



(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)



1-0029502

(51)⁸ A61K 9/00; A61K 31/573; A61K 47/36 (13) B

(21) 1-2017-02325

(22) 11/12/2015

(86) PCT/IB2015/059533 11/12/2015

(87) WO2016/092513 16/06/2016

(30) MI2014A002126 12/12/2014 IT

(45) 25/09/2021 402

(43) 27/11/2017 356A

(73) ALFA INTES INDUSTRIA TERAPEUTICA SPLENDORE S.R.L. (IT)

Via F.lli Bandiera, 26, I-80026 Casoria (NA), Italy

(72) GELSOMINO, Lucia (IT).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) DƯỢC PHẨM DÙNG CHO MẮT ĐỂ ĐIỀU TRỊ HỘI CHỨNG KHÔ MẮT

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt, chứa hydrocortison hoặc muối dược dụng của chúng với lượng nằm trong khoảng từ bằng hoặc lớn hơn 0,0005% khối lượng đến nhỏ hơn 0,003% khối lượng và chất thay thế nước mắt.

Lĩnh vực kĩ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến được phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt.

Tình trạng kĩ thuật của sáng chế

Hội chứng khô mắt là một trong số các tình trạng bệnh lý thường xuyên nhất trong chuyên khoa mắt. Có đến 20% người trưởng thành trên 40 tuổi có triệu chứng khô mắt.

Hội chứng này là một bệnh của mắt bao gồm việc sản xuất không đủ, về cả mặt số lượng và chất lượng, màng nước mắt - chủ yếu có chức năng làm ẩm bề mặt mắt - bằng tuyến có liên quan. Bệnh lý này có thể gây nguy hiểm vì nó có thể làm tổn thương cấu trúc bên ngoài của mắt. Thực tế, màng nước mắt, nhằm phá vỡ, nhờ sự tiếp xúc tiếp theo khử nước, biểu mô màng sừng phía trước và màng kết mí mắt.

Bệnh nhân mắc hội chứng khô mắt gặp phải các rối loạn như đau mắt đỏ, rát, cảm giác có vật thể lạ trong mắt, chứng sợ ánh sáng, khó mở mí mắt khi ngủ dậy, và trong các trường hợp nghiêm trọng nhất, đau và giảm thị lực.

Bệnh về mắt này đòi hỏi việc điều trị bệnh nhân bằng chất thay thế nước mắt (nước mắt nhân tạo hoặc gel làm ẩm) có đặc tính bắt chước niêm dịch và giả dẹo.

Thông thường, tình trạng sản xuất không đủ nước mắt mạn tính làm cho bề mặt màng sừng bị tấn công bởi các tác nhân bên ngoài có mặt trong môi trường có khả năng khơi mào quá trình viêm khó chịu trên màng kết và trên biểu mô màng sừng. Khi gặp phải tình trạng này, việc chỉ sử dụng chất thay thế nước mắt là không bao giờ đủ để khôi phục tình trạng sinh lý. Do đó, chuyên khoa mắt buộc phải kê đơn cả việc điều trị bằng corticosteroid, mà nó có vai trò quan trọng trong việc kiểm soát tình trạng viêm.

Tuy nhiên, việc điều trị bằng corticosteroid có thể bị giới hạn về thời gian do các tác dụng phụ đã biết mà corticosteroid có thể gây ra cho mắt. Ngay khi corticosteroid đi qua hàng rào màng sừng và thấm vào bên trong mắt, thực tế, chúng có thể làm khởi phát bệnh đục thủy tinh thể và làm tăng nhãn áp. Đây là các tác dụng vô cùng nguy hiểm, do đó giới hạn sử dụng các thuốc này rất nghiêm ngặt, vì vậy trong thời gian

không gián trừ.

Việc sử dụng thuốc nhỏ mắt trên cơ sở hydrocortison natri phosphat với nồng độ 0,33%, được bán trên thị trường với tên thương mại Cortivis® (Medivis S.r.l.), là đã biết.

Trong tờ thông tin giới thiệu thuốc cho bệnh nhân của thuốc này, đã được thông báo rằng việc điều trị bằng corticosteroid phải không được lặp lại hoặc kéo dài mà không có các biện pháp kiểm soát y tế thích hợp, để ngăn ngừa việc khởi phát tình trạng nhãn áp và nhiễm trùng bất ngờ hoặc hình thành bệnh đục thủy tinh thể.

Thực tế, trong số các tác dụng phụ thường xuyên nhất trong trường hợp sử dụng corticosteroid lặp lại hoặc kéo dài, thường gặp các hiện tượng sau: tăng nhãn áp có thể phát triển glaucome, tạo thành bệnh đục thủy tinh thể dưới bao sau, làm dày màng cứng, đồng tử, giãn mí mắt.

Do đã xác nhận được việc hấp thụ toàn thân corticosteroid sau khi dùng tại chỗ corticosteroid, cũng xảy ra các tác dụng phụ toàn thân như chứng đau đầu cephalaea, giảm huyết áp, viêm mũi và viêm họng.

