



(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)



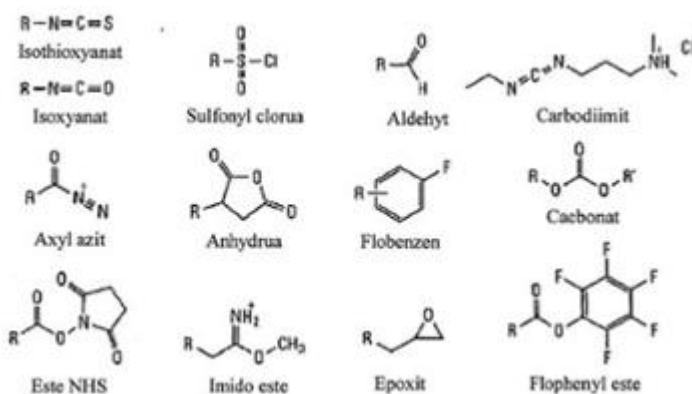
1-0028276

(51)⁷ A61K 31/195; A61K 31/765; A61P 27/12; A61P 25/16; A61P 25/28; A61P 27/10; A61K 31/22; A61P 25/00 (13) B

- (21) 1-2015-03911 (22) 14/03/2014
(86) PCT/US2014/027852 14/03/2014 (87) WO/2014/152818 25/09/2014
(30) 61/782,860 14/03/2013 US
(45) 25/05/2021 398 (43) 25/12/2015 333A
(73) THE UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS (US)
225 Franklin Street, Boston, Massachusetts 02110, United States of America
(72) MUTHUKUMAR, Murugappan (US); MOHR, Benjamin (US).
(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) CHẾ PHẨM DÙNG CHO MẮT CHỨA CÁC PHÂN TỬ HAI CHỨC ĐỀ ỨC CHẾ BỆNH ĐỤC THỦY TINH THỂ VÀ VIỄN THỊ

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm dùng cho mắt chứa ít nhất một chất che giấu điện tích γ -crystallin, trong đó chất che giấu điện tích γ -crystallin là phân tử hai chức đề ức chế hoặc đảo ngược sự tiến triển của sự tạo thành bệnh đục thủy tinh thể hoặc bệnh viễn thị trong mắt bằng việc dùng chất che giấu điện tích γ -crystallin. Cả hai bệnh viễn thị và bệnh đục thủy tinh thể đều gây ra bởi sự kết tụ của các protein thủy tinh thể hòa tan được gọi là crystallin.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các chế phẩm dùng cho mắt chứa các phân tử hai chức để ức chế hoặc đảo ngược sự tiến triển của các thay đổi liên quan đến tuổi tác trong thủy tinh thể của mắt.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thủy tinh thể của mắt là một cấu trúc trong suốt được treo ngay đằng sau tròng đen, mang các tia sáng tới tiêu điểm trên võng mạc. Thủy tinh thể này chứa cả protein hòa tan và không hòa tan; các protein này tạo nên 35 phần trăm trọng lượng ướt của thủy tinh thể này. Ở người trẻ, thủy tinh thể khỏe mạnh, các protein hòa tan, thường được gọi là crystallin, tạo nên 90 phần trăm protein của thủy tinh thể này. Trong quá trình lão hóa, crystallin của thủy tinh thể tạo nên các chất kết tụ không hòa tan, các chất này, ít nhất một phần, gây ra sự biến dạng suy giảm của nhân thủy tinh thể này, tạo nên bệnh viễn thị, làm mất khả năng thay đổi tiêu điểm để nhìn các vật ở gần của mắt. Sự tạo thành các chất kết tụ không hòa tan của crystallin của thủy tinh thể trong bệnh viễn thị được xem là giai đoạn sớm của sự tạo thành bệnh đục thủy tinh thể liên quan đến tuổi tác.

Bệnh đục thủy tinh thể được xác định bởi hiện tượng đục hoặc mờ trong thủy tinh thể của mắt. Đối với người già, bệnh đục thủy tinh thể tạo thành khi crystallin trong thủy tinh thể này chuyển thành các chất kết tụ, làm tăng độ mờ của thủy tinh thể. Cụ thể, quá trình giảm nồng độ của chaperon hòa tan, α -crystallin, trong nhân thủy tinh thể ở người già, nó được kết hợp vào các chất kết tụ có trọng lượng phân tử cao và protein không hòa tan. Sự có mặt của các chất kết tụ làm hại sức khỏe và chức năng của thủy tinh thể này và nếu không điều trị, bệnh đục thủy tinh thể có thể dẫn đến mất thị lực hoàn toàn hoặc thậm chí mù. Ngày nay, hầu hết các phương pháp điều trị bệnh đục thủy tinh thể thông thường là phẫu thuật.

Crystallin là protein cấu tạo được biểu hiện nhiều nhất trong các tế bào sợi của thủy tinh thể của phần xương sống của mắt. Crystallin này được chia thành hai nhóm phụ: α -crystallin (αA và αB) là thành phần của liên họ protein sốc nhiệt nhỏ, cũng có

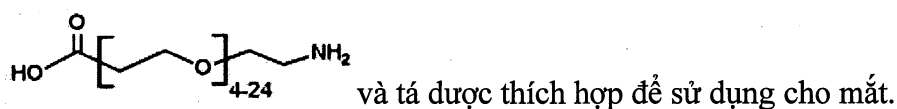
chức năng làm các protein cấu tạo và các chaperon phân tử; và liên họ β - và γ -crystallin liên kết tiền hóa có chức năng chính là các protein cấu tạo trong thủy tinh thể này, và góp phần tạo nên các đặc tính về độ trong suốt và khúc xạ của cấu trúc thủy tinh thể. Ngoài vai trò của chúng trong tiến triển của bệnh đục thủy tinh thể, α A-crystallin và α B-crystallin có liên quan đến các bệnh thoái hóa thần kinh, như bệnh Alexander's, bệnh Creutzfeldt-Jacob, bệnh Alzheimer và bệnh Parkinson.

Đơn sáng chế Mỹ số 2008/0227700 mô tả việc làm giảm kết tụ protein sử dụng các các peptit có hoạt tính chaperon làm thuốc điều trị. Cụ thể, các peptit α B được sử dụng để làm giảm kết tụ các chất kết tụ β -crystallin do độ pH gây ra như được đo bởi phương pháp tán xạ ánh sáng. Việc cung cấp liên tục alpha crystallin vào thủy tinh thể này là một thách thức. Nhu cầu là cần tìm ra các phương pháp thích hợp để làm giảm kết tụ của crystallin để ức chế và hoặc đảo ngược tiến trình của bệnh đục thủy tinh thể và bệnh viễn thị.

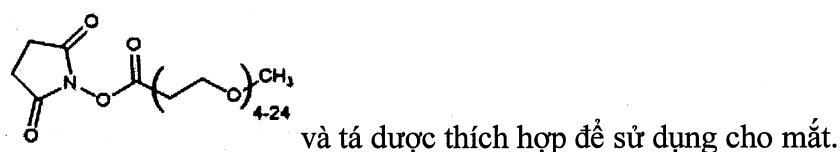
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm dùng cho mắt chứa các phân tử hai chức để ức chế bệnh đục thủy tinh thể và viễn thị.

Trong một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng cho mắt chứa:



Trong một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng cho mắt chứa:



Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ thể hiện dữ liệu MALDI-TOF để cải biến γ -crystallin bằng PEG24.

Fig.2 là sơ đồ thể hiện N1CF của γ -crystallin được cải biến bằng PEG24.

Fig.3 là sơ đồ thể hiện chức năng phân bố của γ -crystallin được cải biến bằng PEG24.

Fig.4 là đồ thị của Γ tính theo q^2 đối với γ -crystallin được cải biến bằng PEG24.

Fig.5 là đồ thị thể hiện dữ liệu MALDI-TOF để cải biến γ -crystallin bằng PEG4.

Fig.6 là đồ thị thể hiện NICF của γ -crystallin được cải biến bằng PEG4.

Fig.7 là đồ thị thể hiện chức năng phân bố của γ -crystallin được cải biến bằng PEG4.

Fig.8 là đồ thị của Γ tính theo q^2 đối với γ -crystallin được cải biến bằng PEG4.

Fig.9 là đồ thị thể hiện dữ liệu MALDI-TOF để cải biến γ -crystallin bằng CAPEG.

Fig.10 là đồ thị thể hiện NICF của γ -crystallin được cải biến bằng CAPEG4.

Fig.11 là đồ thị thể hiện chức năng phân bố của γ -crystallin được cải biến bằng CAPEG4.

Fig.12 là đồ thị của Γ tính theo q^2 đối với γ -crystallin được cải biến bằng CAPEG4.

Fig.13 là đồ thị thể hiện chức năng phân bố của γ -crystallin được cải biến bằng mMPEG.

Fig.14 là đồ thị thể hiện chức năng phân bố của γ -crystallin được cải biến bằng Biotin.

Fig.15 là đồ thị thể hiện chức năng phân bố của γ -crystallin được cải biến bằng Biotin-PEG.

Fig.16 là đồ thị thể hiện chức năng phân bố của γ -crystallin được cải biến bằng sulfo-N-hydroxysuccinimide acetate.

Fig.17 là hình vẽ thể hiện các phương án của các nhóm che giấu điện tích. Trong mỗi cấu trúc, R là phân tử lỏng.

Fig.18 là hình vẽ thể hiện các phương án của các phân tử lỏng.

Fig.19 là biểu đồ đo vận chuyển qua biểu mô.

Fig.20 là đồ thị thể hiện CAPEG4 được chuyển đến đáy của tế bào trong thử nghiệm vận chuyển qua biểu mô.

Fig.21 là đồ thị thể hiện độ pH của Opisol® tính theo nồng độ mg/ml của CAPEG4 được bổ sung.

Các dấu hiệu nêu trên và các dấu hiệu khác sẽ được đánh giá và được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này qua phần mô tả chi tiết, các hình vẽ và yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế mô tả các phương pháp làm giảm kết tụ/ngăn ngừa sự tạo thành γ -crystallin kết tụ bao gồm việc cho γ -crystallin kết tụ tiếp xúc với hợp phần bao gồm chất che giấu điện tích γ -crystallin với lượng đủ để làm giảm kết tụ và hoặc ngăn ngừa sự tạo thành γ -crystallin kết tụ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận ra rằng trong khi các phân tử được bộc lộ ở đây được mô tả là chất che giấu điện tích γ -crystallins chúng cũng có thể làm giảm kết tụ/ngăn ngừa sự kết tụ protein của β -crystallin. Sáng chế cũng mô tả các phương pháp ức chế hoặc đảo ngược sự tiến triển của sự tạo thành bệnh đục thủy tinh thể trong mắt bao gồm việc cho mắt tiếp xúc với chế phẩm dùng cho mắt với lượng hữu hiệu để ức chế bệnh đục thủy tinh thể chứa chất che giấu điện tích γ -crystallin. Sáng chế cũng mô tả các phương pháp ức chế hoặc đảo ngược sự tiến triển của bệnh viễn thị trong mắt bao gồm việc cho mắt tiếp xúc với chế phẩm dùng cho mắt với lượng hữu hiệu để ức chế bệnh viễn thị chứa chất che giấu điện tích γ -crystallin. Trong các phương án cụ thể, chất che giấu điện tích γ -crystallin không phải là polypeptit.

Các tác giả sáng chế ở đây đã sử dụng các kỹ thuật như phương pháp tán xạ ánh sáng động lực học để nghiên cứu các chất kết tụ được tạo thành bởi γ -crystallin trong dung dịch. Cả hai β và γ -crystallin là các protein cấu tạo có độ ổn định cao bao gồm bốn motif Greek-key trong hai miền. Trong khi β -crystallin tạo thành các dimer cũng như các hetero- và homo-oligome, thì γ -crystallin là các monome trong mắt. Hơn nữa, trong khi β -crystallin thể hiện lực đẩy trong dung dịch, thì γ -crystallin thể hiện tương tác hút được cho là do các tương tác protein hoặc nước không đặc hiệu. Cũng có giả thuyết rằng sự biến đổi thiol gây ra sự tạo thành các chất kết tụ γ -crystallin trong dung dịch.

Họ γ -crystallin ở người chứa năm thành viên, γ A-D crystalline và γ -S crystallin. γ A-D crystallin được biểu hiện sớm trong quá trình phát triển và được phát hiện đầu tiên trong lõi thủy tinh thể; γ C và γ D-crystallin là phổ biến nhất. Không gấp nếp và gấp

nếp lại của γ -D crystallin in vitro được cho thấy là dẫn đến gia tăng sự kết tụ protein do thiếu độ ổn định của protein được gấp nếp lại. γ S-crystallin được thể hiện là protein chính trong việc ngăn chặn sự kết tụ của các crystallin protein khác, làm cho thủy tinh thể trong suốt.

Không tuân theo lý thuyết, được tin rằng sự kết tụ của γ -crystallin là gồm cả hai hiện tượng tĩnh điện và kỵ nước, với lực tĩnh điện trội hơn. Bổ sung các protein sốc nhiệt α A- và α B-crystallin sẽ phá vỡ sự kết tụ γ -crystallin. Chất che giấu điện tích γ -crystallin có thể phá vỡ các tương tác tĩnh điện có thể thay thế cho hoạt tính chaperon của α -crystallin và ngăn ngừa/giảm kích thước γ -crystallin kết tụ.

Điều trị bằng các chất che giấu điện tích γ -crystallin có thể được sử dụng để điều trị các bệnh và hoặc các chứng bệnh tạo thành do sự kết tụ của γ -crystallin như bệnh đục thủy tinh thể và bệnh viễn thị. Như được sử dụng ở đây, bệnh đục thủy tinh thể là sự mờ đục của thủy tinh thể của mắt gây ra bởi các tương tác protein khác trong thủy tinh thể này. Các tương tác protein bao gồm giải gấp nếp của các protein cũng như các tương tác protein-protein như sự kết tụ. Bệnh viễn thị là sự suy yếu của việc nhìn do lớn tuổi hoặc tuổi già. Các triệu chứng của bệnh viễn thị bao gồm giảm khả năng xác định tiêu điểm với những vật ở gần, mỏi mắt, khó đọc chữ nhỏ, mệt trong khi đọc hoặc nhìn màn hình sáng, khó nhìn rõ chữ gần, kém sắc nét khi đọc chữ, cần sáng hơn và ánh sáng trực tiếp hơn khi đọc, cần giữ sách đọc xa hơn nữa để nhìn rõ, và đau đầu, đặc biệt là đau đầu khi nhìn gần. Những người bị bệnh viễn thị có thể có thị lực bình thường, nhưng khả năng xác định tiêu điểm với vật ở gần thì mất ít nhất một phần qua thời gian, và những người này cần kính cho những công việc yêu cầu nhìn gần, như đọc. Bệnh viễn thị ảnh hưởng hầu hết ở những người trên tuổi 40 ở mức lớn hơn hoặc nhỏ hơn.

Trong phương pháp ức chế sự tiến triển của sự tạo thành bệnh đục thủy tinh thể trong mắt, mắt có thể đã chứa một hoặc nhiều bệnh đục thủy tinh thể đang tiến triển hay hoàn toàn trước khi được tiếp xúc với chất che giấu điện tích γ -crystallin. Do đó, phương pháp này có thể được sử dụng để ức chế sự tạo thành hơn nữa bệnh đục thủy tinh thể trong mắt, hoặc để ức chế sự tạo thành bệnh đục thủy tinh thể thực sự từ bệnh đục thủy tinh thể đang tiến triển trong mắt. Theo cách khác, mắt có thể không bị bệnh đục thủy tinh thể đang tiến triển hoặc hoàn toàn trước khi được tiếp xúc với chất che giấu điện tích γ -crystallin.

Trong phương pháp đảo ngược sự tiến triển của sự tạo thành bệnh đục thủy tinh thể trong mắt, ít nhất là đảo ngược một phần hoặc hoàn toàn bệnh đục thủy tinh thể trong mắt đạt được bằng cách cho mắt tiếp xúc với chất che giấu điện tích γ -crystallin như được bộc lộ ở đây.

Tương tự, trong phương pháp ức chế sự tiến triển của bệnh viễn thị trong mắt, người bệnh đã trải qua một hoặc nhiều các triệu chứng của bệnh viễn thị trước khi mắt được tiếp xúc với chất che giấu điện tích γ -crystallin. Do đó, phương pháp này có thể được sử dụng để làm giảm sự tiến triển của các triệu chứng từng trải qua, hoặc để ức chế sự tạo thành các triệu chứng bổ sung của bệnh viễn thị. Theo cách khác, mắt có thể không bị các triệu chứng của bệnh viễn thị trước khi được tiếp xúc với chất che giấu điện tích γ -crystallin.

Trong phương pháp đảo ngược sự tiến triển của bệnh viễn thị trong mắt, ít nhất đảo ngược một phần hoặc toàn bộ các triệu chứng của bệnh viễn thị trong mắt đạt được bằng cách cho mắt tiếp xúc với chất che giấu điện tích γ -crystallin như được bộc lộ ở đây.

