứng tỏ quy trình bào chế ở quy mô 50 lọ/ lô ổn định.

Bảng 3.4. Thành phần công thức dddd và bđk pha tiêm truyền chứa PTX qui mô 50 lọ

TT	Thành phần	Dung dịch đậm đặc		Bột đông khô	
		1 lọ	Lô 50 lọ	1 lọ	Lô 50 lọ
1	Paclitaxel (mg)	6	1500	24	120
2	Acid citric (mg)	2	500	-	-
3	Kolliphore ELP/ Ethanol (1 :1) (ml)	1	250	-	-
4	HP- β -CyD (mg)	-	-	107	535
5	PVP K30 (mg)	-	-	533	
6	PEG 400 (ml)	-	-	1,3	
7	Tween 80 (ml)	-	-	1,6	
8	Manitol (g)	-	-	1,97	
9	Nước (ml) ^(*)	-	-	4	200
10	Tertbutanol ^(*) (ml)	-	-	1	50

^(*): bay hơi trong quá trình bào chế



Hình 3.1. Sơ đồ quy trình pha chế dung dịch đậm đặc (A) và bột đông khô (B) pha tiêm truyền chứa PTX

3.2. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng và đánh giá độ ổn định của hai chế phẩm nghiên cứu

3.2.1. Thẩm định quy trình định lượng PTX và tạp liên quan trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC

Bảng 3.5. Điều kiện sắc ký của phương pháp định lượng PTX và tạp

TT	Thông số	Định lượng PTX	Định lượng tạp 10-DAP
1	Cột sắc ký	Luna® PFP 150 x 4,6 mm, 5 μ m, nhiệt độ cột 25 °C	Gemini® NX 150 x 4,6 mm, 5 μ m, nhiệt độ cột 25 °C
2	Thể tích tiêm mẫu	10 μ L	10 μ L
3	Tốc độ dòng	1,2 mL/ phút	1,0 mL/ phút
4	Đầu dò PDA ($\lambda_{\max}$)	227 nm	227 nm
5	Pha động	Nước : acetronitril (50: 50), rửa giải đẳng dòng.	Nước : acetronitril, rửa giải theo chương trình.
6	Pha mẫu	Mẫu được pha loãng trong methanol chứa 0,02% acid acetic (tt/tt) tới nồng độ 0,6 mg PTX/ mL	Mẫu được pha loãng trong acetronitril tới nồng độ 0,6 mgP TX/ mL.
	- Mẫu chuẩn		
	- Mẫu thử		
	- Mẫu placebo		

Bảng 3.6. Kết quả thẩm định quy trình định lượng PTX và tạp

Thông số	Kết quả thẩm định			
	PTX		Tạp 10-DAP	
	DDDD	BĐK	DDDD	BĐK
Tính đặc hiệu	Tỷ số thời gian lưu pic PTX trong mẫu chuẩn và thử 0,99		Hệ số rửa giải giữa pic PTX và tạp 1,8 > 1,2	
Tính phù hợp hệ thống				
- Thời gian lưu	0,58 %	0,98 %	0,32 %	0,37 %
- Diện tích pic	0,15 %	0,83 %	1,33 %	1,20 %
- Số đĩa lý thuyết	5423	5281	7650	6705
- Hệ số bất đối	0,04 %	0,98 %	0,76 %	0,25 %
Khoảng tuyến tính	95,42 - 1431,36 μ g/ mL		LOD = 0,15 μ g/ mL LOQ = 0,5 μ g/ mL	
Độ đúng (Tỷ lệ hồi phục)	101,60 %	101,10 %	-	-
Độ chính xác (RSD)	0,15 %	0,87 %	1,65 %	1,27 %

3.2.2. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng

Bảng 3.7. Tiêu chuẩn và kết quả kiểm nghiệm bđk chứa PTX

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả (Lô NC0106)
Tính chất	Bột đồng khô màu trắng	Đạt
pH	3,0 - 7,0	Đạt (4,2)
Định tính	Paclitaxel	Đúng
Hàm lượng nước	Không quá 5,0%	Đạt (2,5%)
Độ trong	Không có tiểu phân khi kiểm tra bằng mắt thường	Đạt
Giới hạn tiểu phân	(*)	Đạt
Độ ĐĐKL	$\pm 10\%$ KLTB bột thuốc trong lọ	Đạt ($P=2,1202$ g)
Định lượng	90%-110% so với hàm lượng trên nhãn	Đạt (99,0%)
Tạp 10-DAP	Không quá 0,5%	Đạt (không phát hiện)
Tạp không xác định	Không quá 0,1%	Đạt (không phát hiện)
Tổng tạp	Không quá 2,0%	Đạt (0,3%)
Nội độc tố vi khuẩn	Không quá 0,4 EU/mg	Đạt
Độ vô khuẩn	Phải vô khuẩn	Đạt

(*) Trên 90% số tiểu phân có kích thước $< 15 \mu\text{m}$, không quá 10% số tiểu phân kích thước 15-20 μm và không có tiểu phân kích thước lớn hơn 20 μm

3.2.3. Độ ổn định của chế phẩm bào chế

Kết quả khảo sát cho thấy cả hai dạng bào chế ổn định trong suốt thời gian khảo sát ở điều kiện bảo quản dài hạn và không có sự thay đổi hàm lượng, tạp ngoài quy định ở điều kiện lão hóa cấp tốc.