Gần đây, đã xuất hiện xu hướng sử dụng corticosteroid kết hợp với cyclosporin. Cơ sở cho việc điều trị kết hợp này dựa trên thực tế là, trái với corticosteroid tạo ra việc kiểm soát nhanh và mạnh đối với chứng viêm của bề mặt mắt, cyclosporin cần nhiều thời gian để đạt được tác dụng tối đa của nó (từ vài tuần đến vài tháng).

Công bố đơn quốc tế số WO 2006/073786 bộc lộ được phẩm dùng cho mắt chứa corticosteroid và cyclosporin. Tốt hơn là, corticosteroid là loteprednol etabonat.

Công bố đơn quốc tế số WO 03/011249 bộc lộ chế phẩm dùng cho mắt chứa N-axetylxystein có tác dụng tiêu chất nhầy, được làm thích ích để dùng trong thuốc nhỏ mắt, trong đó N-axetylxystein được trung hòa bằng bazơ DEAE-dextran để đạt được độ pH, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5, và có nồng độ mol sinh lý dụng nhỏ hơn 320 mOsm/kg.

Patent Anh số 1 386 864 bộc lộ được phẩm dùng cho mắt để dùng tại chỗ cho mắt có tác dụng thuốc được gia tăng và/hoặc kéo dài thời gian tác dụng, chứa được chất dùng cho mắt và từ 0,1 đến 5,0% khối lượng collagen vi tinh thể tính theo tổng

khối lượng của dược phẩm.

Dược chất dùng cho mắt có thể là chloramphenicol, carbomycin, polymyxin, erythromycin, dihydrostreptomycin, neomycin, aureomycin, terramycin, bacitracin, penicillin, ampicillin, atropine, homatropine, scopolamine, xyclopentalate, tropicamide, oxyphenonium, tetracaine, proparacaine, benoxinate, cocain, procain, lidocain, epinephrin, isoniazid, nitrofurans, sulphonamides như sulphanilamide, sulphapyridine, sulphadiazine, sulphathiazole, sulphaceamide, phenylephrine, ephedrine, gentian violet, acriflavine, silver nitrat, axetylcholin, carbachol, pilocarpine, esedrine, echothiophate iodua, demercarium, dihydroergocornine, tolazoline, kẽm sulphat, chlorobutanol, phenyl butazone, tetraethylamoni clorua, hexamethonium, noradrenaline, physostigmine, cortison, hydrocortison, prednisolon, dexamethason, triamcinolon, metyl prednisolon, argyrol, phenylmercuric nitrat, chlorazene, mercurocrom, iot hoặc germicit amoni bậc bốn, hoặc hỗn hợp của chúng.

Patent Anh số 1 149 648 mô tả quy trình khử trùng steroid, như dexamethason hoặc phosphat, axetat hoặc tert-butyl-axetat của nó, hydrocortison, metyl prednisolone axetat, betamethasone axetat, và triamcinolone acetonide, cũng như các chế phẩm tiết trùng để dùng ngoài đường tiêu hóa hoặc dùng trong mắt chứa ngoài một hoặc nhiều các thành phần nêu trên, một hoặc nhiều chất tạo huyền phù, ví dụ natri carboxymethylxenluloza, hydroxyetyl xenluloza hoặc sorbitol; chất tạo chelat, ví dụ, N-etylen-diamin-tetra-axetat; chất bảo quản, ví dụ, Na-bisulphit hoặc benzalkoni clorua; lecithin; creatinin; rượu; rượu benzylic; và lidocain.

Patent Mỹ số 2005/0196370 bộc lộ nhũ tương dầu trong nước ổn định chứa chất làm mềm để điều trị chứng khô mắt được cấu thành từ polyme tan trong nước như natri hyaluronat.

Theo một phương án, chế phẩm này có thể chứa chất trị liệu thứ hai ngoài polyme tan trong nước. Ví dụ về chất trị liệu thứ hai này là các chất sát trùng và kháng khuẩn, chất chống dị ứng, chất kháng histamin, chất chống tăng huyết áp và thuốc làm thông mũi, chất kháng viêm, như cortison, hydrocortison, hydrocortison axetat, betamethason, dexamethason, dexamethasone natri phosphat, prednison,

methylprednisolon, medrysone, fluorometholone, fluocortolone, prednisolone, prednisolone natri phosphat, triamcinolone, sulindac, muối và sulfua tương ứng của chúng, và các chất tương tự và hỗn hợp của chúng, thuốc kháng viêm không steroid (NSAID), miotics và chất chống tiết cholin, thuốc làm giãn đồng tử, thuốc chống glaucoma, hợp chất chống ký sinh trùng và/hoặc hợp chất chống động vật đơn bào, hợp chất kháng virus, chất ức chế carbonic anhydrase, chất chống nấm, thuốc gây mê và giảm đau, thuốc chẩn đoán mắt, các chất bổ trợ dùng trong phẫu thuật mắt, chất tạo chelat, chất ức chế miễn dịch và chống chuyển hóa, chất tạo hình mạch, chất tiết nhầy, protein và yếu tố tăng trưởng, vitamin và chất dẫn xuất vitamin, và tổ hợp gồm các chất trị liệu này như kháng sinh/kháng viêm (neomycin sulfat-dexamethason natri phosphat), quinolon-NSAID và các chất tương tự.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, các tác giả sáng chế đã tập trung vào việc bào chế dược phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt chứa corticosteroid, có hoạt tính kháng viêm thích hợp trên bề mặt mắt tuy nhiên không khởi phát, đặc biệt trong trường hợp thời gian điều trị kéo dài, tác dụng phụ mà corticosteroid có thể gây ra trong mắt (ví dụ, khởi phát bệnh đục thủy tinh thể và tăng nhãn áp).