Như được sử dụng ở đây, chất che giấu điện tích γ -crystallin là phân tử thích hợp để cản trở các tương tác protein-protein tĩnh điện γ -crystallin dẫn đến sự kết tụ γ -crystallin. Trong một phương án, chất che giấu này không phải là polypeptit. Các chất che giấu điện tích γ -crystallin ngăn ngừa các chất kết tụ γ -crystallin không tạo thành và hoặc giảm kích thước của các chất kết tụ đã tạo thành từ trước.

Trong một phương án, chất che giấu điện tích γ -crystallin là dung dịch nồng độ muối cao, có nồng độ muối trên 400mM. Thuật ngữ “muối” như được sử dụng ở đây, được dự định bao gồm muối hữu cơ hoặc vô cơ, bao gồm nhưng không giới hạn ở một hoặc nhiều muối NaCl, KCl, các amoni halogenua như NH_4Cl , các kim loại kiềm thổ halogenua như CaCl_2 , natri axetat, kali axetat, amoni axetat, natri xitrat, kali xitrat, amoni xitrat, natri sulphat, kali sulphat, amoni sulphat, canxi axetat hoặc hỗn hợp của chúng. Các muối hữu cơ bổ sung bao gồm muối alkylamoni như etylamoni nitrat, natri xitrat, natri format, natri ascorbat, magie gluconat, natri gluconat, trimetamin hydroclorua, natri succinat, và các kết hợp của chúng. Không tuân theo lý thuyết, được tin rằng loại ion, ví dụ, Li^+ , Na^+ và K^+ , có thể ảnh hưởng đến khả năng của chất che giấu điện tích γ -crystallin trong việc ngăn ngừa sự kết tụ γ -crystallin.

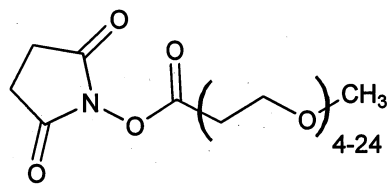
Phát hiện không ngờ ở đây là muối, ví dụ KCl, nồng độ nhỏ hơn 300mM không làm giảm kích thước của các chất kết tụ γ -crystallin. Tuy nhiên, KCl ở nồng độ từ 400 đến 1000mM, sự tạo thành kết tụ bị ức chế một cách hữu hiệu.

Trong phương án khác, chất che giấu điện tích γ -crystallin là phân tử hai chức chứa nhóm rời chuyển liên kết đồng hóa trị với phân tử lông (molecular bristle). Phân tử hai chức tương tác với điện tích trên các phân tử γ -crystallin, như các gốc lysin và arginin điện tích dương và các gốc glutamat và aspartat điện tích âm. Phân tử lông là loại ưa nước, hòa tan trong nước tạo ra khoảng cách giữa các phân tử γ -crystallin, ngăn ngừa sự kết tụ. Không tuân theo lý thuyết, được tin rằng phân tử hai chức phản ứng và đưa phân tử lông vào protein một cách hữu hiệu, và nhóm rời chuyển bị tách ra trong quá trình phản ứng. Phân tử lông gắn kết đồng hóa trị ngăn ngừa sự kết tụ của các phân tử γ -crystallin. Không tuân theo lý thuyết, được tin rằng các phân tử hai chức được mô tả ở đây cũng có thể tác dụng như là các chất ức chế tương tác β -crystallin.

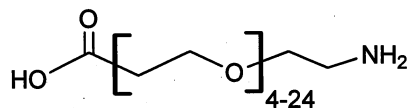
Các nhóm rời chuyển được lấy làm ví dụ (cũng được gọi là các nhóm phản ứng) bao gồm các nhóm chức axit succinimit và carboxylic, cụ thể là N-hydroxysuccinimit và COOH. Trong một số phương án, nhóm rời chuyển là tương hợp sinh học. Các ví dụ khác về các nhóm rời chuyển bao gồm isoxyanat, isothioxyanat, sulfonyl clorua, aldehyt, carbodiimit, axyl azit, anhydrua, flobenzen, cacbonat, este N-hydroxysuccinimit, imidoeste, epoxit, và flophenyl este. Fig.17 thể hiện các phương án của các nhóm rời chuyển trong đó nhóm R là phân tử lông. Nếu phân tử hai chức chứa COOH, thì nước rời chuyển khi nó phản ứng với nhóm amin của protein. Khi phân tử hai chức chứa N-hydroxysuccinimit thì nước không được giải phóng. Trong phản ứng NH_2 , nước rời chuyển khi NH_2 phản ứng với nhóm COOH trên protein.

Các ví dụ về phân tử lông bao gồm các polyetylen glycol thẳng hoặc nhánh có từ 4 nhóm oxyetylen trở lên, như từ 4 đến 200 nhóm oxyetylen. Cũng được bao gồm là các polyetylen glycol được cải biến như các alkoxy- và aryloxy polyetylen glycol có từ 4 đến 200, cụ thể là từ 4 đến 24 nhóm oxyetylen, alkloxy etylen hoặc aryloxy etylen. Các phân tử lông khác bao gồm poly(2-hydroxypropyl)metacrylamit (HPMA), poly(2-hydroxyetyl)-metacrylat (HEMA), poly(2-oxazilin), poly(m-phosphocholin), poly lysin, và axit poly glutamic. Fig.18 thể hiện các phương án của các phân tử lông. Trong một phương án, phân tử lông có trọng lượng phân tử trung bình bằng số là từ 150 đến 8000.

Trong một phương án cụ thể, chất che giấu điện tích γ -crystallin hai chức là:



hoặc



Trong một phương án, các chất che giấu điện tích γ -crystallin hai chức được mô tả ở đây cũng hữu ích trong điều trị các bệnh liên quan đến sự gấp nếp protein như bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, và bệnh Huntington. Trong một phương án cụ thể, các chất che giấu điện tích γ -crystallin hai chức được dùng dưới dạng chế phẩm dùng qua đường miệng.

Trong một phương án, chất che giấu điện tích γ -crystallin không phải là polypeptit. “Polypeptit”, “peptit” và “protein” được sử dụng có thể thay thế lẫn nhau ở đây dùng để chỉ polyme của các gốc amino axit. Các thuật ngữ áp dụng với các amino axit polyme trong đó một hoặc nhiều gốc amino axit là bất chương hóa học nhân tạo của amino axit xuất hiện trong tự nhiên tương ứng, cũng như các amino axit polyme xuất hiện trong tự nhiên và các amino axit polyme không xuất hiện trong tự nhiên.

Ưu điểm của các chất che giấu điện tích γ -crystallin được mô tả ở đây là chúng được mong đợi là hữu hiệu với sự có mặt của các biến đổi sau dịch mã của γ -crystallin, bao gồm, ví dụ, chuyển hóa amit, oxy hóa, các connexin được cải biến và mất chức, và nồng độ cao của các ion vô cơ và hữu cơ như Ca^{+2} .

Các chất che giấu điện tích γ -crystallin được tiếp xúc với mắt để ức chế sự tiến triển của bệnh đục thủy tinh thể và hoặc giảm sự tồn tại bệnh đục thủy tinh thể, hoặc để ức chế và hoặc giảm các triệu chứng của bệnh viễn thị. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “việc cho tiếp xúc mắt” bao gồm các phương pháp dùng trực tiếp chất che giấu điện tích γ -crystallin lên mắt. Trong phương pháp được mô tả ở trên, các phương pháp thích hợp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để cho mắt tiếp xúc với hợp chất. Các ví dụ về các phương pháp này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hợp chất được tiêm vào mắt, được nhỏ hoặc được phun vào

mắt, được dùng dưới dạng dụng cụ dùng cho mắt, dùng liệu pháp ion hóa, hoặc các cách dùng tại chỗ khác cho mắt.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lượng hữu hiệu ức chế bệnh đục thủy tinh thể” có nghĩa là lượng sẽ ức chế sự tiến triển hoặc sự tạo thành bệnh đục thủy tinh thể trong mắt hoặc ức chế sự tiến triển hoặc sự tạo thành bệnh đục thủy tinh thể chín muồi khỏi sự tiến triển của bệnh đục thủy tinh thể đã có trong mắt. Lượng hữu hiệu ức chế bệnh đục thủy tinh thể của chất che giấu điện tích γ -crystallin sẽ phụ thuộc vào các yếu tố khác nhau đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các yếu tố này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kích thước của mắt, số lượng và sự tiến triển của bệnh đục thủy tinh thể đã có hoặc đang tiến triển trong mắt, và cách dùng. Lượng hữu hiệu ức chế bệnh đục thủy tinh thể cũng sẽ phụ thuộc vào việc được phẩm được dùng một lần, hay được phẩm được dùng định kỳ, qua mỗi khoảng thời gian. Khoảng thời gian có thể là số ngày, tuần, tháng, hoặc năm. Trong một phương án, lượng hữu hiệu ức chế bệnh đục thủy tinh thể của chất che giấu điện tích γ -crystallin, cụ thể là các phân tử hai chức được mô tả ở đây, là nằm trong khoảng từ 0,001g đến 0,1g. Cụ thể, lượng hữu hiệu ức chế bệnh đục thủy tinh thể là nằm trong khoảng từ 0,01g đến 0,05g.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lượng hữu hiệu ức chế bệnh viễn thị” có nghĩa là lượng sẽ làm giảm hội chứng của bệnh viễn thị trong mắt hoặc ức chế sự tiến triển các triệu chứng bổ sung của bệnh viễn thị trong mắt. Lượng hữu hiệu ức chế bệnh viễn thị của chất che giấu điện tích γ -crystallin sẽ phụ thuộc vào các yếu tố khác nhau đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các yếu tố này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kích thước của mắt, số lượng và loại hội chứng đã có sẵn trong bệnh nhân, và cách dùng. Lượng hữu hiệu ức chế bệnh đục thủy tinh thể cũng sẽ phụ thuộc vào việc được phẩm được dùng một lần, hay được phẩm được dùng định kỳ, qua mỗi khoảng thời gian. Khoảng thời gian có thể là số ngày, tuần, tháng, hoặc năm. Trong một phương án, lượng hữu hiệu ức chế bệnh viễn thị của chất che giấu điện tích γ -crystallin, cụ thể là các phân tử hai chức được mô tả ở đây, là nằm trong khoảng từ 0,001g đến 0,1g. Cụ thể, lượng hữu hiệu ức chế bệnh viễn thị là nằm trong khoảng từ 0,01g đến 0,05g.

Như được sử dụng ở đây thuật ngữ “chế phẩm dùng cho mắt” dùng để chỉ chế phẩm được dụng, dụng cụ dẫn thuốc, cơ chế hoặc hệ thích hợp để dùng cho mắt. Thuật

ngữ “các chế phẩm dùng cho mắt” bao gồm nhưng không giới hạn ở các dung dịch, các huyền phù, dạng gel, thuốc mỡ, dạng phun, các dụng cụ giải phóng kéo dài hoặc dạng chế phẩm bất kỳ khác, dụng cụ hoặc cơ chế thích hợp để dẫn thuốc ngắn hạn hoặc dài hạn các chất ức chế tương tác tĩnh điện β L-crystallin cho mắt. Ngược lại với các chế phẩm dùng qua đường miệng, ví dụ, chế phẩm dùng cho mắt thể hiện các đặc tính kỹ thuật đặc biệt kết hợp với việc dùng chúng cho mắt, bao gồm việc sử dụng các chất dẫn được dùng dùng cho mắt tránh gây ra các phản ứng khác nhau như, ví dụ, phản ứng kích ứng kết mạc và giác mạc, đóng mí mắt, chảy nước mắt và đau. Chế phẩm dùng cho mắt cụ thể ưu tiên là ở dạng các dung dịch hoặc các huyền phù dùng cho mắt (tức là, thuốc nhỏ mắt), thuốc mỡ tra mắt, hoặc dạng gel tra mắt chứa các chất ức chế tương tác tĩnh điện β L-crystallin. Phụ thuộc vào dụng cụ thể được chọn, các chế phẩm này có thể chứa các tá dược khác nhau như chất đệm, chất đẳng trương hóa, chất hòa tan, chất bảo quản, chất làm tăng độ nhớt, chất tạo chelat, chất chống oxy hóa, chất kháng sinh, đường, và chất điều chỉnh độ pH.

Các ví dụ về chất bảo quản bao gồm, nhưng không giới hạn ở clobutanol, natri dehydroaxetat, benzalkoni clorua, pyridin clorua, rượu phenetylic, este của axit parahydroxybenzoic, benzethoni clorua, copolyme dihalogen hóa ưa nước của etylen oxit và dimetyl etylen-imin, hỗn hợp của chúng, và các chất tương tự. Chất làm tăng độ nhớt có thể được chọn, ví dụ, từ metylxenluloza, hydroxyetylxenluloza, carboxymetylxenluloza, hydroxypropylmetylxenluloza, rượu polyvinyllic, carboxymetylxenluloza, chondroitin sulfat, và các muối của chúng. Chất hòa tan thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dầu thầu dầu hydro hóa polyoxyetylen, polyetylen glycol, polysorbat 80, và polyoxyetylen monostearat. Chất tạo chelat thông thường bao gồm, nhưng không giới hạn ở, natri edetat, axit xitric, các muối của axit diethylentriamin pentaaxetic, axit diethylentriamin pentametylenphosphonic, và các chất ổn định như natri edetat và natri hydro sunfit.

Các ví dụ về các chất đệm bao gồm, nhưng không giới hạn ở các chất đệm borat, các chất đệm phosphat, các chất đệm cacbonat, các chất đệm axetat và các chất tương tự. Nồng độ của chất đệm trong chế phẩm dùng cho mắt có thể thay đổi trong khoảng từ 1mM đến 150mM hoặc lớn hơn, phụ thuộc vào chất đệm cụ thể được chọn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất dẫn” được dự định bao gồm chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược thích hợp để sử dụng cho mắt. “Tá dược” dùng để

chi thành phần tạo ra một hoặc nhiều khối, tạo ra các đặc tính bào chế thích hợp, giúp kiểm soát tốc độ hòa tan, và tạo ra các đặc tính mong muốn bổ sung cho các chế phẩm này. Cụ thể, các tá dược được chọn sao cho chế phẩm dùng cho mắt không gây chảy nước mắt làm cuốn mất hoạt chất. Các tá dược chấp nhận được đã được biết rõ bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, họ sẽ biết lựa chọn chúng phụ thuộc vào chế phẩm mong muốn.

Trong một phương án, chất che giấu điện tích γ -crystallin được dùng ở dạng dụng cụ dùng cho mắt, như kính áp tròng hoặc nút chặn ống dẫn nước mắt. Các dụng cụ dùng cho mắt thích hợp bao gồm các dụng cụ tương hợp sinh học với tác dụng hiệu chỉnh, mỹ phẩm hoặc điều trị.

Trong một phương án, chất che giấu điện tích γ -crystallin có thể được dính vào, được kết hợp vào hoặc kết hợp với kính áp tròng, tùy ý dưới dạng chế phẩm giải phóng có kiểm soát. Kính áp tròng có thể được sản xuất sử dụng các nguyên liệu đã biết, ví dụ các hydrogel, silicon hydrogel, silicon elastome và nguyên liệu có thể thấm khí như polymethylmetacrylat (PMMA), các polyme este của axit metacrylic, các copolyme của monome oligosiloxanylalkyl(meth)acrylat/axit metacrylic và các chất tương tự. Các ví dụ cụ thể về các nguyên liệu cho kính dùng cho mắt mềm chứa nước bao gồm các nguyên liệu được mô tả trong patent Mỹ số 5,817,726, các polyme 2-hydroxyetyl metacrylat như được mô tả trong patent Mỹ số 5,905,125, các nguyên liệu kính dùng cho mắt như được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Châu Âu số 781,777, kính hydrogel được phủ bằng lớp lipid cải tiến như được mô tả trong patent Mỹ số 5,942,558; tất cả được kết hợp ở đây để mô tả kính áp tròng. Nói chung kính áp tròng được sử dụng như kính kiểu giác mạc cứng hoặc không mềm dẻo, và kính kiểu gel, hydrogel hoặc mềm được sản xuất từ các nguyên liệu đã biết nêu trên có thể được sử dụng.

Thông thường trong ngành công nghiệp kính áp tròng, kính áp tròng được chia theo đặc tính thành hai loại chính; hydrogel thông thường và silicon. Các hydrogel cơ bản thông thường bắt đầu bằng poly(hydroxyetyl metacrylat) (poly HEMA) và liên quan đến polyHEMA copolyme với các gốc ưa nước khác như n-vinyl pyrrolidon (nVP), acrylamit, dimetyl acrylamit, và các phosphorylcholin metacrylat hóa. Các kính rệu polyvinyllic cũng có thể được sử dụng.