3.3. Nghiên cứu thông số dược động học và đánh giá phân bố sinh học trong một số mô của hai chế phẩm bào chế chứa paclitaxel so với chế phẩm đối chứng

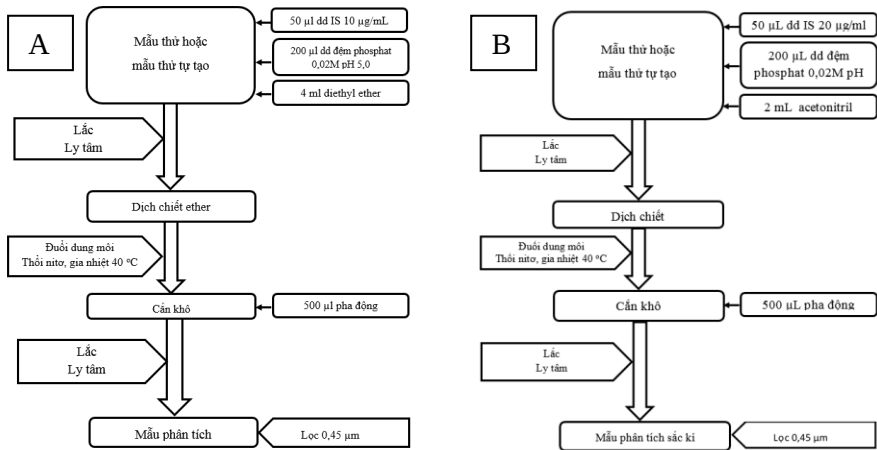
3.3.1. Độc tính cấp của 2 chế phẩm bào chế và thuốc đối chứng

- Kết quả nghiên cứu cho thấy LD_{50} của thuốc đối chứng và dddđ lần lượt là 23,84 - 32,56 mg/kg và 29,83 - 37,63 mg/kg. LD_{50} của hai thuốc khác nhau không có ý nghĩa ($p = 0,05$).

- LD_{50} của thuốc đối chứng thấp hơn so với chế phẩm dạng đồng khô (35,72 - 45,48 mg/kg).

3.3.2. Xây dựng quy trình định lượng PTX trong huyết tương và trong mô của thỏ và chuột thử nghiệm

- Quy trình xử lý mẫu được trình bày ở Hình 3.1.



Hình 3.1. Sơ đồ chiết PTX từ huyết tương (A) và mô (B) của thỏ và chuột thử nghiệm

Bảng 3.8. Điều kiện sắc ký của phương pháp định lượng PTX trong huyết tương và mô động vật thí nghiệm

TT	Thông số	Định lượng PTX trong huyết tương thỏ và chuột	Định lượng PTX trong mô thỏ và chuột
1	Cột sắc ký	C18, 250 x 4,60 mm, 5 μ m, nhiệt độ cột 30 °C	C18, 250 x 4,60 mm, 5 μ m, nhiệt độ cột 30 °C
2	Thể tích tiêm mẫu	40 μ L	20 μ L (thỏ); 40 μ L (Chuột)
3	Tốc độ dòng	1,2 mL/ phút (thỏ) 1,0 mL/ phút (chuột)	1,0 mL/ phút
4	Đầu dò PDA ($\lambda_{\max}$)	227 nm	230 nm (thỏ); 227 nm (chuột)
5	Pha động	Đệm : MeOH : ACN (**)	dd 1 ^(*) (thỏ); dd 2 ^(*) (chuột)
6	Pha mẫu	t ⁰ buồng mẫu 15 °C	t ⁰ buồng mẫu 20 °C
	- Mẫu chuẩn	Dãy đường chuẩn	Dãy đường chuẩn
	- Mẫu thử	Từ quy trình chiết	Từ quy trình chiết
	- Mẫu nội chuẩn	2 μ g CAR ⁽¹⁾ / mL	5 μ g CAR/ mL (thỏ) 2 μ g DZP ⁽²⁾ / mL (chuột)

dd 1^(*): Đệm acetat 0,02 M pH 5,0; MeOH : ACN (32,5; 47,5; 20)

dd 2^(*) : Đệm acetat 0,02 M pH 5,0; ACN (53; 47) (chuột)

(**): đệm phosphat pH 5,0; tỷ lệ 36:22:42 (thỏ); 40:22:38 (chuột);

CAR⁽¹⁾: Carbamazepin; DZP⁽²⁾: Diazepam

Bảng 3.9. Kết quả thẩm định quy trình định lượng PTX trong huyết tương và mô động vật thử nghiệm