Các tác giả sáng chế đã phát hiện bất ngờ bằng thử nghiệm rằng có thể thu được cả tác dụng kháng viêm mong muốn trên bề mặt mắt, và ngăn ngừa sự hấp thụ của corticosteroid - thậm chí trong trường hợp thời gian điều trị kéo dài - bằng cách bào chế dược phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt bao gồm, ở dạng tổ hợp:

- i) hydrocortison hoặc muối được dùng của chúng với lượng nằm trong khoảng từ bằng hoặc lớn hơn 0,0005% khối lượng đến nhỏ hơn 0,003% khối lượng, và
- ii) chất thay thế nước mắt.

Trong bản mô tả sau và trong các điểm yêu cầu bảo hộ tiếp theo, thuật ngữ chất thay thế nước mắt, được sử dụng để chỉ hợp chất hoặc tổ hợp các hợp chất có đặc tính nhớt và có khả năng đem lại đặc điểm giả dẻo cho dược phẩm.

Trong ngữ cảnh của dược phẩm dùng cho mắt theo sáng chế, chất thay thế nước mắt thực hiện chức năng cải thiện độ bền của màng nước mắt, bảo vệ bề mặt mắt khỏi

sự tấn công của các tác nhân bên ngoài và đồng thời đem lại cho dược phẩm đặc điểm nhót có khả năng giữ lại “về mặt cơ học” corticosteroid tiếp xúc với giác mạc.

Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng với dược phẩm dùng cho mắt được bào chế như mô tả trên đây, không xảy ra hiện tượng thẩm corticosteroid vào khoang phía trước của mắt, nhờ đó làm giảm đáng kể nguy cơ khởi phát các tác dụng phụ nêu trên, như glôcôm và bệnh đục thủy tinh thể, liên quan đến tổ hợp chất thay thế nước mắt với corticosteroid.

Toàn bộ kết quả này là hoàn toàn trái ngược với những gì mong đợi từ các dữ liệu chuyên ngành, mà phần lớn cho thấy rằng việc sử dụng chất thay thế nước mắt trong chế phẩm lỏng dùng cho mắt có khả năng làm tăng độ sinh khả dụng trong mắt của thuốc được mang. Mặc dù đã được thông báo trong các tài liệu chuyên ngành, thay vào đó các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng việc sử dụng hydrocortison trong chế phẩm dùng cho mắt, với lượng giới hạn và cụ thể nêu trên, có khả năng vừa ngăn ngừa sự hấp thụ hydrocortison của mắt, và đồng thời đảm bảo tác dụng kháng viêm tại chỗ hữu hiệu trong việc điều trị bệnh khô mắt.

Theo một cách hoàn toàn bất ngờ, các tác dụng kỹ thuật này đạt được mặc dù trong chế phẩm dùng cho mắt xuất hiện đồng thời chất thay thế nước mắt - mà làm tăng độ sinh khả dụng của corticosteroid được sử dụng trong mắt do chính bản chất của nó - thậm chí trong trường hợp thời gian điều trị kéo dài, như các trường hợp cần làm giảm triệu chứng của hội chứng khô mắt thể mạn tính.

Do đó, có lợi nếu khoảng nồng độ rất giới hạn và cụ thể nêu trên của hydrocortison là hữu hiệu để chống lại quá trình viêm trên bề mặt mắt, mà không có hiện tượng thẩm vào bên trong cấu trúc mắt, nhờ đó đảm bảo độ an toàn cho người sử dụng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong phạm vi của bản mô tả và trong các điểm yêu cầu bảo hộ tiếp theo, trừ khi có quy định khác, toàn bộ các số liệu biểu thị lượng, thông số, phần trăm, và v.v., được hiểu là được đặt trước bởi thuật ngữ “khoảng” trong mọi trường hợp. Tương tự, toàn bộ các khoảng số được bao hàm có thể là tổ hợp của các trị số tối đa và tối thiểu

và bao gồm toàn bộ các khoảng trung gian có thể, ngoài các khoảng được nêu cụ thể dưới đây.

Theo phương án được ưu tiên, được phẩm dùng cho mắt theo sáng chế là để dùng tại chỗ trong việc điều trị hội chứng khô mắt.

Theo phương án được ưu tiên, muối được dụng của hydrocortison được chọn từ nhóm bao gồm natri phosphat, axetat, natri succinat, butyrat và valerat. Natri phosphat là muối được dụng được ưu tiên nhất.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, hydrocortison hoặc muối được dụng của nó có mặt với lượng bằng hoặc lớn hơn 0,0008 và nhỏ hơn hoặc bằng 0,002, tốt hơn nữa là bằng 0,001% khối lượng.