Các hydrogel silicon (SiH) thường bao gồm các copolyme của các monome metacrylat hóa hoặc monome meth(acrylamit) silicon, các tiền polyme hoặc macrome với các monome hydrogel điển hình thông thường. Các ví dụ về các monome silicon bao gồm “Tris”, tận cùng bằng alkyl, polydimetylsiloxan metacrylat hóa (PDMS), và các copolyme khối của silicon và các monome ưa nước. Các copolyme ba khối ABA là phổ biến trong đó nhóm A là khối ưa nước và nhóm B là khối monome silicon. Ngoài các metacrylat, các nhóm phản ứng khác bao gồm vinyl, acrylamit, hoặc nhóm phản ứng khác bất kỳ có khả năng polyme hóa phản ứng chuỗi. Tạo liên kết ngang và polyme hóa cũng có thể thu được qua polyme hóa tăng trưởng từng bước sử dụng các monome có hai chức. Một ví dụ là phản ứng của nhóm hydroxyl với nhóm axit carboxylic trong hai amino axit hoặc từ axit terephthalic và etylen glycol.

Các phương pháp phủ nền huyết thanh thường được sử dụng trên silicon hydrogel bao gồm các lớp phủ huyết thanh và huyết thanh oxy hóa.

Chế phẩm chứa chất che giấu điện tích γ -crystallin giải phóng kéo dài có thể được bào chế, ví dụ, bằng cách kết hợp trong, kết hợp với hoặc bám dính vào kính áp tròng, chế phẩm chứa chất che giấu điện tích γ -crystallin theo các phương pháp đã biết để sản xuất kính áp tròng có thuốc được giải phóng kéo dài như được mô tả trong các patent Mỹ số 5,658,592; 6,027,745; công bố sáng chế quốc tế số WO2003/003073; đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US-2005-0079197, được kết hợp ở đây để mô tả kính áp tròng và giải phóng kéo dài. Cụ thể, kính áp tròng có thể được bào chế bằng cách cho chất che giấu điện tích γ -crystallin bám dính lên một phần tác nhân giải phóng kéo dài được nghiền mịn hoặc gel như polyvinyl pyrrolidon, natri hyaluronat và các chất tương tự. Ngoài ra, giải phóng kéo dài có thể được tạo thành bằng cách bào chế chế phẩm dạng vật chứa chất che giấu điện tích γ -crystallin như bằng cách sản xuất kính áp tròng từ thành phần tạo ra bề mặt trước của thủy tinh thể này và thành phần tạo ra bề mặt sau của thủy tinh thể này.

Trong một phương án, chất che giấu điện tích này có thể được đưa vào nước hoặc thủy tinh dưới dạng tiêm giải phóng kéo dài.

Trong một phương án, chất che giấu điện tích γ -crystallin được dùng trong nút chặn ống dẫn nước mắt. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ nút chặn ống dẫn nước mắt

dùng để chỉ dụng cụ có kích thước và hình dạng thích hợp để chèn vào bên dưới hoặc bên trên ống lệ của mắt qua, lần lượt, bên dưới hoặc bên trên điểm lệ.

Trong một phương án, chất che giấu điện tích γ -crystallin được dùng bằng liệu pháp ion hóa. Liệu pháp ion hóa là kỹ thuật sử dụng điện tích nhỏ để dẫn thuốc hoặc các chất hóa học khác qua da.

Trong một phương án, chế phẩm dùng cho mắt được dùng sử dụng siêu âm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được minh họa hơn nữa bằng các ví dụ không giới hạn dưới đây.

Ví dụ 1: Nhân dòng γ -crystallin

Các trình tự ADN γ D- và γ S-crystallin trong pQe1 plasmit được cung cấp bởi King Labs ở Massachusetts Institute of Technology (Cambridge, MA). Các trình tự protein γ -crystallin chứa đuôi histidin có đầu tận cùng N 6x (his tag) cho mục đích tinh chế. Các plasmit được chuyển vào dòng tế bào khả biến nhân dòng để tạo thành ADN plasmit bổ sung. Sau đó các plasmit được chuyển vào dòng tế bào khả biến biểu hiện để tổng hợp protein (các tế bào TAM 1 *E. coli* (Active Motif, Carlsbad, CA)).

ADN plasmit γ -crystallin được chuyển vào các tế bào M15pRep *E. coli* theo cách hóa học để tổng hợp protein. 1L môi trường nuôi cấy được sinh trưởng để tinh chế protein. Protein γ -crystallin được tinh chế bằng sắc ký ái lực Ni. Đuôi His có đầu tận cùng N trên protein γ -crystallin liên kết ưu tiên với cột Ni. Protein liên kết có thể được rửa giải bằng gradient imidazol liên kết cạnh tranh với Ni, giải phóng protein tinh khiết. Độ tinh khiết được xác định bằng sắc ký điện di gel SDS PAGE và sắc ký lỏng protein nhanh (FPLC).

Ví dụ 2: Ảnh hưởng của độ pH và muối lên γ D- và γ S- crystallin được tinh sạch

Vì độ pH và muối có ảnh hưởng đến sự kết tụ của β -crystallin, nên ảnh hưởng của độ pH và muối lên γ -crystallin cũng được nghiên cứu. Kích thước hạt được đo sử dụng phương pháp tán xạ ánh sáng động lực học (DLS).

Phương pháp tán xạ ánh sáng động lực học thử nghiệm (DLS) được đo sử dụng máy đo góc ALV có bộ tương quan ALV-5000/E được trang bị 288 kênh (ALV, Langen Germany) và laze argon 2W (Coherent Inc., Santa Clara, CA), với dòng điện làm việc xấp xỉ 40 mW. Cường độ tán xạ được đo ở các góc nằm trong khoảng từ 30°

đến 90° cách nhau 5° , tương ứng với một vectơ sóng tán xạ (q) nằm trong khoảng từ $8,41 \times 10^6$ đến $2,30 \times 10^7 \text{ m}^{-1}$. Vectơ sóng tán xạ này được định nghĩa là $q = 4\pi n \sin(\theta/2) / \lambda$, nếu θ là góc tán xạ, và $\lambda = 514,5$, bước sóng của laze argon trong chân không, và n là 1,33, chỉ số khúc xạ của nước. Nhiệt độ của mẫu được giữ ở nhiệt độ hằng định từ 4 đến $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$ bằng bể nước tuần hoàn.

Chức năng tương quan được phân tích sử dụng phương pháp phân tích CONTIN để tính toán thời gian trễ với các chức năng tương quan tại các góc được đo. Các đỉnh biểu thị kiểu khuếch tán của các protein. Thời gian trễ (τ) được chuyển thành Γ và được vẽ đồ thị tính theo q^2 . Độ dốc của đường phù hợp là hệ số khuếch tán (D). Các đường này được làm cho phù hợp sao cho phần bị chắn là zero vì giá trị khác zero của $q=0$ là phi vật lý. Đồ thị Γ tính theo q^2 là tuyến tính với các giá trị r^2 là 0,95 hoặc lớn hơn.

Tiến hành đo DLS trên cả hai protein $\gamma\text{D-}$ và $\gamma\text{S-crystallin}$ được cải biến và không được cải biến bằng chất đệm 150mM NaCl, 20mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ độ pH 6,8 ở nồng độ 0,5mg/mL. Tất cả các dung dịch được lọc bằng màng PVDF kỵ nước $0,22\mu\text{m}$ (Fisher Scientific) vào các ống thủy tinh bo silicat đường kính 10mm và được hàn kín. Các dung dịch được để cân bằng trong ba mươi phút trước khi đo phương pháp tán xạ ánh sáng.

Từng dung dịch protein $\alpha\text{-A}$, $\alpha\text{-B}$, $\gamma\text{D-}$ và $\gamma\text{-S crystallin}$ được nghiên cứu để hiểu mức kích thước và các protein này hoạt động như thế nào trong dung dịch loãng. (Bảng 1) Nhiệt độ có ảnh hưởng một chút đến kích thước protein trong dung dịch như được đo bởi DLS.

Bảng 1: Đo DLS được tiến hành trên cả hai protein $\gamma\text{D-}$ và $\gamma\text{-S -crystallin}$ được cải biến và không được cải biến

	αA	αB	γD		γS	
Nhiệt độ ($^\circ\text{C}$)	R_h (nm)	R_h (nm)	R_{hf} (nm)	R_{hs} (nm)	R_{hf} (nm)	R_{hs} (nm)
4°	12	12	3	116	3	100
22°	12	13	2,8	104	2,7	102
37°	13	13	2,7	109	2,6	95

Xem xét rằng trọng lượng phân tử của α A-crystallin là 19,9kDa và α -B crystallin là 20,16kDa, kích thước được nhìn thấy trong thử nghiệm DLS là hằng định với tổ hợp α -crystallin đã biết trong các loại 300-1200kDa trong dung dịch cũng như trong mắt người.

3nm R_h với γ -crystallin biểu thị các loại protein đơn rất tương quan với các trọng lượng phân tử là 20,6kDa và 20,9kDa lần lượt với γ D- và γ -S crystallin monome. Cả hai loại này cũng thể hiện khối kết tụ với các giá trị R_h lần lượt là 110 và 100nm với γ D- và γ S- crystallin. Sự kết tụ của γ -crystallin đã được cho là do các tương tác hấp dẫn giữa γ -crystallin. Thiếu các tương tác protein-protein đặc hiệu trong γ -crystallin cho phép chúng tạo thành các chất kết tụ lớn hơn trong dung dịch.

γ -crystallin được đưa vào các điều kiện thử nghiệm khác nhau, bao gồm các độ pH (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11), các nồng độ KCl (100mM, 150mM, 300mM, 500mM, 1000mM) và nhiệt độ (4,5°C, 22°C, 37°C). Độ pH và nồng độ muối được điều chỉnh qua thẩm tách qua đêm ở nhiệt độ 4°C và nồng độ cuối cùng của chúng được điều chỉnh đến 1,0g/L.

Bảng 2: Hiệu quả của độ pH và muối trên γ D- và γ -S crystallin

Biến thể	γ D		γ S	
	R_{hf} (nm)	R_{hs} (nm)	R_{hf} (nm)	R_{hs} (nm)
100mM NaCl	2,8	108	2,7	104
150mM NaCl	2,8	104	2,7	102
300mM NaCl	2,6	91	2,9	100
400mM NaCl	2,7	-	2,6	-
500mM NaCl	2,8	-	2,5	-
1000mM NaCl	2,5	-	2,6	-
pH 5	3,9	100	4,8	141
pH 6	2,7	118	2,5	110
pH 8	2,9	102	3,0	96
pH 9	3,5	97	2,9	106
pH 10	3,2	-	3,4	90
pH 11	3,1	-	3,1	-

Như được thể hiện trong Bảng 2, các độ pH lớn hơn 10 loại bỏ các chất kết tụ khỏi dung dịch γ D- và γ S-crystallin. Các nồng độ muối KCl lớn hơn 300mM làm giảm các chất kết tụ γ -crystallin thành các hạt protein riêng rẽ. Các kết quả này chỉ ra rằng phần lớn các chất kết tụ của γ -crystallin có thể được phá vỡ hoặc được ngăn ngừa bằng cách tác động vào các tương tác tĩnh điện giữa các γ -crystallin.

Giả thiết rằng các liên kết disulfua có thể là trung gian của các chất kết tụ γ -crystallin quan sát được. DLS của các Protein γ -crystallin cũng được đo trong 5mM DTT, và với sự có mặt của 1,0g/L α -crystallin. Như được thể hiện trong Bảng 3, DTT không ảnh hưởng đến kích thước của các chất kết tụ γ -crystallin. Vì vậy, giả thiết này không đúng.

Hơn nữa, các protein α -crystallin được tổng hợp được trộn với các protein γ -crystallin để xác định khả năng chaperon của α -crystallin làm phá vỡ các chất kết tụ γ -crystallin. Mỗi α -A và α -B crystallin lần lượt được trộn riêng với γ D- hoặc γ S-crystallin với tỷ lệ mol là 3:1, bắt chước tỷ lệ được phát hiện trong thủy tinh thể mắt người. Tất cả các dung dịch được để cân bằng trong một giờ ở nhiệt độ 4°C. Khi ủ với α -A hoặc α -B crystallin, một lượng lớn γ -crystallin kết tụ kích thước vài trăm nanomet biến mất và các phân tử lớn γ -crystallin và α -crystallin riêng biệt được quan sát thấy. (Bảng 3) Các dữ liệu này hỗ trợ thông tin đã biết rằng α -crystallin ngăn chặn sự kết tụ protein không đặc hiệu nhờ đó ngăn ngừa sự kết tụ của các protein γ -crystallin.

Bảng 3: Ảnh hưởng của DTT và các chaperon trên γ D- và γ -S crystallin

	γ D		γ S	
	Rh _f	Rh _s	Rh _f	Rh _s
Chất phụ gia	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)
----	2,8	104	2,7	102
5mM DTT	2,6	108	3	102
α A	2,7	16	2,8	18
α B	3,2	17	3	19

Không tuân theo lý thuyết, giả thiết rằng sự gia tăng kích thước của α -crystallin (từ 63-68nm đến 75nm) là do α -crystallin tương tác với γ -crystallin biến tính hoặc bỏ gập nếp. Rõ ràng là việc bổ sung α -crystallin làm ngăn ngừa hoặc phá vỡ phần lớn các loại γ -crystallin không tạo thành trong dung dịch và bằng cách phá vỡ tĩnh điện

tích giữa các γ -crystallin. α -crystallin có khả năng phá vỡ phần lớn các chất kết tụ của γ -crystallin xuất hiện ở nồng độ γ -crystallin cao. Vì vậy, thiếu α -crystallin, γ -crystallin sẽ tạo thành các chất kết tụ hòa tan lớn qua lực tĩnh điện có thể bị phá vỡ ở độ pH cao và nồng độ muối cao.

Các nguyên liệu và phương pháp xác định đặc tính của các chất kết tụ

Cải biến hóa học của γ D- và γ S- crystallin được tiến hành để cải biến cách kết tụ của các protein này. Các phương pháp được sử dụng để xác định đặc tính của γ D- và γ S- crystallin được cải biến là sự ion hóa theo cơ chế giải hấp sử dụng nguồn laser với sự hỗ trợ của chất nền - thời gian bay (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight: MALDI-TOF), lưỡng sắc vòng tròn, và tán xạ ánh sáng động lực học.

Sự ion hóa theo cơ chế giải hấp sử dụng nguồn laser với sự hỗ trợ của chất nền - Thời gian bay

Xấp xỉ 2mg protein γ -crystallin bình thường hoặc được cải biến được thẩm tách qua đêm vào 5mM tris (hydroxymetyl) aminometan hydroclorua (Tris HCl) độ pH 7. Dung dịch này được làm đông khô (đông khô) qua đêm để thu được bột protein crystallin khô.

Dữ liệu phổ khối thu được trên máy đo phổ khối Omnisflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Inc., Billerica MA) được trang bị laser nitơ 337nm. Các mẫu (2mg/mL) được trộn (1:1) với chất nền bao gồm 0,1% axit trifloaxetic (TFA), 50% axetonitril và axit 3,5-dimethoxy-4-hydroxyxinnamic. 1 μ L dung dịch được lắng đọng huyền phù trên tấm bia bằng thép không gỉ. Dụng cụ được sử dụng theo cách tuyến tính để thu được dữ liệu.

Lưỡng sắc vòng tròn

Các mẫu crystallin được thẩm tách qua đêm vào dung dịch đệm $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 10mM độ pH 6,8 và được đo ở nồng độ 0,5mg/mL. Phổ CD được đo trên máy quang phổ phân cực Jasco J715 ở nhiệt độ 22°C sử dụng tế bào thạch anh có độ dài 1mm đường dẫn. Sau khi để mẫu cân bằng trong năm phút, phổ thu được nằm trong khoảng từ 250 đến 195nm.

Phương pháp tán xạ ánh sáng động lực học

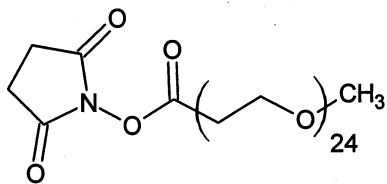
Phương pháp tán xạ ánh sáng động lực học (Experimental dynamic light scattering: DLS) thử nghiệm được đo sử dụng máy đo góc ALV có bộ tương quan ALV-5000/E được trang bị 288 kênh (ALV, Langen Germany) và laze argon 2W (Coherent Inc., Santa Clara, CA), với cường độ làm việc xấp xỉ 40 mW. Cường độ tán xạ được đo ở các góc từ 30° đến 90° ở mỗi quãng 5° , tương ứng với vectơ bước sóng tán xạ (q) nằm trong khoảng từ $8,41 \times 10^6$ và $2,30 \times 10^7 \text{ m}^{-1}$. Vectơ bước sóng tán xạ được định nghĩa là $q = 4\pi n \sin(\theta/2) / \lambda$, trong đó θ là góc tán xạ, và $\lambda = 514,5$, bước sóng của laze argon trong chân không, và n là 1,33, chỉ số khúc xạ của nước. Nhiệt độ của mẫu được giữ ở nhiệt độ hằng định là từ 4 đến $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$ bằng bể nước tuần hoàn.