Thông số	Kết quả thẩm định	
	Thỏ	Chuột
Tính đặc hiệu AS: Paclitaxel IS1: Carbamazepin IS2: Diazepam	Trên sắc ký đồ các đỉnh AS và IS có tỉ số thời gian lưu là 2,36 (huyết tương); 2,5 (mô) Mẫu placebo không có đỉnh ở các vị trí này.	Trên sắc ký đồ các đỉnh AS và IS có tỉ số thời gian lưu là 1,40 (huyết tương); 1,23 (mô) Mẫu placebo không có đỉnh ở các vị trí này.
LLOQ	0,5 µg/mL(*) 0,1 µg/mL(**)	0,1 µg/mL (*) (**)
Khoảng tuyến tính	(*) 0,5 - 50 µg/mL; (**) 0,1 - 20 µg/mL	(*) 0,1 - 50 µg/mL; (**) 0,1 - 20 µg/mL
Độ đúng và độ chính xác trong ngày^[a]	(*) 93,24 % - 105,17 % 1,29 % - 7,69 % (**) 99,05 % - 103,04 % 1,81 % - 3,44 %	(*) 98,1 % - 111,13 % 2,74 % - 11,13 % (**) 93,75 % - 106,34 % 2,66 % - 6,34 %
Độ đúng và độ chính xác giữa các ngày^[a]	(*) 85,91 % - 108,76 % 1,29 % - 14,61 % (**) 96,38 % - 107,80 % 0,64 % - 4,21 %	(*) 92,38 % - 118,54 % 2,74 % - 18,54 % (**) 95,0 % - 108,2 % 0,78 % - 5,26 %
Hiệu suất chiết^[b]	AS: 87,93 % - 98,35 % IS1: 86,21 % - 98,63 %	AS: 97,66 % - 116,36 % IS1: 98,18 % - 101,15 % IS2: 88,26 % - 102,10 %
Độ ổn định dung dịch chuẩn gốc		
- Ngắn hạn	ở t ⁰ phòng trong 24 giờ	ở t ⁰ phòng trong 24 giờ
- Dài hạn	ở -20 °C trong 60 ngày	ở -20 °C trong 60 ngày
Độ ổn định dung dịch chuẩn nội		
- Ngắn hạn	ở t ⁰ phòng trong 6 giờ	ở t ⁰ phòng trong 6 giờ
- Dài hạn	ở -20 °C trong 90 ngày	ở -20 °C trong 90 ngày
Độ ổn định hoạt chất trong huyết tương^[c]		
- Rã đông	3 chu kỳ	3 chu kỳ
- Ngắn hạn	ở t ⁰ phòng trong 6 giờ	ở t ⁰ phòng trong 24 giờ
- Trong autosampler	AS, IS: 6 giờ ở 15 °C	AS, IS: 24 giờ ở 15 °C

(*) Mẫu huyết tương; (**) Mẫu mô; [a] [b] [c] Được thực hiện tại nồng độ

Huyết tương: 0,5;1,0; 10,0; 20,0 µg/mL (thỏ); 0,1; 10; 25; 50 µg/mL (chuột)

Mô: 1,0; 10,0; 20,0 µg/mL (thỏ); 1,0; 5,0; 10,0 µg/mL (chuột)

LQC, MQC, HQC: 1,0; 10,0; 20,0 µg/mL (thỏ); 1,0; 10; 25 µg/mL (chuột) .

- Kết quả thẩm định quy trình định lượng PTX (bảng 3.8.) trong huyết tương và trong mô của động vật thử nghiệm trình bày trong bảng 3.10 cho thấy qui trình đạt yêu cầu của một qui trình phân tích và phù hợp áp dụng để định lượng PTX trong huyết tương và trong mô động vật thử nghiệm sau khi tiêm chế phẩm nghiên cứu dạng dddd và bđk pha tiêm chứa PTX so với thuốc đối chứng.

3.3.3. Nghiên cứu nồng độ PTX trong huyết tương động vật thí nghiệm

Bảng 3.10. Các thông số dược động của thuốc đối chứng trên thỏ

Thông số	AUC ₀₋₆ (µg.giờ/mL)	AUC _{0-∞} (µg.giờ/mL)	t _{1/2} (giờ)	k _a	V _d (lít/kg)
TB ± SD	14,71 ± 2,31	15,70 ± 2,07	1,15 ± 0,04	0,60 ± 0,01	0,251±0,006

Bảng 3.11. Thông số dược động của dddd và bđk chứa PTX trên thỏ

Thông số	AUC ₀₋₆ (µg.giờ/mL)		AUC _{0-∞} (µg.giờ/mL)		t _{1/2} (giờ)		k _a		V _d (lít/kg)	
	DDDD	BĐK	DDDD	BĐK	DDDD	BĐK	DDDD	BĐK	DDDD	BĐK
TB	16,33	5,06	18,38	5,55	1,36	0,87	0,52	0,79	0,208	0,57
± SD	3,08	1,19	2,94	1,38	0,25	0,09	0,08	0,09	0,06	0,10

Kết quả khảo sát trên thỏ (bảng 3.10 và bảng 3.11) cho thấy các thông số dược động AUC₀₋₆, AUC_{0-∞}, t_{1/2} của dạng bđk được cải thiện so với dạng dddd. Giữa thuốc đối chứng và dạng bđk khác biệt có ý nghĩa thống kê ($t > t_{0,05}$).

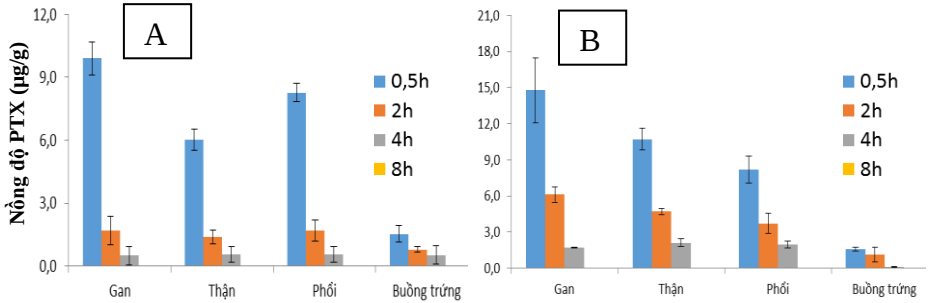
Bảng 3.12. Thông số dược động học của thuốc đối chứng và chế phẩm dddd chứa PTX trên chuột

Thông số	Giá trị trung bình (n = 6)	
	Thuốc đối chứng	Dddd
C _{max} (C ₀) (µg/mL)	63,483	59,434
AUC _{0→6} (µg.h/mL)	53,595	43,733
AUC _{0→∞} (µg.h/mL)	54,737	46,192
t _{1/2} (h)	0,958	1,132
V _d (l/kg)	0,189	0,202

Kết quả khảo sát trên chuột từ bảng 3.12 cho thấy nồng độ PTX trong máu của dddd thấp hơn so với thuốc đối chiếu tuy nhiên thời gian lưu giữ lâu hơn. Do sự khác biệt nồng độ tại các thời điểm trong khoảng

$\pm 20\%$ nên dddd tương đương được động học trên chuột với thuốc đối chứng.