Tốt hơn là, chất thay thế nước mắt còn có đặc điểm có khả năng làm cho được phẩm dùng cho mắt bám chặt vào niêm mạc, nghĩa của thuật ngữ này là khả năng bám vào chất nhày tồn tại tự nhiên trong màng nước mắt.

Có lợi, nếu chất thay thế nước mắt cho phép thu được trong trường hợp này còn làm vững mạnh lớp nhày của màng nước mắt và góp phần khôi phục chức năng của màng này.

Tốt hơn là, chất thay thế nước mắt còn có đặc điểm là có khả năng làm cho được phẩm dùng cho mắt có khả năng bắt chước chất nhày, nghĩa của thuật ngữ này là khả năng có cách cư xử như của chất nhày.

Có lợi, nếu chất thay thế nước mắt còn cho phép trong trường hợp này làm cho được phẩm dùng cho mắt có khả năng thay thế sự thiếu hụt chất nhày trong trường hợp được gọi là “điểm khô” và giữ lại nước để đảm bảo việc hydrat hóa đúng đắn của bề mặt mắt.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, chất thay thế nước mắt có đặc điểm có khả năng làm cho được phẩm dùng cho mắt có tính giả dẻo, bám chặt vào niêm mạc và bắt chước chất nhày, vì vậy giữ lại “về mặt cơ học” corticosteroit được tiếp xúc với giác mạc.

Tốt hơn là, chất thay thế nước mắt được chọn từ nhóm bao gồm: glycosaminoglycan, chất dẫn xuất xenluloza, chất dẫn xuất axit polyacrylic, polyme

tan trong nước mà tương thích sinh lý với mắt, và hỗn hợp của chúng.

Tốt hơn là, glycosaminoglycan có thể được sử dụng trong sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm: natri hyaluronat (SH), axit hyaluronic, chondroitin sulfat, và hỗn hợp của chúng.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, glycosaminoglycan là natri hyaluronat (SH).

Có lợi, nếu SH - là chất tồn tại tự nhiên trong mắt - làm cho chế phẩm dùng cho mắt có tính giả dẻo, bám chặt vào niêm mạc và bắt chước chất nhày.

Tốt hơn là, chất dẫn xuất xenluloza có thể được sử dụng trong sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm: carboxymetylxenluloza (CMC), hydroxypropylmetylxenluloza (HPMC), metyloxenluloza (MC), hydroxyetylxenluloza (HEC) và hydroxypropylxenluloza (HPC) và hỗn hợp của chúng.

Tốt hơn là, chất dẫn xuất của axit polyacrylic có thể được sử dụng trong sáng chế được lựa chọn từ: carbopol, polycarbophil và các chất tương tự, và hỗn hợp của chúng.

Tốt hơn là, polyme tan trong nước có thể được sử dụng trong sáng chế được lựa chọn từ: polyvinyl rượu (PVA), dextran, polyvinylpyrrolidon (PVP), polysorbat, và hỗn hợp của chúng.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, chất thay thế nước mắt có mặt trong chế phẩm theo sáng chế với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,5% khối lượng, tốt hơn là 0,2% khối lượng.

Tốt hơn là, chất thay thế nước mắt của dược phẩm dùng cho mắt theo sáng chế có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 500 đến 1200 kDa.

Có lợi, nếu phân tử lượng trung bình thấp là dung nạp được cho bệnh nhân, đặc biệt dùng để điều trị hội chứng khô mắt thể mạn tính.

Theo phương án được ưu tiên khác, dược phẩm dùng cho mắt theo sáng chế có pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5.

Tốt hơn là, dược phẩm dùng cho mắt theo sáng chế có nồng độ mol sinh lý được dùng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 240 đến 330 mOsm/kg.

Dược phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều các thành phần có thể khác đã biết trong lĩnh vực dược phẩm dùng cho mắt.

Cụ thể, dược phẩm dùng cho mắt có thể còn chứa thêm ít nhất một hợp phần được chọn từ nhóm bao gồm chất đệm, chất điều hòa nồng độ mol, và hỗn hợp của chúng.

Chất đệm hoặc chất điều hòa độ axit giúp duy trì độ pH của sản phẩm dùng cho mắt càng gần càng tốt với độ pH sinh lý. Tác dụng này là thiết yếu để đạt được khả năng dung nạp tốt của chế phẩm dùng cho mắt và để bảo toàn độ hữu hiệu của chúng.

Ví dụ về chất đệm có thể được sử dụng trong sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm axit axetic, natri phosphat, natri hydroxit, natri xitrat, natri cacbonat, natri borat, natri bicarbonat, kali phosphat, kali xitrat, kali cacbonat, axit boric, axit clohydric, axit axetic và magie clorua, và hỗn hợp của chúng.

Ví dụ về các chất điều hòa nồng độ mol, làm cho dược phẩm dùng cho mắt đẳng trương với nước mắt, được chọn từ nhóm bao gồm kali clorua, propylen glycol, natri clorua, glyxerin, dextroza, dextran 40 và 70, và hỗn hợp của chúng.