Chức năng tương quan được phân tích sử dụng phân tích CONTIN để tính toán thời gian trễ đối với các chức năng tương quan tại các góc được đo. Các đỉnh biểu thị kiểu khuếch tán của các protein. Thời gian trễ (τ) được chuyển thành Γ và được vẽ đồ thị tính theo q^2 . Độ dốc của đường phù hợp là hệ số khuếch tán (D). Các đường là thích hợp sao cho phần bị chắn là zero vì giá trị khác zero của $q=0$ là phi vật lý. Đồ thị Γ tính theo q^2 là tuyến tính với các giá trị r^2 của 0,95 hoặc lớn hơn.

Tiến hành đo DLS trên cả hai protein γ D- và γ S-crystallin được cải biến và không được cải biến ở chất đệm 150mM NaCl, 20mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ độ pH 6,8 ở nồng độ 0,5mg/mL. Tất cả các dung dịch được lọc bằng màng PVDF kỵ nước $0,22 \mu\text{m}$ (Fisher Scientific) vào các ống thủy tinh bo silicat đường kính 10mm và được hàn kín. Các dung dịch được để cân bằng trong ba mươi phút trước khi đo phương pháp tán xạ ánh sáng.

Ví dụ 3- Cải biến hóa học của γ D- và γ S- crystallin bằng PEG24

Cải biến thứ nhất của γ -crystallin được thực hiện với NHSPEG24. Các axit amin chứa các amin bậc một, lysin và arginin, có thể tiến hành thế ái nhân trên poly(etylen glycol) (PEG) chức N-hydroxy succinimit (NHS). NHS là este hoạt hóa thúc đẩy cơ chế phản ứng $\text{Sn}2$ vì nó là nhóm rời chuyển tốt. Quy trình thế ái nhân protein được cải biến bằng PEG hoặc protein γ -crystallin PEG hóa. PEG hóa được chọn vì cải biến của các protein bằng PEG được thể hiện là làm tăng độ hòa tan và không ảnh hưởng cấu trúc ba chiều hoặc các tính chất. Cụ thể, PEG24 được chọn vì trọng lượng phân tử hợp lý (1100,39) được bổ sung và độ dài cánh tay đệm (8,82nm).



NHSPEG24

Cải biến của γ -crystallin bằng PEG24 thành công như được chứng minh bởi trọng lượng phân tử γ -crystallin được gia tăng nhiều được quan sát trong MALDI-TOF. Cường độ tương đối tối đa cho γ D-crystallin là ở 24,148 m/z hoặc 2 đơn vị PEG24 trong khi đối với γ S-crystallin đỉnh xuất hiện ở 26,711 m/z tương ứng với 4 đơn vị PEG24. (Fig.1) Chất phản ứng dư và các điều kiện phản ứng là phù hợp vì không có γ -crystallin không được cải biến có mặt trong dung dịch. Dữ liệu MALDI-TOF có độ phân giải cao hơn của γ D-crystallin thể hiện hai đỉnh phân biệt bổ sung ở 23,056 m/z và 25,206 m/z tương ứng với các biến đổi 1 và 3 PEG24.

Quang phổ CD chứng minh rằng cả hai protein crystallin thể hiện là giữ được trạng thái nguyên bản của chúng mặc dù có cải biến. γ D-crystallin thể hiện các đỉnh và độ sâu gia tăng có thể được cho là do sự khác biệt nhẹ về nồng độ protein. Rất phù hợp với dữ liệu thử nghiệm được mong đợi như đã được chứng minh từ trước rằng PEG hóa không cản trở cấu trúc thứ cấp của protein. (dữ liệu không được thể hiện)

DLS được tiến hành trên γ D- và γ S-crystallin được cải biến bằng PEG24 ở nhiệt độ 22°C và 37°C. NICEF tạo ra chức năng phân bố với với một bộ các đỉnh duy nhất có sự phụ thuộc vào góc có thể thấy trên đồ thị của Γ tính theo q^2 . (Các Fig.2-4) Protein γ -crystallin được cải biến bằng PEG24 có kích thước phân bố nhỏ không có kiểu bổ sung trong thời gian thư giãn dài hơn chỉ ra sự tạo thành kết tụ. Đối với γ D-crystallin, R_h được tính toán từ hệ số khuếch tán là 3,1nm ở nhiệt độ 22° và 37°C, trong khi γ S-crystallin có R_h là 3,2nm ở nhiệt độ 22° và 37°C. Các giá trị R_h tương quan tốt với các trọng lượng phân tử tương ứng 24,1kDa và 26,7kDa của γ D- và γ S-crystallin, được đo bởi MALDI-TOF.

PEG hóa của γ -crystallin bởi NHSPEG24 ngăn ngừa một cách hữu hiệu bất kỳ sự kết tụ nào trong các dung dịch pha loãng như được thể hiện trong DLS. PEG là polyme ưa nước và được thể hiện là làm tăng độ hòa tan của protein trong dung dịch. Không tuân theo lý thuyết, được tin rằng nếu hiện tượng kết tụ là kết quả của độ hòa tan

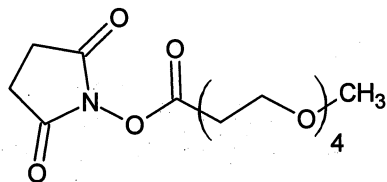
kết hợp với các tương tác kỵ nước hoặc tĩnh điện, thì độ hòa tan kết hợp với PEG hóa được gia tăng ngăn ngừa các protein γ -crystallin khỏi bị kết tụ.

Cùng chung ý tưởng, không tuân theo lý thuyết, được tin rằng toàn bộ điện tích bề mặt của các protein đã bị thay đổi bởi phản ứng với PEG. Tại điểm đẳng điện của protein, có sự suy giảm độ hòa tan tạo ra từ sự trung hòa điện tích kết hợp với điểm đẳng điện. Các axit amin chứa các amin bậc một là các vị trí đích cho sự biến đổi loại này. Amin bậc một của lysin và arginin có thể có điện tích dương kết hợp với nó phụ thuộc vào sự tạo thành protein và các điều kiện dung dịch. Bằng cách cho NHSPEG phản ứng với các nhóm lysin và arginin các vị trí điện tích tiềm năng bị chiếm giữ bởi PEG ưa nước, nhờ đó thay đổi điện tích bề mặt protein. Nếu hiện tượng kết tụ là kết quả của các tương tác tĩnh điện hoặc kết quả của các protein gần điểm đẳng điện thì lý do này sẽ giải thích tại sao không có kết tụ trong dung dịch. Cải biến của protein γ -crystallin bằng PEG qua các cơ chế phản ứng khác sẽ được sử dụng để đánh giá khả năng này.

Không tuân theo lý thuyết, lời giải thích cuối cùng cho việc không có các chất kết tụ trong dung dịch là phân đậm. Trong lĩnh vực keo hình cầu cứng đã biết rằng việc bổ sung các phân tử đậm có thể giảm sự kết tụ. Bổ sung gốc PEG24 vào γ -crystallin tạo ra phân tử đậm ưa nước trên bề mặt của protein. Khoảng cách giữa các protein được tạo thành bởi PEG có thể là tất cả những gì cần thiết để ngăn ngừa sự kết tụ của protein γ -crystallin.

Ví dụ 4- Cải biến hóa học của γ D- và γ S- crystallin bằng PEG4

Các protein γ -crystallin được cải biến bằng PEG4 để nghiên cứu ảnh hưởng của độ dài cánh tay đậm với sự kết tụ protein γ -crystallin. Phản ứng được tiến hành lại với PEG chức NHS (NHSPEG4) làm phương pháp cải biến chúng. PEG4 có trọng lượng phân tử được bổ sung là 219,33g/mol và cánh tay đậm là 1,6nm, cả hai phần này đều nhỏ hơn PEG24.



NHSPEG4

Dữ liệu MALDI-TOF thể hiện sự gia tăng tổng trọng lượng phân tử γ -crystallin chỉ ra sự biến đổi bằng PEG4. (Fig.5) Cường độ tương đối cao nhất quan sát được với γ D-crystallin xuất hiện ở 22,820 m/z, trong khi với γ S-crystallin cường độ này xuất hiện ở 23,329 m/z lần lượt tương ứng với 4 và 5 đơn vị PEG4, được bổ sung vào protein bất kỳ. Cần lưu ý rằng có phân bố Gaussian xung quanh đỉnh cường độ tương đối đề xuất rằng có các protein chứa cả hai mức biến đổi lớn hơn và nhỏ hơn. Dữ liệu MALDI-TOF cũng thể hiện rằng không có mặt protein crystallin không được cải biến.

Quang phổ CD lại thể hiện rằng PEG hóa không ảnh hưởng đáng kể đến cấu trúc bậc hai của các protein γ và α -crystallin. (dữ liệu không được thể hiện) Quan sát thấy cân bằng tuyệt vời giữa các protein γ -crystallin tự nhiên và được điều chỉnh bằng PEG4.

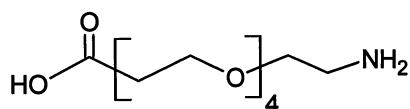
NICF của protein γ -crystallin được cải biến bằng PEG4 có phân rã lũy thừa đơn xác định quy mô kích thước đơn có mặt trong dung dịch. (Fig.6) Tương tự γ -crystallin được cải biến bằng PEG24, không có kết tụ có mặt trong dung dịch. Chức năng phân bố (Fig.7) lại thể hiện với một bộ các đỉnh duy nhất chứng minh sự phụ thuộc góc tuyến tính trong đồ thị Γ tính theo q^2 (Fig.8). R_h của γ D-crystallin được đo bằng DLS lần lượt là 2,8 và 2,9nm ở nhiệt độ 22°C và 37°C. Tương quan kích thước R_h tốt với trọng lượng protein được cải biến gần bằng 22,8kDa. Sự gia tăng nhẹ kích thước monome protein cũng có thể được quan sát trong DLS dưới dạng R_h của protein γ D-crystallin được cải biến hơi lớn hơn dạng ban đầu không được cải biến của nó. Protein γ S-crystallin được cải biến bằng PEG4 có R_h là 2,9 ở nhiệt độ 22°C và 37°C. Kích thước tổng cộng của protein được cải biến gia tăng so với γ S-crystallin không được cải biến và R_h thích hợp với trọng lượng phân tử từ xấp xỉ 23,3kDa.

Protein γ -crystallin được cải biến bằng NHSPEG4 và NHSPEG24 thể hiện không có sự kết tụ ở nhiệt độ 22°C và 37°C. Sự biến đổi bằng PEG4 thường tạo thành bốn đến năm phần bổ sung trọng lượng phân tử thấp trong khi trong trường hợp PEG24 từ hai đến ba nhóm được bổ sung với mỗi protein γ -crystallin. Số lượng các biến đổi cao hơn được tạo thành với mỗi protein bằng PEG4 không tạo ra lợi ích đáng kể trong ngăn ngừa sự kết tụ. Tương tự, bổ sung tổng trọng lượng lớn hơn với PEG24 vào γ -crystallin không tạo ra ưu điểm làm ngăn ngừa sự kết tụ.

Các protein γ -crystallin được cải biến bằng PEG24 có R_h hơi lớn hơn so với biến đổi bằng PEG4. Đối với cả hai biến đổi không tạo thành kết tụ được kết luận rằng độ dài cánh tay đệm không đóng góp đáng kể vào việc ngăn ngừa sự kết tụ. Dự đoán rằng chuỗi PEG lớn hơn sẽ tạo ra tương tự kết quả.

Ví dụ 5- Cải biến hóa học của γ D- và γ S- crystallin bằng CAPEG

Sự biến đổi bởi CAPEG4 được tiến hành để nghiên cứu cơ chế phản ứng thay thế với PEG hóa γ -crystallin. Ở độ pH sinh lý (6,8), amin bậc một của CAPEG4 hơi dương tính và có khả năng phản ứng với các axit amin, axit aspartic và axit glutamic điện tích âm. Theo cách khác, các axit amin điện tích dương vẫn có khả năng phản ứng với axit carboxylic của CAPEG4 (CA). CAPEG4 được chọn với các lý do tương tự như NHSPEG4, các chất này có trọng lượng phân tử được bổ sung với lượng nhỏ được bổ sung với mỗi đơn vị (265,3g/mol) và cánh tay đệm ngắn (1,81nm).



CAPEG4

MALDI-TOF thể hiện sự gia tăng đáng kể trọng lượng phân tử γ -crystallin là kết quả của sự biến đổi bởi CAPEG4. (Fig.9) không có γ -crystallin không được cải biến trong dung dịch nào đề xuất rằng các điều kiện phản ứng là phù hợp để biến đổi protein. Định cường độ tương đối ở 23,273 m/z cho γ D-crystallin biểu thị 5 đơn vị CAPEG được bổ sung vào protein này. Phổ MALDI-TOF độ phân giải cao hơn cho γ S-crystallin thể hiện vài đỉnh khối phân biệt bao gồm 22,867 m/z hoặc 2 đơn vị CAPEG4, cường độ tương đối tối đa ở 23,089 m/z hoặc 3 đơn vị CAPEG4, và 23,591 m/z hoặc 5 đơn vị CAPEG4.

Quang phổ CD của cải biến CAPEG4 của γ -crystallin thể hiện xu hướng tương tự với các biến đổi được thực hiện bằng PEG4 và PEG24. (Dữ liệu không được thể hiện) γ S-crystallin + CAPEG4 thể hiện tương quan tuyệt vời với γ S-crystallin protein không được cải biến. γ D-crystallin được cải biến lại thể hiện thay đổi nhẹ ở 220nm nhưng toàn bộ đường cong có hình dạng tương tự như γ D-crystallin tự nhiên.

Cải biến γ -crystallin bằng CAPEG cũng ngăn ngừa sự kết tụ của các protein. NICF có thể được mô tả bởi chức năng lũy thừa đơn tạo thành chức năng phân bố có sự

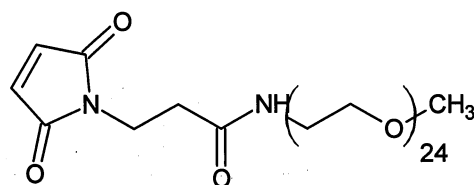
phụ thuộc Γ tính theo q^2 . (Fig.10-12) Protein γ -crystallin được cải biến được quan sát thấy ở dạng monome của nó ở cả hai nhiệt độ 22° và 37°C trong đó R_h là độc lập với nhiệt độ. Đối với γ D-crystallin, hệ số khuếch tán tạo ra R_h được tính toán là 2,8nm, trong khi đối với γ S-crystallin giá trị này là 2,9m. Các giá trị R_h tương quan tốt với 23kDa và 23,5kDa trọng lượng phân tử được cải biến lần lượt của γ D- và γ S-crystallin, ngoài việc tương tự về kích thước với γ -crystallin được cải biến bằng PEG4.

PEG hóa bằng CAPEG ở độ pH sinh lý (6,8) hướng đến các axit amin có tính axit. Tương tự các phản ứng được thực hiện với NHSPEG, sự biến đổi CAPEG có thể trên toàn bộ điện tích bề mặt của protein. Bằng cách cho phản ứng với các axit amin điện tích âm, mạch PEG ưa nước chiếm lấy amino axit điện tích tiềm năng. Có kích thước và số lượng các biến đổi tương tự (bốn đến năm) như NHSPEG4, γ -crystallin được làm phù hợp bằng CAPEG4 đề xuất sự biến đổi tương tự. Ưu điểm lớn khi sử dụng CAPEG4 so với NHSPEG là không có nhóm rời chuyển NHS trong phản ứng.

Không tuân theo lý thuyết, sự biến đổi CAPEG lại đề xuất rằng điện tích bề mặt của protein là yếu tố chính tạo thành các chất kết tụ γ -crystallin. Vì gốc PEG được bổ sung vào protein cũng có thể thay thế bề mặt có bản chất kỵ nước, ngăn ngừa sự kết tụ. Thông tin quan trọng thu được từ các thử nghiệm này là sự biến đổi qua các axit amin có tính axit hoặc bazơ có thể ngăn ngừa sự kết tụ.

Ví dụ 6- Cải biến hóa học của γ D- và γ S- crystallin bằng mMPEG

PEG chức hóa maleimide là cơ chế phản ứng khác mà nhờ đó các protein γ -crystallin có thể được PEG hóa. Các nhóm thiol có thể bổ sung Michael trên liên kết đôi của nhóm chức maleimide. Cả hai protein γ -crystallin chứa nhiều gốc amino axit cysteine chứa nhóm cuối thiol. Do đó γ -crystallin được PEG hóa bằng mMPEG24 (MM) xuất hiện bởi các axit amin cysteine. Sự biến đổi qua cơ chế phản ứng này giống các thử nghiệm PEG hóa trước đây vì toàn bộ điện tích protein không bị ảnh hưởng. Cụ thể, mMPEG24 được chọn vì trọng lượng phân tử cao được bổ sung với mỗi đơn vị (1239,44g/mol) và cánh tay đệm dài (9,53nm) có thể so sánh bằng PEG24.