3.3.4. Nghiên cứu nồng độ PTX trên mô động vật thí nghiệm

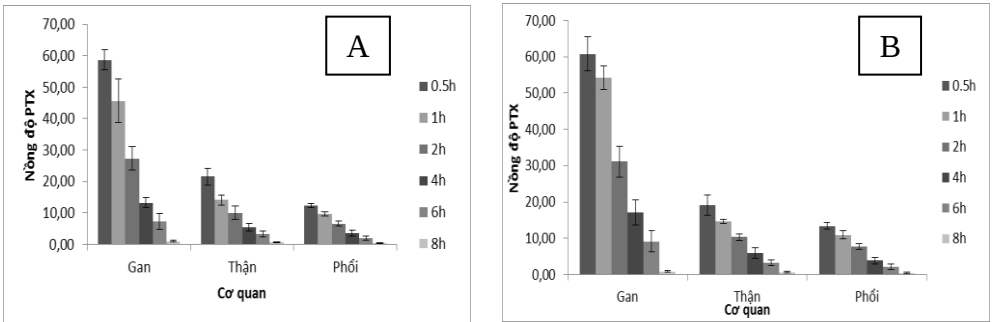


Hình 3.2. Nồng độ PTX trong các mô thỏ theo thời gian sau khi tiêm tĩnh mạch thuốc đối chứng [A] và dddd [B] liều 6 mg/kg (TB $\pm$ SD)

Bảng 3.13. So sánh $AUC_{0,5-8h}$ của PTX trong mô thỏ giữa thuốc đối chứng và dddd (TB $\pm$ SD)

Mô	Thuốc đối chứng	Dddd
Gan	11,83 $\pm$ 3,04	27,00 $\pm$ 2,87
Thận	8,63 $\pm$ 1,97	22,64 $\pm$ 1,26
Phổi	10,84 $\pm$ 2,12	18,53 $\pm$ 1,59
Buồng trứng	4,08 $\pm$ 1,13	3,64 $\pm$ 1,11
Tổng cộng	35,39 $\pm$ 8,26	71,81 $\pm$ 6,83

Kết quả từ hình 3.2 và bảng 3.13 cho thấy với liều tiêm 6 mg/kg của thuốc đối chứng và dddd, nồng độ PTX tập trung vào mô gan nhiều nhất, buồng trứng thấp nhất trong khi các mô thận, phổi có mức phân bố thuốc tương đương nhau. Từ thời điểm 8 giờ, nồng độ thuốc không còn đủ để phát hiện.



Hình 3.3. Nồng độ PTX trong các mô chuột theo thời gian sau khi tiêm tĩnh mạch thuốc đối chứng [A] và dddd [B] với liều 6 mg/kg (TB $\pm$ SD)

Bảng 3.14. So sánh AUC_{0-8h} của PTX trong mô chuột giữa thuốc đối chứng và dddd

Mô	Thuốc đối chứng ($\mu\text{g.h/g}$)	Dddd ($\mu\text{g.h/g}$)
Gan	131,90 $\pm$ 15,02	155,62 $\pm$ 16,82
Thận	49,05 $\pm$ 5,83	50,12 $\pm$ 5,08
Phổi	31,65 $\pm$ 2,31	35,46 $\pm$ 3,13
Tổng cộng	212,60 $\pm$ 18,86	241,20 $\pm$ 16,26

Kết quả từ hình 3.3 và bảng 3.14 cho thấy với cùng điều kiện thí nghiệm liều tiêm 12 mg/kg trên chuột, chế phẩm dddd cho nồng độ PTX tập trung cao nhất ở mô gan, sau đó đến thận và thấp nhất là phổi. Cả dddd và thuốc đối chứng đều cho nồng độ PTX giảm nhanh trong 4 giờ đầu. Từ thời điểm 8 giờ, nồng độ thuốc không còn đủ để phát hiện.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. Xây dựng công thức và qui trình bào chế

4.1.1. Nghiên cứu công thức bào chế dung dịch đậm đặc

Paclitaxel được sử dụng điều trị ung thư bằng pha loãng dung dịch đậm đặc PTX (6 mg/mL – lọ 5 mL) trong dung dịch tiêm truyền NaCl 0,9% hoặc glucose 5% ở 3 nồng độ trị liệu là 0,3; 0,6 và 1,2