Theo thông lệ trong lĩnh vực này, dược phẩm dùng cho mắt theo sáng chế có thể chứa các chất bổ trợ khác, bao gồm chất bảo quản, chất cànghóa, chất kháng khuẩn, và hỗn hợp của chúng.

Các chất bổ trợ này có thể không có mặt trong dược phẩm dùng cho mắt được bào chế ở dạng thuốc nhỏ mắt, nếu sử dụng các gói liều đơn không chứa chất bảo quản.

Theo phương án được ưu tiên, dược phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt theo sáng chế được bào chế một cách thuận tiện ở dạng dung dịch nước hoặc hỗn dịch trong chất mang dùng cho mắt được dụng.

Tốt hơn là, chế phẩm theo sáng chế được bào chế ở dạng thuốc nhỏ mắt, gel hoặc kem.

Theo phương án được ưu tiên của chúng, sáng chế đề cập đến dược phẩm dùng cho mắt như mô tả trên đây, dùng để điều trị hội chứng khô mắt ở thể mãn tính.

Như đã nêu trên, thực tế, bằng dược phẩm dùng cho mắt theo sáng chế, không

xảy ra hiện tượng thẩm corticosteroid vào khoang phía trước của mắt, nhờ đó làm giảm đáng kể nguy cơ khởi phát các tác dụng phụ nêu trên, như glôcôm và bệnh đục thủy tinh thể, thậm chí trong trường hợp điều trị mắt tại chỗ kéo dài.

Để xác nhận hiệu quả của dược phẩm dùng cho mắt theo sáng chế, một vài thử nghiệm đã được tiến hành và các kết quả của chúng được thông báo dưới đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Dược phẩm dùng cho mắt ở dạng thuốc nhỏ mắt theo sáng chế được bào chế bằng cách trộn hydrocortison natri phosphat và natri hyaluronat với các thành phần thông thường khác theo phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết và tiếp đó, tiệt trùng bằng cách lọc. Theo cách này, thu được chế phẩm thuốc nhỏ mắt có thành phần được thông báo trong Bảng 1 sau.

Bảng 1

Thành phần	Lượng [mg]
Hydrocortison natri phosphat	1
Natri hyaluronat (SH)	200
Natri clorua	745
Kali clorua	180
Trinatri xitrat dihydrat	38
Magie clorua hexahydrat	13
Na ₂ HPO ₄ dodecahydrat	53
Na ₂ HPO ₄ monohydrat	8
H ₂ O tinh khiết	Đủ đến 100 ml

Nghiên cứu dược động học để đánh giá độ an toàn của dược phẩm dùng cho mắt theo sáng chế

Bốn chế phẩm thuốc nhỏ mắt khác nhau chứa - các thành phần là giống nhau - hydrocortison với nồng độ khác nhau:

Nhóm 1 - Chế phẩm A: 0,001% khối lượng hydrocortison natri phosphat (Ví dụ 1 theo sáng chế);

Nhóm 2 - Chế phẩm B: 0,003% khối lượng hydrocortison natri phosphat (mẫu tham khảo);

Nhóm 3 - Chế phẩm C: 0,005% khối lượng hydrocortison natri phosphat (mẫu tham khảo);

Nhóm 4 - Chế phẩm D: 0,33% khối lượng hydrocortison natri phosphat (mẫu tham khảo);

được dùng cho mỗi mắt của con thỏ Niu Dilân đực màu trắng (8 con thỏ/nhóm), bằng cách nhỏ vào vòm màng kết một giọt chế phẩm thuốc nhỏ mắt, 4 lần một ngày, để đánh giá sự hấp thụ của chúng trong thủy dịch.

Các chế phẩm tham khảo B, C và D chứa các thành phần giống với chế phẩm A (Ví dụ 1), ngoại trừ lượng hoạt chất.

Lấy mẫu thủy dịch (150 μ l) bằng thiết bị thích hợp, từ cả mắt của mỗi con thỏ trong nhóm 32 con thỏ được vào thời điểm 15, 30, 60 và 90 phút sau khi dùng liều thứ tư vào ngày điều trị đầu tiên. Trước khi lấy mẫu, các con thỏ bị giết bằng cách tiêm tĩnh mạch 20 mg/kg natri thiopental, tiếp theo là dùng Tanax® (Intervet, Milan).

Các mẫu thủy dịch được phân tích theo quy trình UNIF-2012-01 đã được phê chuẩn.

100 μ l mẫu thủy dịch được phân ước vào ống vi ly tâm polypropylen 1,5 ml, tiếp theo là bổ sung 5 μ l dung dịch nội chuẩn vừa điều chế nồng độ 2 μ g/ml. Sau khi trộn mạnh trong 30 giây, các mẫu được phân ước bằng cách bổ sung 1000 μ l etyl axetat, tiếp theo là trộn mạnh trong 2 phút và ly tâm với tốc độ 12,000 vòng/phút ở +4°C trong 25 phút, phần phân ước 850 μ l của lớp hữu cơ được chuyển vào một ống thủy tinh và sấy khô trong chân không ở 50°C bằng cách sử dụng hệ thống chân không Büchi trong 60 phút.