MMPEG24

Phổ MALDI-TOF của γ -crystallin được cải biến bằng mMPEG24 thể hiện ba đỉnh phân biệt có thể được quan sát với γ -crystallin không được cải biến ở mức tối thiểu hoặc không được cải biến. (dữ liệu không được thể hiện) Bốn đỉnh γ D-crystallin được quan sát ở 23187, 24426, 25666 m/z tương ứng với 1, 2, và 3 biến đổi. Trong trường hợp các đỉnh γ S-crystallin được quan sát ở 23565, 24426, và 25666 m/z tương ứng với 1, 2, và 3 biến đổi. Cường độ tương đối cao nhất cho cả hai protein crystallin xuất hiện ở 2 biến đổi.

Quan sát thấy cân bằng tuyệt vời giữa các protein γ -crystallin tự nhiên và được PEG hóa. Đã biết rằng trong một số trường hợp các nhóm thiol của cysteine có liên quan trong liên kết disulfua nội phân tử tạo nên độ toàn vẹn cho cấu trúc có cấu trúc bậc hai. Vì cả hai phổ MM γ D- và γ S-crystallin được cải biến thể hiện cấu trúc bậc hai tương tự γ -crystallin tự nhiên có thể kết luận rằng sự biến đổi này không làm thay đổi cấu trúc protein. (dữ liệu không được thể hiện)

γ -crystallin được PEG hóa qua các gốc cysteine của nó không ngăn ngừa sự kết tụ. Các đường cong NICEF (dữ liệu không được thể hiện) có sự phụ thuộc vào góc tạo nên chức năng phân bố có hai bộ đỉnh khác nhau (Fig.13). Đồ thị Γ tính theo q^2 thể hiện hai đoạn dốc với sự phụ thuộc góc tuyến tính chỉ ra sự có mặt của hệ số khuếch tán chậm và nhanh. (dữ liệu không được thể hiện) Ở nhiệt độ 37°C, kiểu chậm tạo thành ở R_h là 80nm cho γ D-crystallin và 85nm cho γ S-crystallin. Kích thước lớn chỉ ra rằng protein kết tụ trong dung dịch. Kiểu nhanh tương ứng với protein γ -crystallin monome, với R_h là 2,8nm và 3,0nm cho γ D- và γ S-crystallin ở nhiệt độ 37°C.

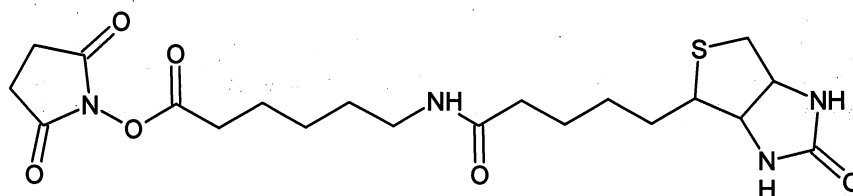
Thực tế là PEG hóa qua chức maleimide không ngăn ngừa sự kết tụ cung cấp thông tin quan trọng liên quan đến sự tạo thành các chất kết tụ γ -crystallin. Do cả hai MMPEG24 và NHSPEG24 tạo nên số lượng tương tự các biến đổi nên các nhóm trên diện tích bề mặt và các nhóm đệm xung quanh các protein γ -crystallin cũng phải tương tự. Quan sát thấy sự kết tụ bằng sự biến đổi MMPEG24 chứng minh rằng ngăn ngừa sự kết tụ có thể không phụ thuộc hoàn toàn vào các phân tử đệm ưa nước.

Một quan điểm chính về cơ chế kết tụ dựa vào sự nhận ra rằng PEG hóa protein qua các axit amin không điện tích không ngăn ngừa sự kết tụ. Sự khác biệt chính giữa MMPEG và NHSPEG hoặc CAPEG là PEG hóa qua phản ứng maleimide không hướng

tới các axit amin có điện tích của protein. Không tuân theo lý thuyết, điều này đề xuất rằng điện tích và tính điện bề mặt đóng vai trò chính trong sự tạo thành các chất kết tụ và cần được hướng tới khi phá vỡ sự kết tụ.

Ví dụ 7- Cải biến hóa học γ D- và γ S- crystallin bằng biotin

Biotin là phân tử thường được sử dụng để biến đổi protein do ái lực liên kết cao của nó với avidin. Các protein có thể được gắn thẻ bằng biotin, trải qua các phản ứng *in vivo* hoặc *in vitro*, chúng được tách hoặc được tinh chế từ khối bằng cách sử dụng cột avidin. Phân tử NHSBiotin được chọn vì nó phản ứng qua cùng cơ chế như PEG4 và PEG24 tuy nhiên phân tử được bổ sung sẽ không ưa nước nữa nhưng chứa nhóm cuối tích điện cao. Trọng lượng phân tử được bổ sung với mỗi đơn vị là 226,38g/mol với cánh tay đệm là 1,38nm.



NHSBiotin

Các protein γ -crystallin được cải biến thành công bằng biotin như được thể hiện trong MALDI-TOF. (dữ liệu không được thể hiện) Sự biến đổi các đỉnh γ D-crystallin là tám đơn vị (23758 m/z) trong khi đỉnh γ S-crystallin xuất hiện bốn đơn vị (23325 m/z). Cả hai hệ không thể hiện γ -crystallin không được cải biến chỉ ra rằng các điều kiện phản ứng là phù hợp với sự biến đổi hoàn toàn.

Phổ CD thể hiện một sự thay đổi tăng đáng kể so với cấu trúc tự nhiên của protein. (dữ liệu không được thể hiện) Lỗ nông hơn được quan sát xung quanh 220nm đi ngược lại xu hướng tương quan tốt giữa sự biến đổi và cấu trúc bậc hai. Sự thay đổi của phổ chỉ ra rằng cấu trúc bậc hai của các protein bị xáo trộn bởi sự biến đổi. Mặc dù có sự thay đổi trong quang phổ, hình dáng tổng thể của đường cong là tương tự và không có dấu hiệu của cuộn rối loạn hoặc ngẫu nhiên.

Sự kết tụ của protein γ -crystallin được quan sát đối với γ -crystallin được cải biến bằng biotin. NICF thể hiện kiểu chậm và nhanh tạo thành chức năng phân bố có hai bộ đỉnh (Fig.14). Sự phụ thuộc vào góc của chức năng phân bố có thể thấy trong đồ

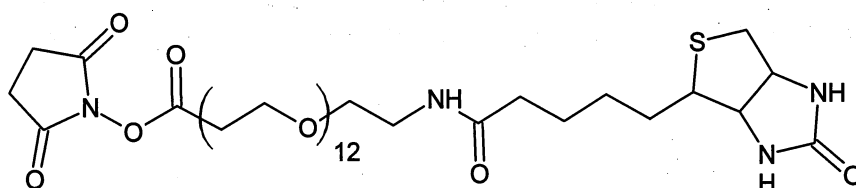
thị Γ tính theo q^2 , trong đó sự khác biệt về chất lượng được quan sát thấy giữa kiểu chậm và nhanh. Ở nhiệt độ 22°C, R_h của các kiểu nhanh và chậm là 2,8nm và 150nm đối với γ D-crystallin, trong khi đối với γ S-crystallin các giá trị này là 2,6nm và 180nm. Kiểu chậm và nhanh cũng được quan sát ở nhiệt độ 37°C với các giá trị R_h tương tự các giá trị ở nhiệt độ 22°C.

Sự kết tụ của γ -crystallin được cải biến bằng NHSBiotin thể hiện rằng chức năng của việc cải biến phân tử (tức là, phân tử lỏng) là rất quan trọng. Một cách cơ học, γ -crystallin cải biến bằng biotin theo cách giống như NHSPEG. Chỉ có sự cải biến các axit amin có điện tích của γ -crystallin là không phù hợp để ngăn ngừa sự kết tụ. Mức độ biến đổi có thể so sánh xuất hiện với biotin và PEG4 có nghĩa là biến đổi tương tự của điểm đẳng điện của protein. Do sự kết tụ xuất hiện trong trường hợp γ -crystallin được cải biến bằng biotin không đủ để thay đổi hoàn toàn điểm đẳng điện của protein γ -crystallin để ngăn ngừa sự kết tụ. Phương pháp đo DLS hệ biotinyl hóa cũng hỗ trợ hơn nữa quan điểm rằng sự kết tụ không thể được ngăn ngừa chỉ bằng cách bổ sung các phân tử đệm vào bề mặt của γ -crystallin.

Sự tương phản rõ rệt trong các tính chất hóa học giữa PEG và biotin là lý do tại sao một chất thì ngăn ngừa sự kết tụ và chất kia thì không. PEG là phân tử ưa nước linh hoạt trong khi biotin có khả năng liên kết hydro và ổn định điện tích âm. Vì vậy các tính chất của PEG giúp hòa tan protein trong khi biotin tham gia vào bản chất kỵ nước và tĩnh điện của các chất kết tụ.

Ví dụ 8- Cải biến hóa học γ D- và γ S- crystallin bằng Biotin-PEG

Cải biến protein γ -crystallin bằng biotin tạo nên sự kết tụ do đó được đề xuất là sử dụng NHSBiotinPEG kết hợp với phân tử ưa nước giữa protein và biotin chức năng. Được đề xuất rằng bản chất ưa nước của PEG là yếu tố chính trong việc ngăn ngừa sự kết tụ γ -crystallin. Chức năng hóa NHS được sử dụng để giữ cho cơ chế phản ứng hằng định. Trọng lượng phân tử được bổ sung với mỗi đơn vị là 825,64g/mol và cánh tay đệm là 5,6nm.



NHSBiotinPEG12

Sự thay đổi đáng kể về trọng lượng phân tử được quan sát trong MALDI-TOF chỉ ra sự biến đổi của các protein γ -crystallin bằng BiotinPEG12. (dữ liệu không được thể hiện) γ D-crystallin có ba đỉnh phân biệt được quan sát ở nhiệt độ 22760, 23582, và 24404 m/z tương ứng với một, hai, và ba biến đổi. Độ phân giải của γ S-crystallin tạo ra các đỉnh MALDI-TOF ở 23001, 23816, 24669, 25470, và 26122 m/z tương ứng với các biến đổi một-năm. Phổ MALDI-TOF cũng không thể hiện γ -crystallin không được cải biến chứng minh các điều kiện phản ứng là phù hợp.

Các cấu trúc bậc hai của protein γ -crystallin được cải biến phù hợp tốt với γ -crystallin tự nhiên như được quan sát thấy trong phổ CD. (dữ liệu không được thể hiện) Quan sát thấy rõ với phổ CD đối với γ -crystallin được cải biến chỉ bằng biotin không còn rõ ràng nữa. Phần PEG của sự biến đổi nhiều khả năng cho phép gia tăng độ hòa tan ngoài việc tạo thành chất đệm giữa protein và biotin chức năng.

Mặc dù có sự kết hợp của PEG trên biotin chức năng, kết tụ vẫn có mặt trong dung dịch như được thể hiện trong kiểu chậm và nhanh của NICEF. (dữ liệu không được thể hiện) Chức năng phân bố (Fig.15) chứa hai bộ đỉnh chứng minh sự phụ thuộc vào góc. Đồ thị Γ tính theo q^2 thể hiện rõ hai đoạn tuyệt tính khác biệt, độ dốc của chúng tạo ra kiểu khuếch tán chậm và nhanh. (dữ liệu không được thể hiện) Hệ số khuếch tán nhanh tương ứng với γ -crystallin monome trong đó γ D-crystallin có R_h là 2,7nm ở nhiệt độ 22°C, trong khi γ S-crystallin có giá trị là 2,6nm. Hệ số khuếch tán chậm biểu thị kết tụ lớn có mặt trong dung dịch với R_h là 105nm cho γ D-crystallin và 115nm cho γ S-crystallin ở nhiệt độ 22°C. Kết tụ của R_h tương tự cũng được quan sát ở nhiệt độ 37°C.

Việc sử dụng PEG làm phân đệm giữa protein và biotin chức năng không hỗ trợ ngăn ngừa sự kết tụ. Không tuân theo lý thuyết và có tham khảo các nghiên cứu trước đây liên quan đến biotin thay đổi điểm đẳng điện của γ -crystallin, các kết quả thử nghiệm này cũng đề xuất các thể kỵ nước chiếm ưu thế hơn các thể tĩnh điện trong sự tạo thành các chất kết tụ. Cánh tay đệm dài của BiotinPEG cũng không ngăn ngừa sự kết tụ hỗ trợ thêm cho khuynh hướng rằng độ dài phân tử đệm không phải là yếu tố quan trọng trong việc kết tụ. Cần lưu ý rằng γ -crystallin được điều chỉnh bằng BiotinPEG có kiểu chậm hoặc kết tụ R_h nhỏ hơn sự biến đổi bằng biotin đề xuất rằng PEG hỗ trợ hạn chế sự kết tụ.

Ví dụ 9- Cải biến hóa học γ D- và γ S- crystallin bằng sulfo-N-hydroxysuccinimit axetat (SA)

Do các biến đổi trước đây với trọng lượng phân tử và cánh tay đệm lớn vẫn dẫn đến sự kết tụ, sự biến đổi với can thiệp nhỏ nhất được nghiên cứu. Sự biến đổi cuối cùng được thực hiện bằng sulfo-N-hydroxysuccinimit axetat, chất này được kết hợp với trọng lượng phân tử (43g/mol) và cánh tay đệm (phân tử axetat) tối thiểu với mỗi đơn vị được bổ sung. Cơ chế phản ứng là tương tự với PEG4 bằng cách cho phản ứng qua các nhóm amino axit có điện tích, điểm đẳng điện của γ -crystallin cần bị ảnh hưởng.

Một thay đổi nhẹ về trọng lượng của các protein γ -crystallin được quan sát trong MALDI-TOF. (dữ liệu không được thể hiện) Đỉnh cường độ tương đối cho γ D-crystallin xuất hiện ở 22209 m/z và cho γ S-crystallin ở nhiệt độ 22562 m/z lần lượt tương ứng với sáu và bảy nhóm axetat. Các đỉnh không thể hiện protein không được cải biến, chỉ ra rằng các điều kiện phản ứng là phù hợp. Phân bố Gaussian xung quanh đỉnh cường độ tương đối chỉ ra rằng một số protein crystallin có mức biến đổi cao hơn và thấp hơn.

Phổ CD với cả hai protein γ -crystallin được cải biến thể hiện lỗ nhỏ hơn xung quanh 220nm như được so sánh với γ -crystallin tự nhiên. (dữ liệu không được thể hiện) Sự thay đổi trong phổ CD cũng được quan sát với sự biến đổi bằng biotin. Có lý do để tin rằng cấu trúc bậc hai có thể bị ảnh hưởng nhẹ bởi sự biến đổi mặc dù không có dấu hiệu của tình trạng ngẫu nhiên hoặc rối loạn.

Nhìn vào NICF rõ ràng là cải biến của γ -crystallin bằng các nhóm axetat không ngăn ngừa sự kết tụ. (dữ liệu không được thể hiện) Chức năng phân bố được thể hiện trong Fig.16. Sự phụ thuộc vào góc của kiểu khuếch tán chậm và nhanh có thể thấy trong đồ thị Γ tính theo q^2 . (dữ liệu không được thể hiện) Đối với γ D-crystallin ở nhiệt độ 37°C, các hệ số khuếch tán nhanh và chậm tương ứng với R_h bằng 2,6nm và 85nm. Các giá trị R_h cho γ S-crystallin ở nhiệt độ 37°C là 2,5nm và 90nm. Kiểu nhanh R_h là kích thước thích hợp với các protein γ -crystallin được cải biến có trọng lượng phân tử xấp xỉ 22kDa. Các giá trị R_h thu được từ các phép đo được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng thể hiện các kết quả tương tự.

Sự biến đổi SA được tiến hành trong nỗ lực nhằm thay đổi điểm đẳng điện của protein với cánh tay đệm nhỏ nhất. Mặc dù có kết tụ trong dung dịch, nhưng kích thước

kết tụ nhỏ hơn so với γ -crystallin không được cải biến. Qua rất nhiều biến đổi với mỗi protein, có thể sự thay đổi đáng kể trong điểm đẳng điện làm giảm kích thước của chất kết tụ. Không tuân theo lý thuyết, vì sự kết tụ vẫn có mặt trong dung dịch kết luận rằng các protein γ -crystallin gần điểm đẳng điện không chịu trách nhiệm một mình với hiện tượng kết tụ.