mg/mL. Tuy nhiên do đặc tính khó tan trong nước của PTX nên sản phẩm sau khi pha loãng thường không ổn định vì vậy phải sử dụng chất diện hoạt với nồng độ lớn để đảm bảo PTX được hòa tan và ổn định sau khi pha loãng trong ít nhất 24 giờ. Các chất diện hoạt được nghiên cứu để hòa tan và ổn định dung dịch sau khi pha là Kolliphor ELP và Tween 80. Đây là 2 chất dùng phổ biến cho thuốc tiêm PTX (Kolliphor ELP) và dẫn chất Docetaxel (Tween 80) trên thị trường. Dung môi phối hợp với chất diện hoạt để điều chế dung dịch đậm đặc là ethanol (E) tuyệt đối, một dung môi hữu cơ tương đối an toàn so với các dung môi hữu cơ khác để hòa tan PTX tạo dung dịch đậm đặc. Kết quả cho thấy công thức chứa tween 80 đạt yêu cầu đề ra và có nhiều triển vọng, cần có nghiên cứu cải thiện thêm để có thể ứng dụng vào thực tiễn. Đây cũng là một công thức mới chưa thấy có trong sản phẩm tiêm nào chứa PTX. Việc sử dụng Kolliphor ELP tạo dung dịch sau khi pha loãng ổn định hơn tween 80. Công thức dùng Kolliphor ELP làm chất trung gian hòa tan với tỉ lệ K/E là (1:1) cho dung dịch đậm đặc 6mg/mL và dung dịch sau khi pha loãng đạt độ ổn định về cảm quan và hàm lượng hoạt chất trong vòng ít nhất 24 giờ. Việc thêm acid citric 0,01 M vào thành phần dung dịch đậm đặc mang lại sự cải thiện hơn và cụ thể là hàm lượng PTX ổn định, dung dịch hợp thành chậm xuất hiện vẩn đục hơn và độ ổn định sau khi pha loãng kéo dài đến 72 giờ tương đương với thuốc đối chiếu.

Quy trình bào chế dung dịch đậm đặc pha tiêm nhìn chung là hòa tan đơn giản. Tuy nhiên ở qui mô phòng thí nghiệm sẽ gặp nhiều khó khăn trong việc lọc vô khuẩn do dung dịch có độ nhớt lớn, không thể sử dụng thiết bị lọc áp suất như qui mô lớn vì vậy để đảm bảo việc vô khuẩn cho chế phẩm cần thực hiện tiệt khuẩn cho từng công đoạn.

PTX và dung dịch acid citric lọc qua màng lọc kích thước 0,22 μm ; Kolliphor ELP, lọ, nút hấp tiệt trùng ở 121 °C/ 15 phút; quá trình pha chế tiến hành trong khu vực vô trùng, cấp sạch A. Khi nâng cấp lô 50 lọ trong một lô pha chế, kết quả về mặt cảm quan, pH, độ vô trùng, nội độc tố và hàm lượng PTX đạt yêu cầu. Như vậy chất lượng dung dịch đậm đặc tương ứng với thuốc đối chứng phù hợp đưa vào thử nghiệm tiền lâm sàng trên động vật thí nghiệm. Dung dịch đậm đặc

được điều chế thành công với thành phần tương tự thuốc đối chứng.

4.1.2. Nghiên cứu bào chế dạng bột đông khô

4.1.2.1. Quá trình xây dựng công thức

- Do PTX khó tan trong nước, để đảm bảo độ tan, HP- β -CyD được dùng để tạo phức bao với PTX cải thiện khả năng tan trong nước. Qua thăm dò khảo sát, tỉ lệ HP- β -CyD phù hợp được sử dụng để tạo phức với PTX là 0,4%. Đây cũng là giới hạn cao nhất của HP- β -CyD trong thuốc tiêm tuy nhiên dung dịch sau khi pha loãng chỉ ổn định tối đa trong vòng 1 giờ do đó cần phối hợp thêm chất ổn định giúp dung dịch bền vững ít nhất 24 giờ. Nhiều polymer được dùng để tạo ổn định cho phức bao trong đó PVP K30 thường được sử dụng. Kết quả khi sử dụng PVP K30 độ bền của phức được duy trì. Điều này phù hợp với giả thuyết cho rằng các polymer tan trong nước tạo thành một dạng phức bậc 4 với phức hợp thuốc - cyclodextrin làm tăng độ ổn định biểu kiến của phức hợp thuốc-cyclodextrin. Sử dụng thêm PEG 400 phối hợp với tween 80 với tỷ lệ thích hợp cho giúp tăng độ tan PTX trong dung dịch đậm đặc và đảm bảo sự ổn định sau khi pha loãng trong dịch truyền đến ít nhất 24 giờ. Kết quả nghiên cứu cho thấy các công thức chỉ sử dụng một loại chất trợ tan PEG 400 hoặc tween 80 đều thể hiện dung dịch sau khi pha loãng kém bền (tối đa đến 24 giờ xuất hiện vẩn đục trong khi thuốc đối chứng lên đến 72 giờ), chứng tỏ cần có sự phối hợp của cả 2 chất trợ tan này.

- Thực hiện đông khô trên các dung dịch đậm đặc cho thấy khả năng đông rắn của dung dịch khó do lượng tá dược lỏng trong công thức chiếm tỷ lệ cao, do đó các tá dược tạo khối cho bột đông khô như lactose, sorbitol, glucose, arginin, leucin và manitol được lựa chọn thêm vào dung dịch với vai trò tá dược độn và tạo khối thuốc cho sản phẩm đông khô. Kết quả cho thấy manitol cho khả năng tạo khối tốt. Đây cũng là tá dược dùng phổ biến cho tạo khối dung dịch đông khô.

4.1.2.2. Quy trình điều chế bột đông khô pha tiêm truyền

Lựa chọn quy trình đông khô với thời gian đông lạnh 48 giờ, áp suất giai đoạn làm khô sơ cấp và thứ cấp là 0,0108 mbar và 0,0026 mbar để tiến hành thực nghiệm khảo sát tối ưu tá dược.