Cặn được hoàn nguyên trong bằng 100 μ l pha động (nước, với 0,1% HCOOH/axetonitril với 0,1% HCOOH, tỷ lệ 75/25 theo thể tích). Các ống được đậy nắp, trộn mạnh và ly tâm ở 4100 vòng/phút ở +4°C trong 10 phút.

Dịch chiết cuối cùng được chuyển vào ống lấy mẫu tự động và 4 μ l được bơm vào hệ thống LC-MS / MS.

Kết quả thu được được thông báo trong Bảng 2 sau.

Bảng 2

	Nồng độ hydrocortison trong thủy dịch (ng/ml)			
	15'	30'	60'	90'
Nhóm 1	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00	0,00	0,00	0,00
Nhóm 2	0,00	7,72	8,81	5,75
	3,60	8,79	7,48	4,55
	5,09	12,63	4,23	4,22
	4,28	13,26	4,99	4,89
Nhóm 3	8,12	18,29	23,15	21,46
	8,75	17,41	24,81	19,85
	14,46	18,85	24,43	19,22
	12,96	20,54	23,79	19,30
Nhóm 4	58,38	68,61	54,70	56,19
	60,10	69,01	56,80	56,73
	59,77	68,38	55,06	56,16
	60,70	70,60	55,52	55,00

Như được thể hiện trong Bảng 2, không tìm thấy lượng hydrocortison nào trong thủy dịch sau khi dùng tại chỗ chế phẩm, chứa hydrocortison với lượng 0,001% khối lượng, theo sáng chế, chứng minh một cách có lợi là hoạt chất không đi qua hàng rào màng sừng. Trái lại, kết quả thu được bằng chế phẩm so sánh chứa hydrocortison với nồng độ bằng hoặc lớn hơn giới hạn tối đa là 0,003% khối lượng, tương ứng là 0,003%, 0,005% và 0,33% khối lượng, đã cho thấy rằng thuốc đi qua hàng rào màng sừng và

độ sinh khả dụng trong thủy dịch là phụ thuộc liều.

Nghiên cứu hiệu quả trên mô hình thử nghiệm mắc hội chứng khô mắt ở thỏ

Nghiên cứu I (mô hình kích thích Concanavalin A)

Sáu con thỏ Niu Dilân Harlan đực được phân bố ngẫu nhiên vào 2 nhóm (3 con/nhóm) theo sơ đồ sau:

Nhóm I – chế phẩm đối chứng: chất mang chứa natri hyaluronat (SH) với nồng độ 0,2% khối lượng;

Nhóm II - Chế phẩm A: dược phẩm dùng cho mắt ở dạng thuốc nhỏ mắt chứa 0,001% khối lượng hydrocortison natri phosphat (Ví dụ 1 theo sáng chế).

Các con thỏ được gây mê bằng cách tiêm tĩnh mạch tiletamine HCl và zolazepam HCl (Zoletil®; Virbac). Mỗi con thỏ được tiêm concanavalin A (ConA) trong tuyến lệ. Việc tiêm được tiến hành bằng cách vạch nhẹ mí mắt dưới và ấn kim vào sâu 1 cm từ góc mắt theo quỹ đạo đến độ sâu khoảng 6 mm. Tiêm 30 µl dung dịch nước muối hoặc ConA vào tuyến lệ bằng cách sử dụng kim cỡ 30 và xiranh Hamilton. Các con thỏ bị giết bằng cách tiêm tĩnh mạch Tanax® (Intervet, Milan). Việc tiêm 300 µg ConA vào tuyến lệ của thỏ làm cho nước mắt tiết không đều và, trên bề mặt mắt, được đặc trưng bởi hội chứng khô mắt.

Mỗi con thỏ được dùng vài giọt (30 µl) chế phẩm đối chứng hoặc chế phẩm A, 4 lần một ngày, trong ba ngày.

Vào ngày thứ ba, sau khi tiêm ConA, lượng TNF- α , MMP-9 và IL-8 trong nước mắt được đo bằng thử nghiệm ELISA.

Thực tế, đã biết rõ là sau khi kích thích bằng ConA, lượng MMP-9 và xytokin tăng một cách đáng kể trong nước mắt, theo cách tương tự với bệnh nhân mắc bệnh khô mắt (Luo et al. IOVS 2004, 45, 4293-4301).

Dữ liệu được thể hiện trong Bảng 3. Việc điều trị tại chỗ bằng dược phẩm dùng cho mắt chứa hydrocortison với nồng độ 0,001% khối lượng, theo sáng chế, làm giảm đáng kể ($p < 0,05$; $p < 0,001$) lượng TNF- α và IL-8 so với chất mang (nhóm được điều trị bằng 0,2% SH). Thậm chí nếu không có ý nghĩa về mặt thống kê, vẫn quan sát thấy việc giảm lượng MMP-9 so với chất mang.

Bảng 3

Chất đánh dấu sinh học (nồng độ trong nước mắt) pg/ml	Chất mang ($\pm$ DS trung bình)	Hydrocortison ($\pm$ DS trung bình)
TNF-alpha	289,2 $\pm$ 28,6	281,2 $\pm$ 12,3 *
IL-8	627 $\pm$ 57	221 $\pm$ 30 **
MMP-9	11 $\pm$ 1,8	9,3 $\pm$ 2,8

* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; việc phân tích thống kê được tiến hành bằng thử nghiệm t.