Các kết quả của các Ví dụ 3-9 được tóm tắt trong bảng dưới đây:

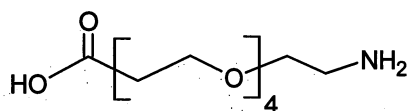
Bảng 4: Tóm tắt các kết quả với chất che giấu điện tích hai chức

	γ S		γ D	
	R _h (nm)	R _h (nm)	R _h (nm)	R _h (nm)
PEG4 22°C	2,9		2,8	
PEG4 37°C	2,9		2,9	
PEG24 22°C	3,2		3,1	
PEG24 37°C	3,2		3,1	
CAPEG4 22°C	2,8		2,9	
CAPEG4 37°C	3		2,8	
MMPEG24 22°C	3,1	100	2,9	85
MMPEG24 37°C	3	85	2,8	80
Biotin 22°C	2,6	180	2,8	150
Biotin 37°C	2,8	210	2,7	170
BiotinPEG 22°C	2,6	115	2,7	105
BiotinPEG 37°C	2,8	110	2,6	100
SA 22°C	2,5	92,5	2,5	82,5
SA 37°C	2,5	90	2,6	85

Các kết quả thể hiện ở đây thể hiện rằng các chất tĩnh điện là thành phần quan trọng trong sự kết tụ γ -crystallin. Sự kết tụ tĩnh điện có thể bị phá vỡ một cách hữu hiệu bằng cách sử dụng nồng độ muối hoặc chất che giấu điện tích hai chức cao. Sự gia tăng hiểu biết về cơ chế của sự kết tụ γ -crystallin đã tạo ra một nhóm chất đặc biệt hữu ích trong điều trị bệnh đục thủy tinh thể và bệnh viễn thị.

Các phương pháp: Lấy và xác định đặc tính của thủy tinh thể lấy từ tử thi người

Trong khoảng 24 giờ sau khi chết, nhãn cầu được lấy, cắt lát và thủy tinh thể được loại bỏ. Thủy tinh thể này được cắt và đặt trong môi trường ủ được gọi là Optisol®. Optisol® là môi trường bảo quản giác mạc chứa chondroitin sulfat, dextran 40, bột nền optisol, natri bicarbonat, gentamycin, các axit amin, natri pyruvat, L-glutamin, 2-mercaptoethanol và nước tinh khiết. OD là mắt phải và OS là mắt trái.



CAPEG4

Độ mờ đục của thủy tinh thể được phân loại theo hệ LOCS III. Phương pháp đo LOCS III được tiến hành với kính hiển vi đèn khe. LOCS III chứa bộ tiêu chuẩn mở rộng được chọn từ thư viện Longitudinal Study of Cataract slide ở Center for Clinical Cataract Research, Boston, Mass. Nó bao gồm sáu ảnh đèn khe để phân cấp màu của nhân (NC) và độ mờ nhân (NO), năm ảnh chiếu sáng ngược để phân cấp bệnh đục thủy tinh thể vỏ (C), và năm ảnh chiếu sáng ngược để phân cấp bệnh đục thủy tinh thể sau màng bọc (P). Độ nghiêm trọng của bệnh đục thủy tinh thể được phân loại theo thang thập phân, với các tiêu chuẩn được đặt cách đều trên thang.

Ví dụ 10: Thử nghiệm CAPEG4 ở thủy tinh thể tử thi người - vận chuyển qua biểu mô

Vận chuyển CAPEG4 qua cấu trúc biểu mô được nghiên cứu. Biểu mô là lớp ngoài của giác mạc và vận chuyển qua biểu mô được chứng minh là một thách thức khó khăn. Mục đích là chứng minh cấu trúc CAPEG4 có thể được sử dụng trong chế phẩm thuốc nhỏ mắt để vận chuyển xuyên qua mặt trước của mắt.

Cụ thể, cấu trúc CAPEG4 trong dung dịch được bổ sung vào đầu trên của dụng cụ chứa môi trường nuôi cấy và một cấu trúc biểu mô.(Fig.19). Cấu trúc biểu mô này bao gồm (các) lớp tế bào biểu mô giác mạc của người. Các phần nhỏ dịch nuôi cấy được lấy ra ở đỉnh và đáy của môi trường nuôi cấy từ 15 đến 120 phút. Fig.20 thể hiện CAPEG4 được chuyển đến đáy của tế bào.

Fig.21 thể hiện độ pH của Optisol® tính theo mg/ml của CAPEG4 được bổ sung. Dữ liệu cũng được thể hiện trong các bảng 5 và 6. Nói chung, đã chứng minh rằng bệnh đục thủy tinh thể vỏ và sau màng bọc được giảm đi là do CAPEG4 và không phải ảnh hưởng của độ pH của môi trường. Vì bệnh đục thủy tinh thể vỏ không giảm đi chỉ bằng

cách thay đổi (giảm) độ pH của môi trường Optisol® bằng axit xitric đến cùng độ pH của Optisol® chứa CaPEG amin. Việc làm giảm độ mờ đục cần sự có mặt của hoạt chất.

Bảng 5: 1 mg/ml CAPEG4

Thời gian	Đỉnh		Đáy		
Phút	mcg /lỗ	Trung bình	mcg /lỗ	Trung bình	% (lưu trữ)
15	427	449	4	13	2,4
	472		22		
30	448	446	26	31	5,8
	445		37		
60	454	421	8	9	1,7
	388		11		
45	459	443	9	8	1,5
	428		8		
90	467	463	17	31	5,7
	459		45		
120	453	481	21	25	4,7
	510		30		
1000 mcg/mL	543	543			
Thời gian 0 thu hoạch:	446	450	4	3	0,6
	453		3		

Bảng 5: 16 mg/mL CAPEG4

Thời gian	Đỉnh		Đáy		
Phút	mcg/lỗ	Trung bình	mcg/lỗ	Trung bình	% (lưu trữ)
15	5842	6375	58	60	0,7
	6908		62		
30	6099	6312	93	99	1,2
	6526		105		

60	6450 7494	6972	160 139	149	1,8
45	6313 6356	6335	677 418	548	6,7
90	6122 6792	6457	525 na	525	6,4
16000 mcg/mL	8186	8186			
Blank insret ở 15 phút	7857	7857	1837	1837	23

Ví dụ 11: Thử nghiệm CAPEG4 với thủy tinh thể của tử thi người - giảm bệnh đục thủy tinh thể trong thủy tinh thể của tử thi người

Trong tất cả các trường hợp, mẫu đối chứng là môi trường Optisol®. Các điểm dữ liệu còn lại là cho thủy tinh thể của tử thi người được tách và được xử lý bằng các dung dịch CAPEG4 với Optisol®.

Bảng 6 thể hiện các kết quả cho các thủy tinh thể được ủ bằng môi trường đối chứng hoặc 10 mg/mL CAPEG4 tính theo thời gian. Trong bảng 6, dưới tiêu đề vò, có các mức LOCS III bằng 1,0, 1,0 và 0,9 cho các thủy tinh thể được ủ bằng 10 mg/ml CAPEG4. Các mức LOCS với đối chứng là 1,0, 1,2 và 0,9. Ở nồng độ 10 mg/mL không có thay đổi đáng kể trong thử nghiệm tính theo các mẫu đối chứng.

Bảng 6- Mức LOCS III của bệnh đục thủy tinh thể được ủ bằng Optisol® hoặc 10 mg/ml CAPEG4 tính theo thời gian

[CaPEG] (mg/mL)	Thời gian (HR)	Vò	NO	NC	PS
10 (OD)	0	1,0	5,0	5,0	0,9
Đối chứng (OS) Chỉ có Optisol	0	1,2	5,0	5,0	0,9
10	24	1,0	5,0	5,0	0,9
Đối chứng Chỉ có Optisol	24	1,2	5,0	5,0	0,9
10	72	0,9	5,0	5,0	0,9
Đối chứng	72	0,9	5,0	5,0	1,0

Bảng 7 thể hiện các kết quả với các thủy tinh thể được ủ bằng môi trường đối chứng hoặc 50 mg/mL CAPEG4 tính theo thời gian. Trong bảng 7, dưới tiêu đề vò, có mức LOCS III là 1,0 cho tất cả các mẫu và độ mờ nhân (NO) là 2,0 cho tất cả các mẫu.

Không có khác biệt đáng kể giữa các mẫu đối chứng và 50 mg/mL mẫu ủ đến 72 giờ trong bệnh đục thủy tinh thể vỏ hoặc đối với NO. Màu của nhân (NC) tăng nhẹ qua thời gian ở cả hai mẫu đối chứng và mẫu ủ trong 50 mg/mL dung dịch CAPEG4. Có sự cải thiện nhẹ trong bệnh đục thủy tinh thể sau màng bọc từ 1,1 đến 0,9 lần lượt ở các thời điểm 0 và 24 giờ.

Bảng 7- Mức LOCS III của bệnh đục thủy tinh thể được ủ bằng Optisol® hoặc 50 mg/ml CAPEG4 tính theo thời gian

[CaPEG] (mg/mL)	Thời gian (HR)	Vỏ	NO	NC	PS
50 (OD)	0	1,0	2,0	1,7	1,1
Đối chứng (OS) Chỉ có Optisol	0	1,0	2,0	1,8	0,9
50	24	1,0	2,0	1,7	0,9
Đối chứng Chỉ có Optisol	24	1,0	2,0	1,8	0,9
50	72	1,0	2,0	1,9	0,9
Đối chứng	72	1,0	2,0	2,0	0,9

Bảng 8 thể hiện các kết quả đối với các thủy tinh thể được ủ bằng môi trường đối chứng hoặc 100 mg/mL CAPEG4 tính theo thời gian. Có sự giảm nhẹ về độ mờ đục (NO từ 1,8 đến 1,2) lần lượt ở các thời điểm 0 và 24 giờ, đối với mẫu ủ CAPEG4 và cải thiện nhẹ trong vỏ và màu của nhân đến 72 giờ.

Bảng 8- Mức LOCS III của bệnh đục thủy tinh thể được ủ bằng Optisol® hoặc 100 mg/ml CAPEG4 tính theo thời gian

[CaPEG] (mg/mL)	Thời gian (HR)	Vỏ	NO	NC	PS
100 (OD)	0	3,0	1,8	1,3	0,9
Đối chứng (OS) Chỉ có Optisol	0	0,9	1,9	1,5	0,9
100	24	2,9	1,2	1,1	0,9
Đối chứng Chỉ có Optisol	24	0,9	1,8	2,0	0,9
100	72	2,7	1,2	1,1	0,9
Đối chứng	72	0,9	1,9	2,0	0,9

Bảng 9 lặp lại các thử nghiệm trong Bảng 8 với các mắt khác nhau. Theo PS (bệnh đục thủy tinh thể sau màng bọc) mẫu được ủ ở 100 mg/ml CAPEG4 có các giá trị là 1,8, 1,5, và 1,0 lần lượt ở các thời điểm 0, 24 và 72 giờ. Bệnh đục thủy tinh thể vỏ cũng giảm từ 3,0 đến 2,6 đến 2,0 lần lượt ở các thời điểm 0, 24, và 72 giờ.

Bảng 9- Mức LOCS III của bệnh đục thủy tinh thể được ủ bằng Optisol® hoặc 100 mg/ml CAPEG4 tính theo thời gian

[CaPEG] (mg/mL)	Thời gian (HR)	Vỏ	NO	NC	PS
100 (OD)	0	3,0	3,0	3,0	1,8
Đối chứng (OS) Chỉ có Optisol	0	1,0	3,0	3,0	1,5
100	24	2,6	3,0	3,0	1,5
Đối chứng Chỉ có Optisol	24	1,0	3,0	3,0	1,5
100	72	2,0	3,0	3,2	1,0
Đối chứng	72	1,0	3,0	3,1	1,5

Bảng 10 thể hiện các kết quả đối với các thủy tinh thể được ủ bằng môi trường đối chứng hoặc 200 mg/mL CAPEG4 tính theo thời gian. Bệnh đục thủy tinh thể vỏ giảm từ 2,5 đến 2,2 đến 2,0 lần lượt ở các thời điểm 0, 24, và 72 giờ. Mẫu đối chứng cũng thể hiện hơi giảm nhẹ bệnh đục thủy tinh thể vỏ từ 3,3 đến 3,0 lần lượt ở các thời điểm 24 và 72 giờ.

Bảng 10- Mức LOCS III của bệnh đục thủy tinh thể được ủ bằng Optisol® hoặc 200 mg/ml CAPEG4 tính theo thời gian

[CaPEG] (mg/mL)	Thời gian (HR)	Vỏ	NO	NC	PS
200 (OD)	0	2,5	2,4	2,4	0
Đối chứng (OS) Chỉ có Optisol	0	3,3	2,5	2,5	0
200	24	2,2	2,4	2,4	0
Đối chứng Chỉ có Optisol	24	3,3	2,5	2,5	0
200	72	2,0	2,4	2,4	0
Đối chứng	72	3,0	2,5	2,5	0

Bảng 11 thể hiện các kết quả đối với các thủy tinh thể được ủ bằng môi trường đối chứng hoặc 200 mg/mL CAPEG4 tính theo thời gian. Chỉ quan sát được bệnh đục thủy tinh thể giảm nhẹ trong bệnh đục thủy tinh thể vỏ với dung dịch CAPEG4 từ 1,3 đến 1,0 đến 0,9 lần lượt ở các thời điểm 0, 24, và 72 giờ.

Bảng 11- Mức LOCS III của bệnh đục thủy tinh thể được ủ bằng Optisol® hoặc 200 mg/ml CAPEG4 (trong Optisol®) tính theo thời gian

[CaPEG] (mg/mL)	Thời gian (HR)	Vỏ	NO	NC	PS
200 (OD)	0	1,3	3,2	2,8	0,9
Đối chứng (OS) Chỉ có Optisol	0	1,4	3,2	3,0	0,9
200	24	1,0	3,2	2,8	0,9
Đối chứng Chỉ có Optisol	24	1,4	3,2	3,0	0,9
200	72	0,9	3,2	2,8	0,9
Đối chứng	72	1,4	3,2	3,0	0,9

Bảng 12 thể hiện các kết quả của việc thay đổi độ pH của Optisol® không được bổ sung CAPEG4. Độ pH này giảm đi nhờ bổ sung axit xitric. Không thấy ảnh hưởng của việc thay đổi độ pH của Optisol® trên bệnh đục thủy tinh thể.

Bảng 12: Ảnh hưởng của độ pH của Optisol® trên bệnh đục thủy tinh thể

pH	Thời gian (HR)	Vỏ	NO	NC	PS
6,470 (OD)	0	2,0	5,0	5,2	0,9
6,085 (OD)	0	2,7	2,3	2,0	0,9
6,470	24	2,0	5,0	5,2	0,9
6,075	24	2,7	2,3	2,0	0,9
6,470	72	2,0	5,0	5,2	0,9
6,075	72	2,7	2,3	2,0	0,9

Đối với các nghiên cứu thủy tinh thể tử thi người, các điểm bắt đầu khác nhau của mức LOCSIII là do những điều kiện bắt đầu khác nhau ở bệnh nhân. Khi nồng độ của các dung dịch CAPEG4 trong Optisol gia tăng, quan sát thấy sự nhăn nhúm vỏ các thủy tinh thể này và thể hiện là làm giảm thể tích thủy tinh thể.

Các mạo từ số ít không dùng để hạn chế số lượng, mà dùng để chỉ sự có mặt của ít nhất một thuật ngữ có liên quan. Thuật ngữ “hoặc” có nghĩa là “và/hoặc”. Các thuật ngữ “bao gồm”, “có”, “bao gồm”, và “chứa” được dùng với nghĩa mở (tức là, có nghĩa là “bao gồm, nhưng không giới hạn ở”). Tất cả các khoảng được bộc lộ ở đây là bao gồm và kết hợp.

Các phương án được mô tả ở đây, bao gồm phương pháp tốt nhất đã được biết bởi các tác giả sáng chế. Các biến thể của các phương án này sẽ trở nên rõ ràng hơn với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này khi đọc phần mô tả ở trên. Họ được mong đợi là sử dụng các biến thể này một cách thích hợp, và các phương pháp được bộc lộ được mong là được áp dụng mở rộng hơn các phương pháp cụ thể được mô tả ở đây. Do đó, tất cả các biến đổi và tương đương với các dấu hiệu được nêu trong yêu cầu bảo hộ bao gồm trong phạm vi cho phép bởi luật áp dụng. Hơn nữa, kết hợp bất kỳ của các dấu hiệu được mô tả ở trên trong tất cả các biến thể của chúng được kết hợp trừ khi có chỉ dẫn cụ thể ở đây hoặc mâu thuẫn rõ ràng với nội dung.