- Pha chế 3 lô công thức F20 và tiến hành đông khô theo quy trình trên để khảo sát tính ổn định của quy trình. Sản phẩm đạt các chỉ tiêu về mặt cảm quan, hàm lượng tương tự chế phẩm đối chứng. Nâng cấp số lượng 50 lọ trong một lô pha chế, tiến hành trên 3 lô kết quả về mặt cảm quan, hàm lượng PTX và tạp đạt yêu cầu theo chỉ tiêu Dược điển, chuyên luận riêng thuốc tiêm PTX. Như vậy chất lượng bột đông khô tương ứng với thuốc đối chứng phù hợp đưa vào thử nghiệm tiền lâm sàng trên động vật thí nghiệm. Công thức và quy trình bào chế bột đông khô pha tiêm truyền là sản phẩm nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam về mặt bào chế. Quy trình điều chế cho thấy có sự ổn định, có triển vọng áp dụng vào thực tiễn.

4.2. Quy trình định lượng PTX và tạp liên quan bằng phương pháp HPLC

- Quy trình định lượng PTX và tạp liên quan áp dụng cho chế phẩm thử để xác định chất lượng sản phẩm của quá trình bào chế.

Khi khảo sát điều kiện sắc ký định lượng tạp theo USP và BP đã có một số thay đổi về cột, điều kiện nhiệt độ buồng tiêm, nhiệt độ cột và chương trình pha động để phù hợp với điều kiện của phòng thí nghiệm. Quy trình đã được thẩm định đạt các yêu cầu theo USP và ICH hiện hành. Quy trình áp dụng được trên cả dạng bào chế bột đông khô.

- Quy trình định lượng PTX trong dịch sinh học (huyết tương và mô) động vật thí nghiệm đã công bố các thông số thẩm định đầy đủ với yêu cầu của một quy trình thẩm định phân tích thuốc trong huyết tương người tình nguyện (quy định FDA và EMA) và đầy đủ hơn so với các công bố tham khảo trong các công trình nghiên cứu trên thế giới liên quan đến động vật thí nghiệm.

4.3. Phân bố PTX trong huyết tương động vật thí nghiệm

4.3.1. Thử nghiệm trên thỏ

Qua quá trình thực nghiệm khảo sát nồng độ thuốc đối chứng và thuốc thử PTX trong huyết tương thỏ, kết quả cho thấy hai dạng bào chế ddđđ và bđk có khác biệt so với thuốc đối chứng về thông số dược động học. Cụ thể:

- So với thuốc đối chứng AUC_{0-6} , $AUC_{0-\infty}$, $t_{1/2}$ lần lượt là 14,71

$\mu\text{g.giờ/mL}$; 15,70 $\mu\text{g.giờ/mL}$; 1,15 giờ, dung dịch đậm đặc có các thông số cao hơn (16,33 $\mu\text{g.giờ/mL}$; 18,38 $\mu\text{g.giờ/mL}$; 1,36 giờ) trong khi dạng bột đông khô có các thông số này thấp hơn (5,60 $\mu\text{g.giờ/mL}$; 5,55 $\mu\text{g.giờ/mL}$; 0,87 giờ) ở ngưỡng $p = 0,05$. Ở thời điểm 6 giờ, không định lượng được PTX trong huyết tương đối với cả 3 chế phẩm nên có thể nhận xét độ suy giảm nồng độ PTX trong huyết tương tho theo thời gian của 03 chế phẩm tương tự nhau.

- Dung dịch đậm đặc có V_d (0,21 L/kg) tương tự thuốc đối chứng (0,25 L/kg) và thấp hơn bột đông khô ($V_d = 0,57$ L/kg), gợi ý khả năng phân bố thuốc vào mô thổ của bột đông khô tốt hơn. Sự khác biệt này có thể giải thích là do thành phần và tỷ lệ tá dược ở mỗi dạng bào chế đã thay đổi. Dạng dung dịch đậm đặc, tá dược chính là Kolliphor EL và ethanol khan trong khi ở dạng đông khô, tá dược gồm hỗn hợp hydroxypropyl- β -cyclodextrin, PVP K30, PEG 400, Tween 80 và ethanol khan. Việc không sử dụng Kolliphor EL (CrEL) ở dạng đông khô có thể góp phần làm giảm độc tính của chế phẩm. Kết quả này bước đầu gợi ý có thể nghiên cứu phát triển dạng bột đông khô để ứng dụng trên lâm sàng.

4.3.2. Thử nghiệm trên chuột

Từ thực nghiệm định lượng hàm lượng PTX trong huyết tương cho chế phẩm dddd và thuốc đối chứng, kết quả thu được đường biểu diễn nồng độ PTX trong huyết tương chuột theo thời gian tại các thời điểm 5 - 10 - 30 - 60 - 120 - 180 - 360 phút. So với khoảng cách giữa các thời điểm lấy mẫu đã được báo cáo trước đây, khoảng cách giữa các thời điểm ban đầu ngắn hơn nên việc tăng số điểm lấy mẫu giúp dự đoán chiều hướng thay đổi nồng độ PTX trong huyết tương và gợi ý thời điểm thuốc phân bố vào mô chính xác hơn.

- Từ kết quả thu được cho thấy nồng độ PTX trong huyết tương tại các thời điểm 5, 10, 15 phút không khác biệt giữa 2 mẫu thử; sự khác biệt tại các thời điểm 30, 60, 120, 180 và 360 phút về giá trị nồng độ trung bình cũng như các thông số dược động học theo mô hình dược động học tuyến tính giữa dung dịch đậm đặc và thuốc đối chiếu nằm trong khoảng cho phép (80% - 125% ở dạng logarit). Từ đó, có thể kết luận 2 chế phẩm được xem là tương đương dược động học trên

chuột nhất cái khi tiêm tĩnh mạch liều duy nhất. Kết quả cũng cho thấy nồng độ PTX trong huyết tương giảm mạnh từ thời điểm 30 phút; gợi ý khả năng PTX được phân bố vào mô. Từ đó, đề tài chọn thời điểm lấy mẫu mô từ 30 phút sau khi tiêm thuốc trong quy trình khảo sát nồng độ PTX trong mô ở giai đoạn nghiên cứu tiếp theo.