Ngoài ra, vào ngày thứ nhất, thứ hai và thứ ba sau khi tiêm ConA, thể tích nước mắt được đánh giá bằng thử nghiệm Schirmer và thời gian phá vỡ màng nước mắt (TBUT). Dải Schirmer được đặt cẩn thận vào vòm dưới phía sau (nghĩa là, thái dương) trong 60 giây, và vùng bị ướt được đọc theo milimet là chỉ số thể tích nước mắt. Thời gian phá vỡ màng nước mắt TBUT (Tear breakup time) được xác định sau khi nhỏ giọt 5 μ l dung dịch natri floresxein 2% trong PBS tiết trùng vào mí mắt dưới. Floresxein được phân phối vào giác mạc bằng cách chớp mí mắt bằng tay. Thời gian mở mắt được ghi lại dưới đèn có khe (Sbisà, Florence, Italy) với bộ lọc xanh coban để cải thiện tín hiệu floresxein, cho đến khi xuất hiện điểm đen đầu tiên hoặc dải trên giác mạc (các vùng khô bị mất huỳnh quang).

Dữ liệu được thể hiện trong Bảng 4. Việc điều trị tại chỗ bằng được phẩm dùng cho mắt chứa hydrocortison với nồng độ 0,001% khối lượng, theo sáng chế, là có khả năng duy trì đáng kể ($p < 0,05$; $p < 0,01$) thể tích nước mắt và sự toàn vẹn của nước mắt lần lượt được đo bằng thử nghiệm Schirmer và TBUT.

Bảng 4

Thể tích nước mắt (mm)	Chất mang ($\pm$ DS trung bình)	Hydrocortison ($\pm$ DS trung bình)
Ngày 1	4,5 $\pm$ 1	7,1 $\pm$ 2,1 *
Ngày 2	4,1 $\pm$ 0,7	7,5 $\pm$ 1,5 *
Ngày 3	4,5 $\pm$ 1,2	7,8 $\pm$ 1,2 *
TBUT (giây)	Chất mang ($\pm$ DS trung bình)	Hydrocortison ($\pm$ DS trung bình)
Ngày 1	10 $\pm$ 1	22 $\pm$ 1,7 **
Ngày 2	9 $\pm$ 0,9	20,8 $\pm$ 2 **
Ngày 3	8 $\pm$ 0,9	20 $\pm$ 1 **

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; việc phân tích thống kê được tiến hành bằng thử nghiệm t.

Nghiên cứu II (mô hình kích thích bằng atropin)

Sáu con thỏ Niu Dilan Harlan đực được phân bố ngẫu nhiên vào 2 nhóm (3 con/nhóm) theo sơ đồ sau:

Nhóm I – chế phẩm đối chứng: chất mang chứa natri hyaluronat (SH) với nồng độ 0,2% khối lượng;

Nhóm II - Chế phẩm A: dược phẩm dùng cho mắt ở dạng thuốc nhỏ mắt chứa 0,001% khối lượng hydrocortison natri phosphat (Ví dụ 1 theo sáng chế).

Dung dịch nhỏ mắt chứa 1% atropin sulphat (30 μ l) được nhỏ vào túi màng kết dưới của mỗi mắt, bốn lần trong 12 giờ, để gây ra tình trạng khô mắt thử nghiệm (Burgalassi et al., Ophthalmic Res. 31, 229-235, 1999). Mười lăm phút sau khi dùng mỗi liều atropin sulphat, mỗi mắt được nhỏ 30 μ l hydrocortison hoặc chất mang.

24 giờ sau khi dùng liều atropin đầu tiên, thể tích nước mắt được đánh giá bằng thử nghiệm Schirmer. Dải Schirmer được đặt cẩn thận vào vòm dưới phía sau (nghĩa là, thái dương) trong 60 giây, và vùng bị ướt được đọc theo milimet là chỉ số thể tích nước mắt. 24 giờ sau khi dùng liều atropin đầu tiên, thời gian phá vỡ màng nước mắt TBUT (Tear breakup time) được xác định sau khi nhỏ giọt 5 μ l dung dịch natri floresxein 2% trong PBS tiết trùng vào mí mắt dưới. Floresxein được phân phối vào

giác mạc bằng cách chớp mí mắt bằng tay. Thời gian mở mắt được ghi lại dưới đèn có khe (Sbisà, Florence, Italy) với bộ lọc xanh coban để cải thiện tín hiệu florescein, cho đến khi xuất hiện điểm đen đầu tiên hoặc dải trên giác mạc (các vùng khô bị mất huỳnh quang).

Dữ liệu được thể hiện trong Bảng 5. Việc điều trị tại chỗ bằng được phẩm dùng cho mắt chứa hydrocortison với nồng độ 0,001% khối lượng, theo sáng chế, là có khả năng duy trì đáng kể ($p<0,01$) thể tích nước mắt và sự toàn vẹn của nước mắt lần lượt được đo bằng thử nghiệm Schirmer và TBUT.