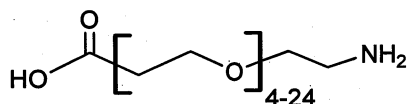
YÊU CẦU BẢO HỘ

- NCCCOC(=O)O

CCOC(=O)ON1C(=O)CCC1=O

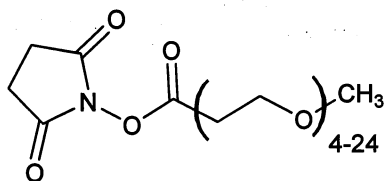
6. Chế phẩm dùng cho mắt theo điểm 4, trong đó chế phẩm dùng cho mắt là ở dạng dung dịch dùng cho mắt, huyền phù dùng cho mắt, thuốc mỡ dùng cho mắt, dạng phun, hoặc dạng gel dùng cho mắt.

7. Chế phẩm dùng cho mắt theo điểm 3, trong đó chế phẩm dùng cho mắt chứa chất đệm, chất đẳng trương hóa, chất hòa tan, chất bảo quản, chất làm tăng độ nhớt, chất tạo chelat, chất chống oxy hóa, chất kháng sinh, đường, chất điều chỉnh độ pH, hoặc hỗn hợp của chúng.
8. Chế phẩm dùng cho mắt theo điểm 4, trong đó chế phẩm dùng cho mắt chứa chất đệm, chất đẳng trương hóa, chất hòa tan, chất bảo quản, chất làm tăng độ nhớt, chất tạo chelat, chất chống oxy hóa, chất kháng sinh, đường, chất điều chỉnh độ pH, hoặc hỗn hợp của chúng.
9. Chế phẩm dùng cho mắt theo điểm 1, trong đó chế phẩm dùng cho mắt được bào chế ở dạng được chứa trong dụng cụ dùng cho mắt.
10. Chế phẩm dùng cho mắt theo điểm 2, trong đó chế phẩm dùng cho mắt được bào chế ở dạng được chứa trong dụng cụ dùng cho mắt.
11. Chế phẩm dùng cho mắt theo điểm 9, trong đó dụng cụ dùng cho mắt là ở dạng kính áp tròng hoặc nút chặn ống dẫn nước mắt.
12. Chế phẩm dùng cho mắt theo điểm 10, trong đó dụng cụ dùng cho mắt là ở dạng kính áp tròng hoặc nút chặn ống dẫn nước mắt.
13. Chế phẩm dùng cho mắt theo điểm 1, trong đó chế phẩm dùng cho mắt này là chế phẩm giải phóng kéo dài.
14. Chế phẩm dùng cho mắt theo điểm 2, trong đó chế phẩm dùng cho mắt này là chế phẩm giải phóng kéo dài.
15. Chế phẩm dùng cho mắt theo điểm 1, trong đó hợp chất:



có mặt với lượng khoảng 0,001 g đến khoảng 0,1 g, hoặc khoảng 0,01 g đến khoảng 0,05 g.

16. Chế phẩm dùng cho mắt theo điểm 2, trong đó hợp chất:



có mặt với lượng khoảng 0,001 g đến khoảng 0,1 g, hoặc khoảng 0,01 g đến khoảng 0,05 g.