4.4. Phân bố PTX trên mô động vật thí nghiệm

4.4.1. Trên mô thỏ

- Với liều tiêm 6 mg/kg của cả 2 mẫu thử (dung dịch đậm đặc và thuốc đối chứng) nồng độ PTX tập trung ở mô gan cao nhất, buồng trứng thấp nhất, các mô thận, phổi có mức phân bố tương tự nhau. Kết quả này gợi ý về khả năng tích lũy PTX tại mô gan sẽ cao hơn các mô còn lại.

- Trong khoảng thời gian từ 0,5 giờ đến 4 giờ, nồng độ PTX trong tất cả các mô khảo sát của dạng dung dịch đậm đặc cao hơn so với thuốc đối chứng. Ngoài ra, tỷ số $AUC_{0,5-8h}$ chế phẩm thử / $AUC_{0,5-8h}$ thuốc đối chứng ở các mô gan, thận, phổi, buồng trứng và tổng các mô lần lượt là 2,28; 2,62; 1,71; 0,89 và 2,01. Các kết quả này gợi ý dạng dung dịch đậm đặc có khả năng phân bố vào mô cao hơn so với thuốc đối chứng khoảng 2 lần.

4.4.2. Trên mô chuột

- Thời điểm lấy mô được chọn ở thời điểm nồng độ thuốc trong huyết tương giảm nhanh, từ kết quả nhiên cứu nồng độ PTX trong huyết tương chuột, thời điểm lấy mô khoảng 30 phút (0,5 giờ) sau khi tiêm thuốc và tại các thời điểm 1, 2, 4 đến 6 giờ. Đến 8 giờ không phát hiện nồng độ thuốc trong mô tương ứng với tín hiệu của mẫu phân tích PTX trên sắc ký đồ dưới ngưỡng phát hiện, nên có thể nhận xét độ suy giảm nồng độ PTX trong huyết tương chuột theo thời gian của 02 chế phẩm tương tự nhau. Dựa vào độ lệch chuẩn SD tương ứng (ở thời điểm 0,5 giờ) với mô gan (3,25), thận (2,56), phổi (0,75), kết quả cho thấy gan là mô có dải biến thiên về nồng độ PTX rộng nhất. Sự biến thiên này giải thích cho sự kém đồng đều của phân bố thuốc đặc biệt là mô gan, sau đó là mô thận và biến thiên thay đổi thấp nhất là mô phổi - nồng độ PTX phân bố khá đều ở mô này.

- Đối với cả 2 mẫu thử, tại thời điểm 0,5 giờ nồng độ PTX ở các mô khảo sát là cao nhất, từ 2 - 4 giờ nồng độ PTX trong mô giảm nhanh. Giá trị AUC_{0-8h} cả 2 chế phẩm ở gan là cao nhất (thuốc đối chứng: 131,9 $\mu\text{g.h/g}$; dung dịch đậm đặc: 155, 62 $\mu\text{g.h/g}$) tiếp sau đó là thận (49,05 $\mu\text{g.h/g}$ và 50,12 $\mu\text{g.h/g}$) và thấp nhất là phổi (31,65 $\mu\text{g.h/g}$ và 35,46 $\mu\text{g.h/g}$). Điều này cho thấy mức độ PTX phân bố vào các mô lần lượt gan > thận > phổi. AUC_{0-8h} chế phẩm thử ở gan và phổi cao hơn thuốc đối chứng có ý nghĩa. Như vậy chế phẩm thử có khả năng phân bố vào 2 mô trên tốt hơn thuốc đối chứng với độ tin cậy 95% ($p = 0,05$). AUC_{0-8h} ở thận của chế phẩm thử và thuốc đối chứng không khác nhau có ý nghĩa, dẫn đến khả năng phân bố ở thận của chế phẩm thử và thuốc đối chiếu tương tự nhau.

KẾT LUẬN

Luận án “*Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng và đánh giá khả năng phân bố sinh học của paclitaxel từ chế phẩm thuốc tiêm sản xuất tại Việt Nam*” đã hoàn thành các mục tiêu đề ra với các kết quả sau:

1. Đã xây dựng công thức và quy trình điều chế thuốc tiêm truyền chứa PTX với hai dạng bào chế dung dịch đậm đặc và bột đông khô với qui mô 50 lọ/ lô. Quy trình có tính ổn định và lặp lại.
2. Đã xây dựng được quy trình định lượng PTX và tạp liên quan trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC. Quy trình đã được thẩm định đạt yêu cầu theo USP, ICH và đã áp dụng kiểm nghiệm cho cả dạng dung dịch đậm đặc và dạng đông khô chứa PTX. Chế phẩm dung dịch đậm đặc pha tiêm truyền chứa PTX đạt tiêu chuẩn USP, ổn định sau 24 tháng ở điều kiện bảo quản dài hạn ($30 \pm 2^\circ\text{C}/75 \pm 5\% \text{RH}$). Chế phẩm bột đông khô pha tiêm truyền chứa PTX đạt tiêu chuẩn thuốc bột pha tiêm của Dược điển Việt Nam V, ổn định sau 12 tháng ở điều kiện ($5 \pm 3^\circ\text{C}$). Tiêu chuẩn chất lượng bột đông khô pha tiêm truyền chứa PTX đã được Viện Kiểm nghiệm Thuốc Tp. Hồ Chí Minh thẩm định.
3. Đã nghiên cứu thông số dược động học và đánh giá phân bố sinh học trong một số mô của hai chế phẩm bào chế chứa PTX so sánh với chế phẩm đối chứng với các kết quả cụ thể sau:

- Đã xây dựng quy trình xử lý mẫu dịch sinh học chứa PTX từ huyết tương và mô động vật thử nghiệm (thỏ và chuột).
- Đã xây dựng và thẩm định quy trình định lượng PTX trong huyết tương và mô (gan, thận, phổi, buồng trứng) của thỏ và chuột bằng phương pháp HPLC. Các thông số thẩm định đạt yêu cầu của quy trình phân tích thuốc trong dịch sinh học theo EMA và FDA.
- Đã áp dụng quy trình định lượng xác định các thông số dược động học và nồng độ PTX trong huyết tương và phân bố trong các mô theo thời gian. Đối với dung dịch đậm đặc, các thông số dược động $AUC_{0-\infty}$, $t_{1/2}$ được cải thiện so với thuốc đối chứng trong khi dạng đông khô cho thấy sự giảm ở các thông số dược động $AUC_{0-\infty}$, $t_{1/2}$. Xu hướng thay đổi thông số dược động học có thể dự đoán xu hướng phân bố thuốc vào mô nếu định hướng tác dụng thuốc trên một số cơ quan. Ở nghiên cứu dạng đông khô có thông số V_d tăng hơn so với thuốc đối chứng sẽ dự đoán khả năng phân bố thuốc vào mô sẽ lớn hơn.

Quy trình khảo sát phân bố thuốc PTX trong mô động vật thí nghiệm là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam có thể áp dụng phù hợp với các nghiên cứu tiền lâm sàng trong nghiên cứu bào chế thuốc quy mô phòng thí nghiệm tại Việt Nam.

KIẾN NGHỊ

Để hoàn thiện đề tài, cần thực hiện thêm các nội dung sau:

- Nghiên cứu nâng cấp cỡ lô qui mô pilot dạng bào chế đông khô và tối ưu quy mô sản xuất pilot.
- Yêu cầu về chất lượng của các chỉ tiêu trong tiêu chuẩn chất lượng cần được tiếp tục khảo sát trên cỡ lô pilot để xây dựng thành chuyên luận được điển Việt Nam.
- Đánh giá độ ổn định của dạng đông khô ở điều kiện bảo quản dài hạn và lão hóa cấp tốc theo thời gian quy định và đề xuất hạn dùng.
- Khảo sát dạng phân bố sinh học của dạng đông khô từ quy trình sản xuất pilot trên mô thỏ và chuột thí nghiệm để có sự đánh giá về phân bố so với thuốc đối chứng cùng dạng bào chế.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. *Nguyễn Thanh Hà, Lê Minh Trí, Lê Nguyễn Nguyệt Minh, Nguyễn Thiện Hải* (2014), Nghiên cứu bào chế thuốc tiêm Paclitaxel dạng dung dịch pha tiêm truyền và dạng bột đông khô, Tạp chí Kiểm nghiệm Thuốc số 3A.
2. *Nguyễn Thanh Hà, Lê Minh Trí, Nguyễn Thiện Hải, Lương Khánh Duy, Lê Nguyễn Nguyệt Minh* (2014), Nghiên cứu cải thiện độ tan của paclitaxel bằng phương pháp tạo phức với hydroxylpropyl- β -cyclodextrin, Tạp chí Y học Tp.HCM tập 18, phụ bản số 2.
3. *Nguyễn Thanh Hà, Lương Khánh Duy, Lê Minh Trí, Nguyễn Thiện Hải, Lê Nguyễn Nguyệt Minh* (2014), Xây dựng phương pháp định lượng paclitaxel trong phức chất với hydroxypropyl- β -cyclodextrin của thuốc tiêm truyền 30 mg/5 ml, Tạp chí Y Học Tp.HCM, tập 18, phụ bản số 2.
4. *Nguyễn Thanh Hà, Lê Minh Trí, Trần Mạnh Hùng, Nguyễn Thiện Hải, Lê Nguyễn Nguyệt Minh, Nguyễn Tuấn Kiệt* (2013), Evaluation of paclitaxel distribution in rabbit tissues from a novel paclitaxel intravenous injection formulation (Đánh giá phân bố của paclitaxel trên mô thỏ của chế phẩm tiêm chứa paclitaxel), Hội nghị Pharma-Indochina VIII.
5. *Nguyễn Thanh Hà, Lê Minh Trí, Nguyễn Thiện Hải, Trần Mạnh Hùng, Lê Nguyễn Nguyệt Minh, Đồng Quỳnh Như* (2013), Investigation of pharmacokinetic parameters of two intravenous injection formulas containing paclitaxel in rabbits (Nghiên cứu thông số dược động học của hai chế phẩm tiêm chứa paclitaxel trên thỏ), Hội nghị Pharma-Indochina VIII.
6. *Nguyễn Thanh Hà, Lê Minh Trí, Trần Mạnh Hùng, Phùng Hoàng Hiếu, Nguyễn Thiện Hải, Nguyễn Minh Phúc* (2016), Sự phân bố của paclitaxel trong chế phẩm tiêm trên mô chuột thử nghiệm, Tạp chí Dược học số 4.