Bảng 5

Thông số	Chất mang ($\pm$ DS trung bình)	Hydrocortison ($\pm$ DS trung bình)
Thể tích nước mắt (mm)	$7\pm 1,4$	$10,3\pm 0,8$ *
TBUT (giây)	$7,1\pm 1,7$	$19,3\pm 2,6$ *

* $p<0,01$; việc phân tích thống kê được tiến hành bằng thử nghiệm t.

Do đó, hydrocortison được dùng với nồng độ 0,001% khối lượng trong được phẩm dùng cho mắt theo sáng chế là hữu hiệu để chống lại quá trình viêm được gây ra trên động vật, do việc có mặt đồng thời của natri hyaluronat, tốt hơn là với nồng độ 0,2% khối lượng, tạo ra đặc điểm giả đẻo, bám chặt vào niêm mạc và bắt chước chất nhầy cho chế phẩm dùng cho mắt mà làm cho chế phẩm này có khả năng giữ lại “về mặt cơ học” hydrocortison tiếp xúc với giác mạc, làm tăng thời gian lưu của chúng trên bề mặt mắt và do đó, còn làm tăng độ sinh khả dụng.

Tóm lại, dữ liệu thu được chứng minh rằng việc điều trị hội chứng khô mắt bằng được phẩm dùng cho mắt chứa hydrocortison với nồng độ 0,001% khối lượng kết hợp với lượng thích hợp của chất thay thế nước mắt thích hợp (ví dụ, và tốt hơn là, natri hyaluronat) là hữu hiệu trên cả mô hình động vật mắc bệnh khô mắt do ConA lẫn atropin gây ra.

Cụ thể, trong Nghiên cứu I, việc điều trị bằng được phẩm dùng cho mắt chứa hydrocortison với nồng độ 0,001% khối lượng kết hợp với lượng thích hợp của chất thay thế nước mắt thích hợp (ví dụ, và tốt hơn là, natri hyaluronat) đã chứng minh có

khả năng làm giảm lượng MMP-9, TNF- α và IL-8 trong nước mắt và duy trì lượng sinh lý của thể tích nước mắt, cũng như tính toàn vẹn của nước mắt.

Việc điều trị tại chỗ bằng được phẩm dùng cho mắt chứa hydrocortison với nồng độ 0,001% khối lượng kết hợp với lượng thích hợp của chất thay thế nước mắt thích hợp (ví dụ, và tốt hơn là, natri hyaluronat) cũng có khả năng duy trì chức năng nước mắt ở mức sinh lý, thậm chí trên mô hình động vật mắc bệnh khô mắt do atropin gây ra.

Rõ ràng là, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tiến hành các cải biến và biến đổi sáng chế trên đây nhằm đáp ứng các yêu cầu cụ thể và bất ngờ; các cải biến và biến đổi này luôn nằm trong phạm vi bảo hộ như được xác định trong các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt chứa hydrocortison hoặc muối dược dụng của chúng với lượng nằm trong khoảng từ bằng hoặc lớn hơn 0,0005% khối lượng đến nhỏ hơn 0,003% khối lượng và chất thay thế nước mắt.
2. Dược phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt theo điểm 1, trong đó muối dược dụng của hydrocortison được chọn từ nhóm bao gồm natri phosphat, axetat, natri succinat, butyrat và valerat.
3. Dược phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt theo điểm 1 hoặc 2, trong đó hydrocortison hoặc muối dược dụng của chúng có mặt với lượng nằm trong khoảng từ bằng hoặc lớn hơn 0,0008% đến nhỏ hơn hoặc bằng 0,002%, tốt hơn là bằng 0,001% khối lượng.
4. Dược phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chất thay thế nước mắt được chọn từ nhóm bao gồm glycosaminoglycan, chất dẫn xuất xenluloza, chất dẫn xuất của axit polyacrylic, polyme tan trong nước tương thích sinh lý với mắt, và hỗn hợp của chúng.
5. Dược phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt theo điểm 4, trong đó glycosaminoglycan là natri hyaluronat.
6. Dược phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó chất thay thế nước mắt có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,5% khối lượng, tốt hơn là 0,2% khối lượng.
7. Dược phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó chất thay thế nước mắt có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 500 đến 1200 kDa.

8. Dược phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó dược phẩm này có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5.
9. Dược phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó dược phẩm này có nồng độ mol sinh lý dụng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 240 đến 330 mOsm/kg.
10. Dược phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó dược phẩm này còn chứa ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm chất đệm, chất điều hòa nồng độ mol, và hỗn hợp của chúng.
11. Dược phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó dược phẩm này còn chứa chất bảo quản, chất kháng khuẩn, chất càng hóa, và hỗn hợp của chúng.
12. Dược phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó dược phẩm này ở dạng dung dịch nước hoặc hỗn dịch trong chất mang dùng cho mắt được dụng.
13. Dược phẩm dùng cho mắt để điều trị hội chứng khô mắt theo điểm 12, trong đó dược phẩm này được bào chế ở dạng thuốc nhỏ mắt, gel hoặc kem.