Fig.1

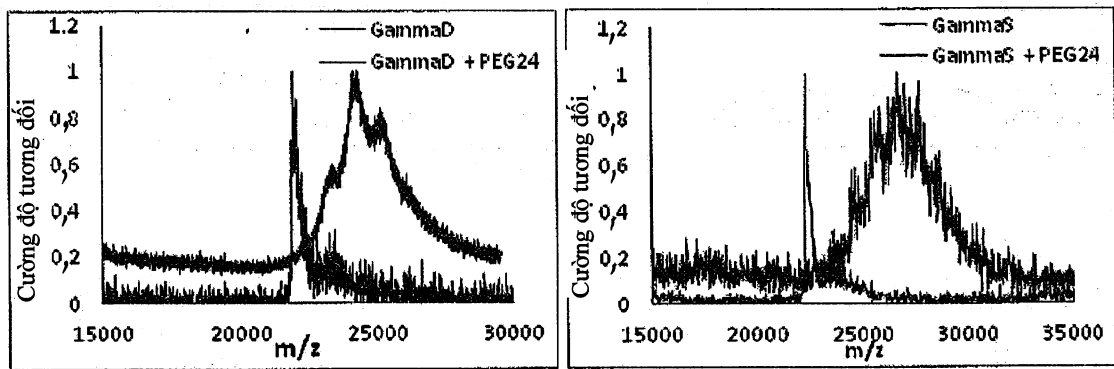


Fig.2

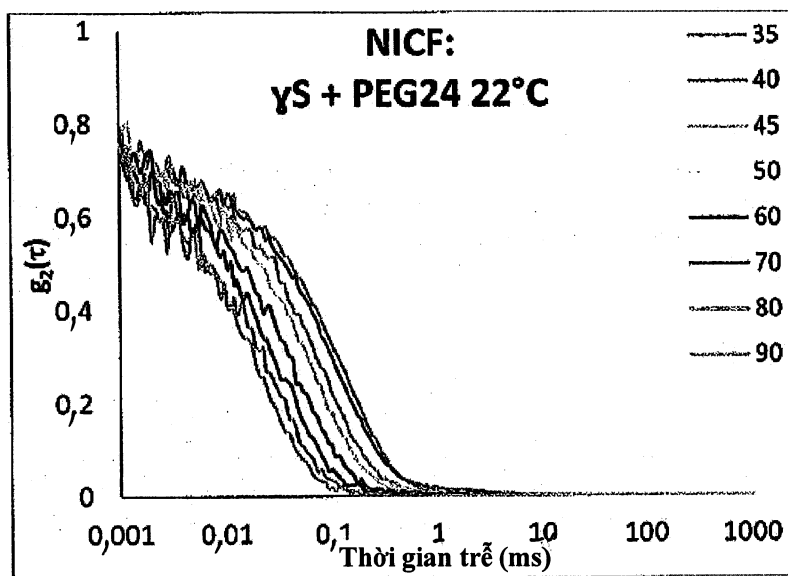


Fig.3

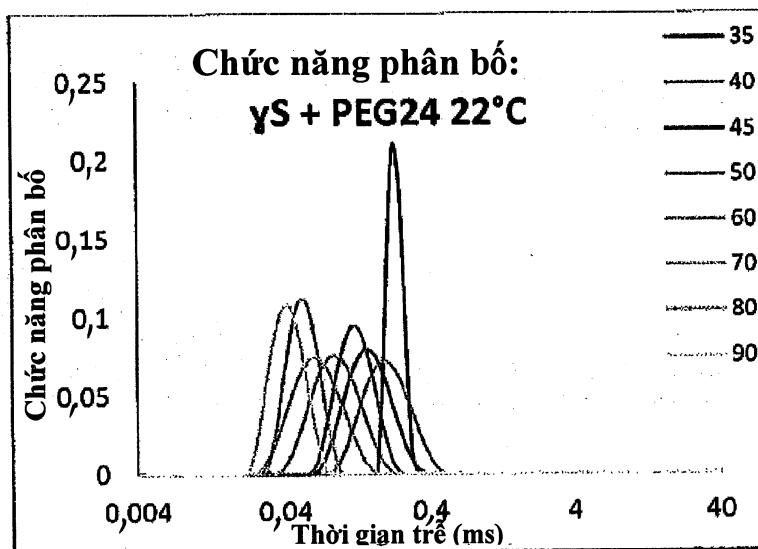


Fig.4

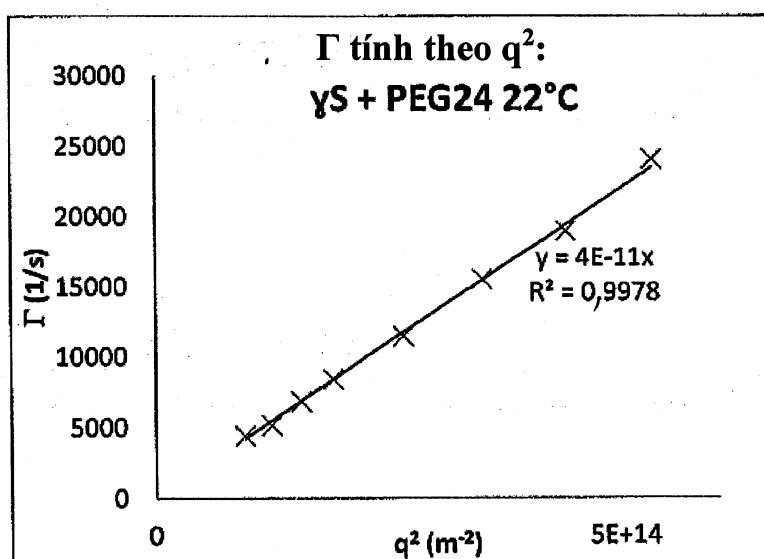


Fig.5

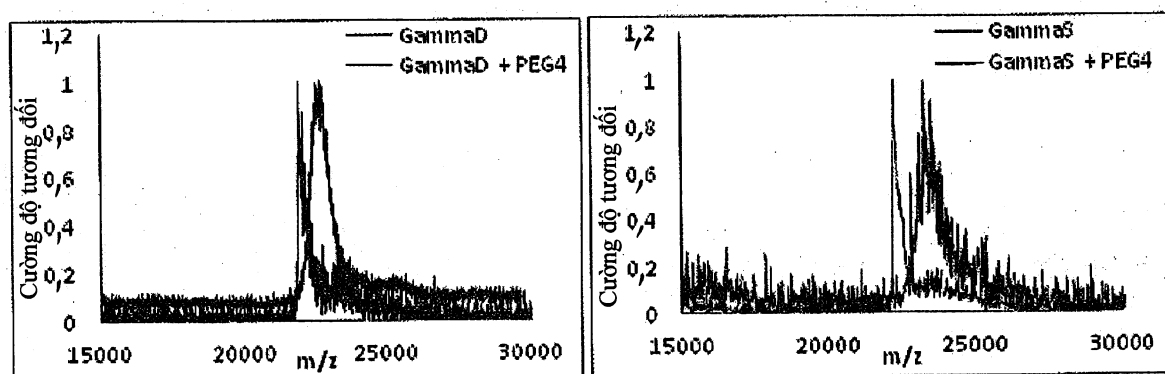


Fig.6

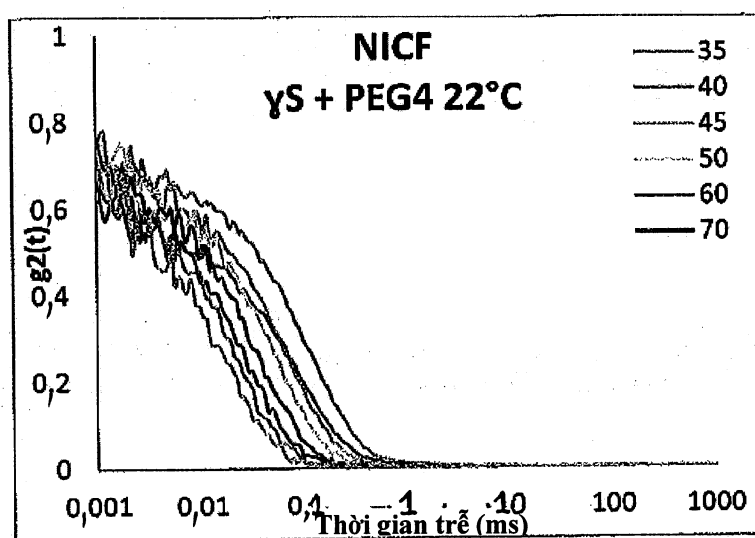


Fig.7

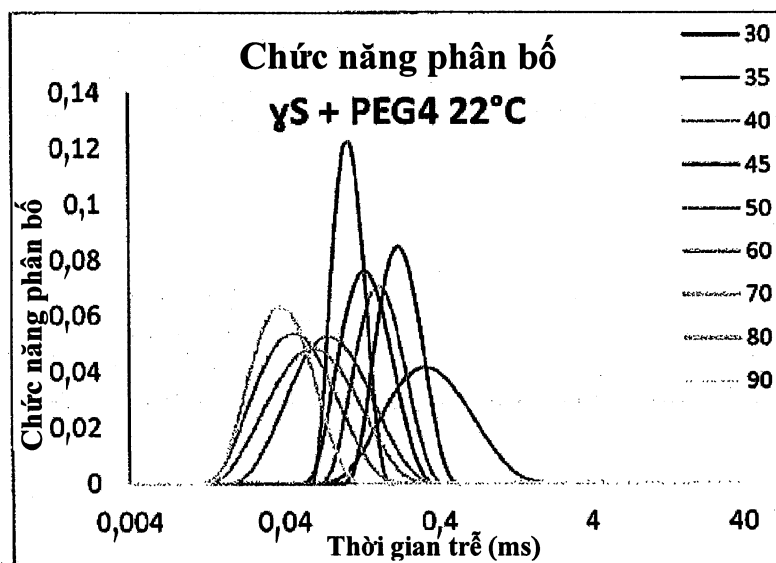


Fig.8

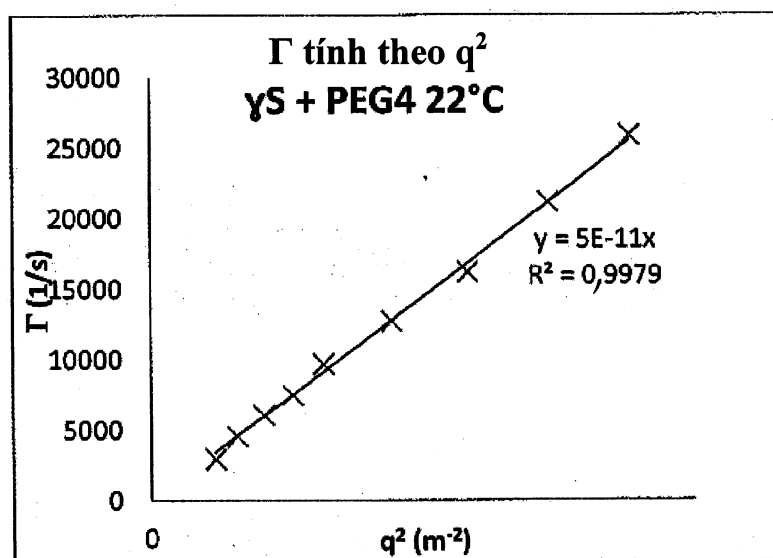


Fig.9

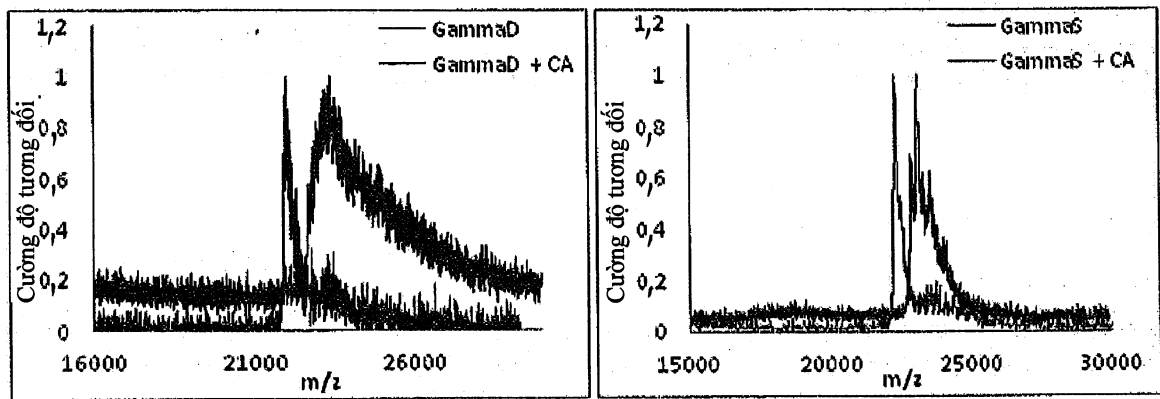


Fig.10

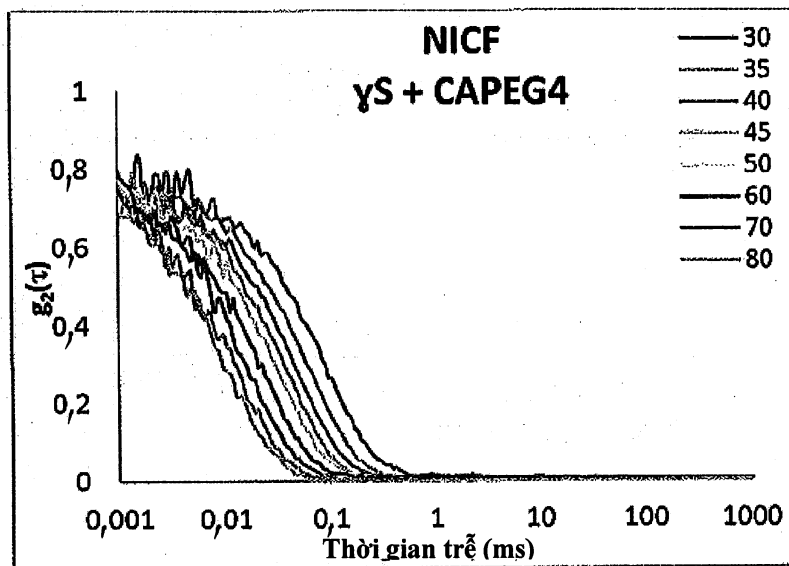


Fig.11

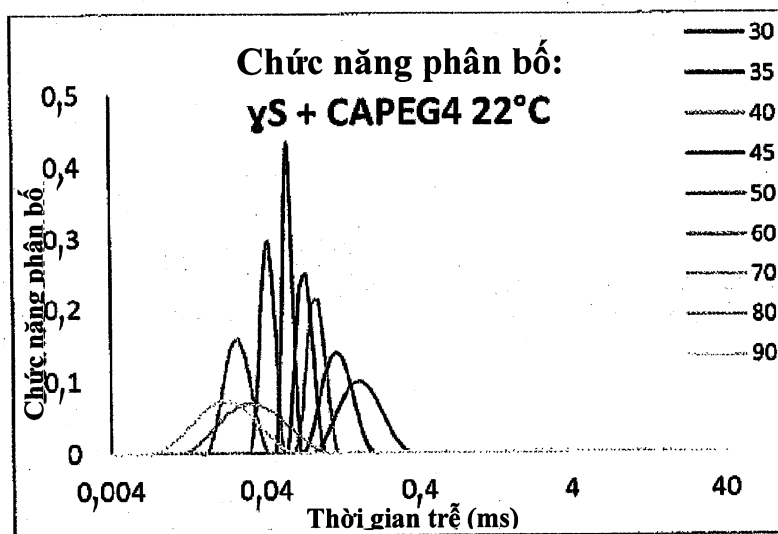


Fig.12

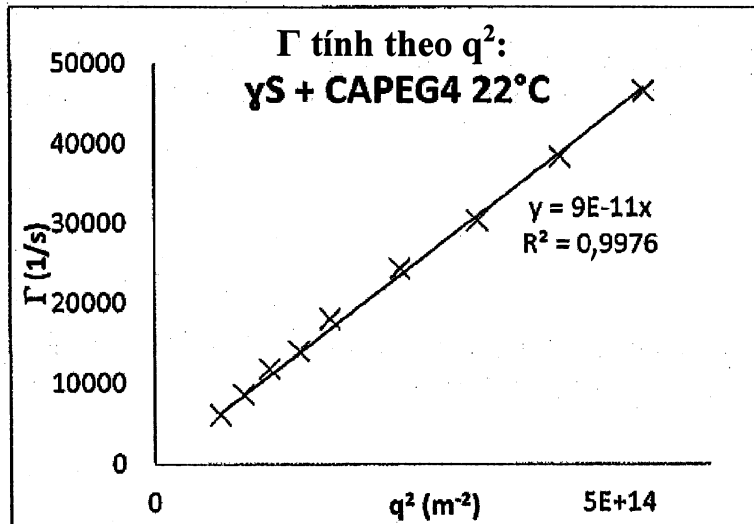


Fig.13

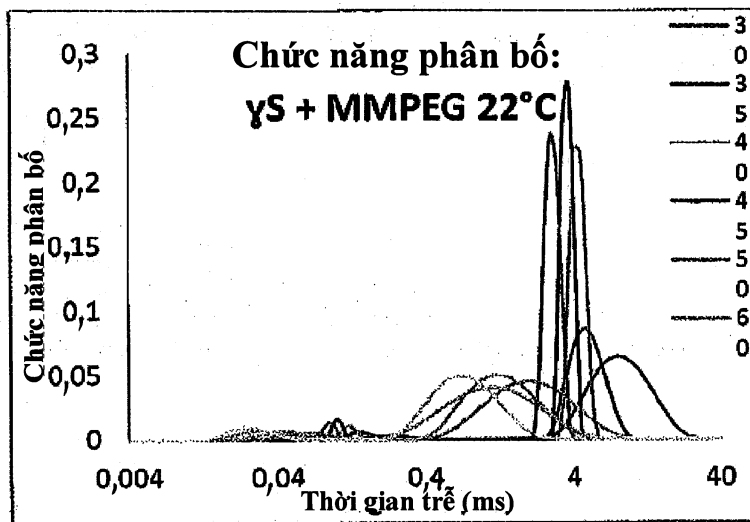


Fig.14

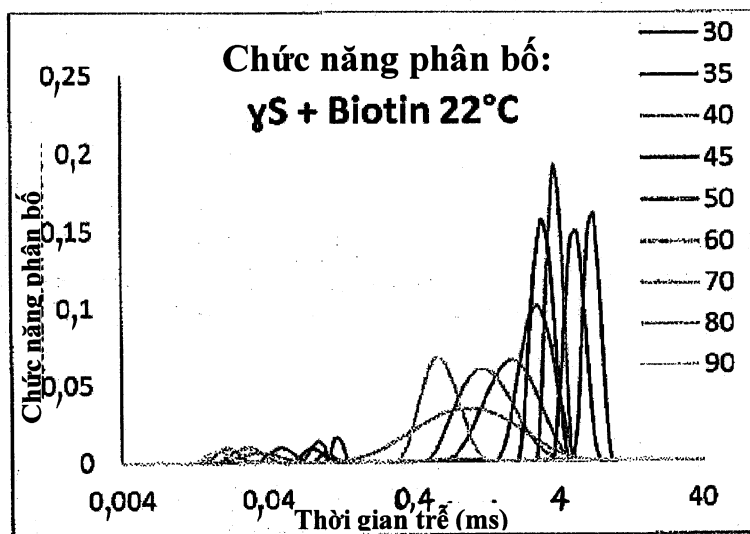


Fig.15

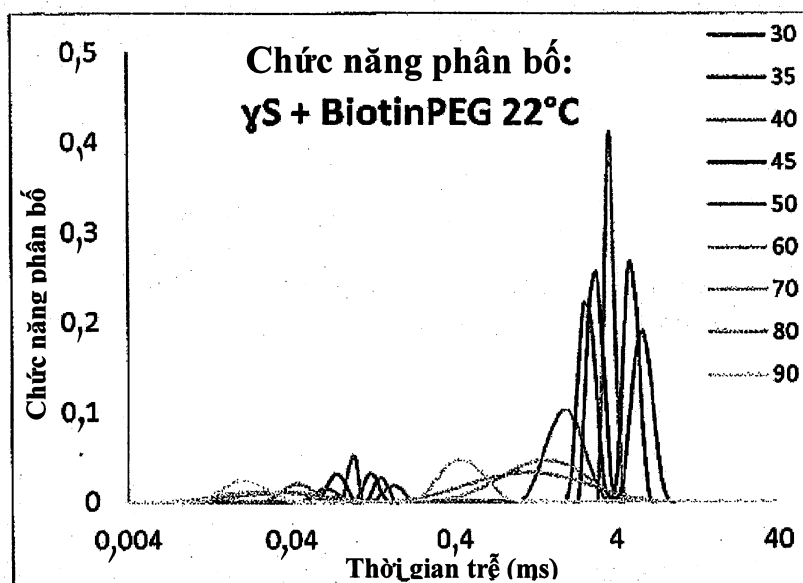


Fig.16

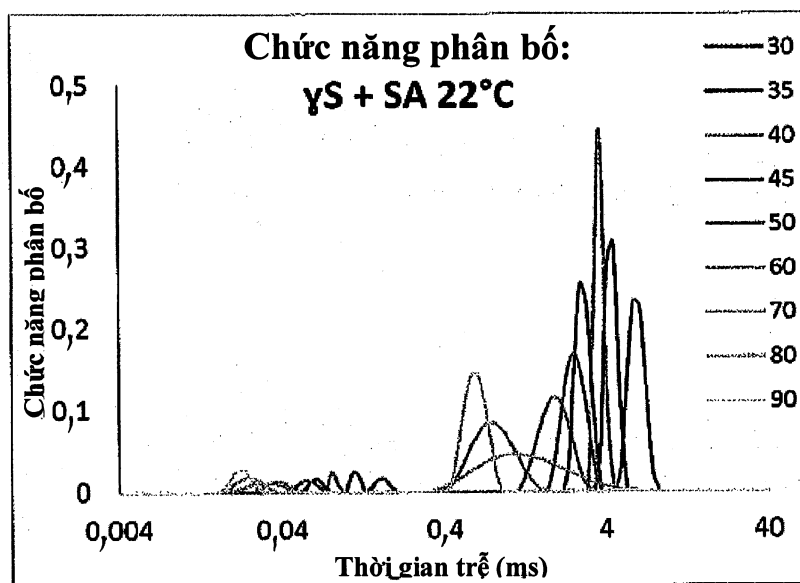


Fig.17

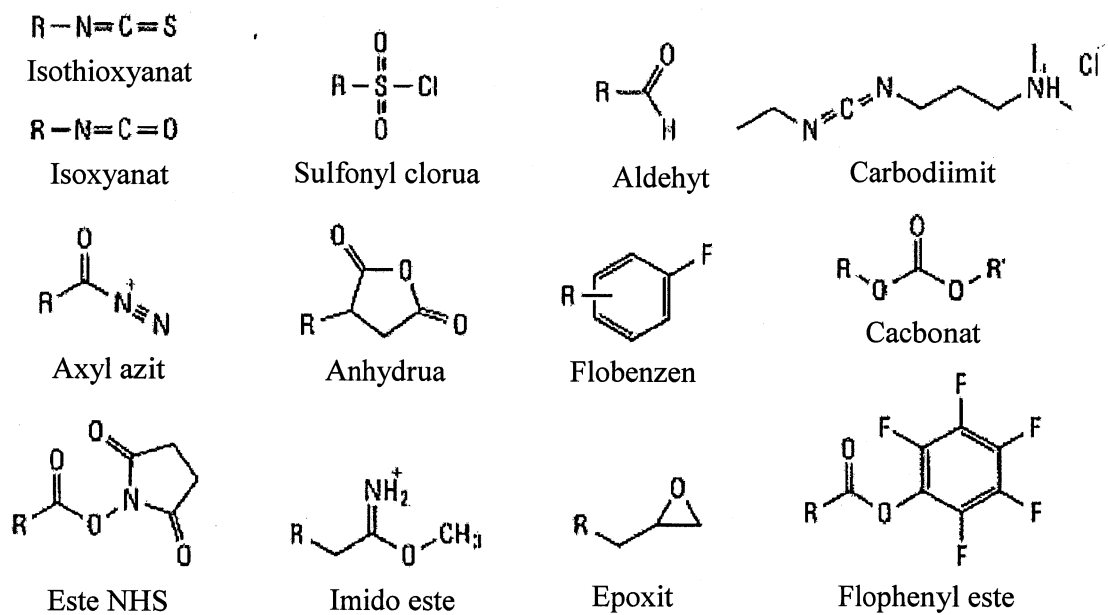


Fig.18

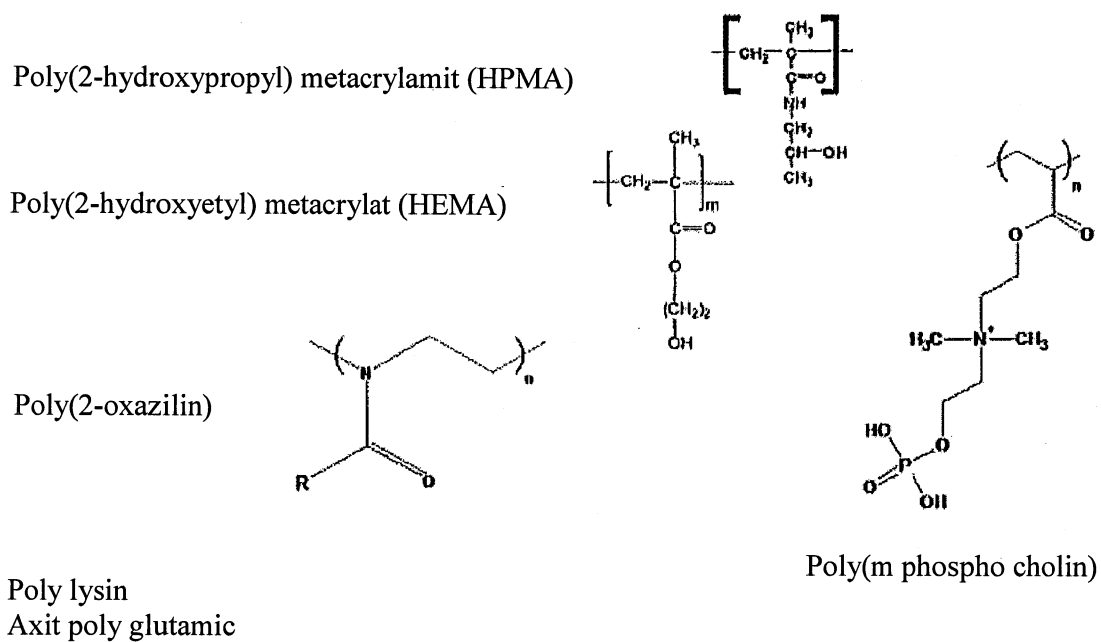


Fig.19

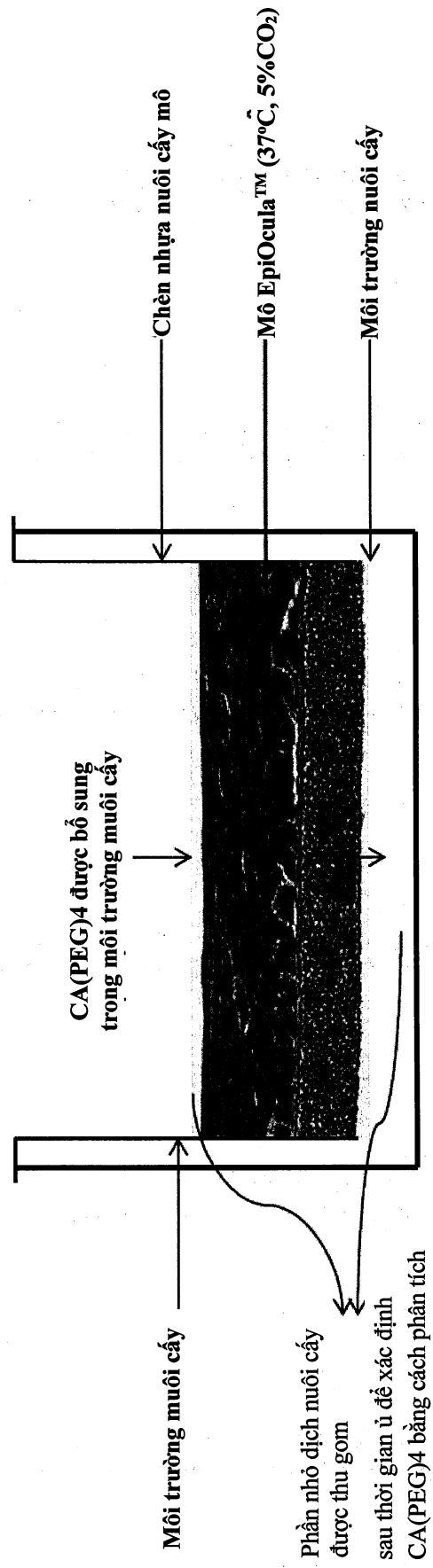


Fig.20

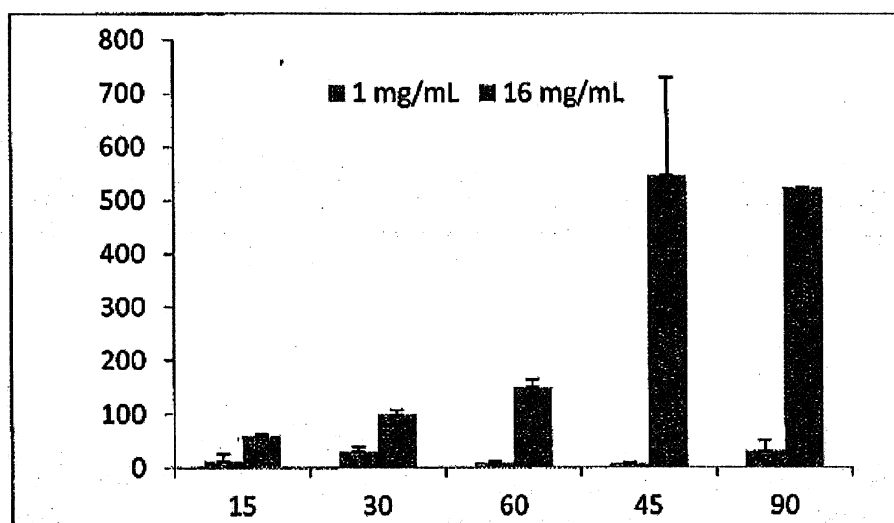


Fig.21

