



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0037079

(51)^{2020.01} A61K 9/08; A61K 47/10; A61P 27/02; (13) B
A61K 9/00; A61K 31/4178; A61K 47/18

(21) 1-2020-05141

(22) 18/02/2019

(86) PCT/KR2019/001894 18/02/2019

(87) WO 2019/168289 06/09/2019

(30) 10-2018-0024470 28/02/2018 KR

(45) 25/10/2023 427

(43) 25/11/2020 392A

(73) HANLIM PHARMACEUTICAL CO., LTD. (KR)

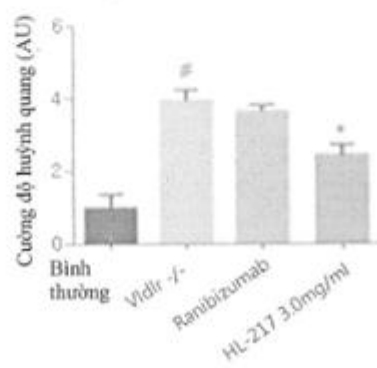
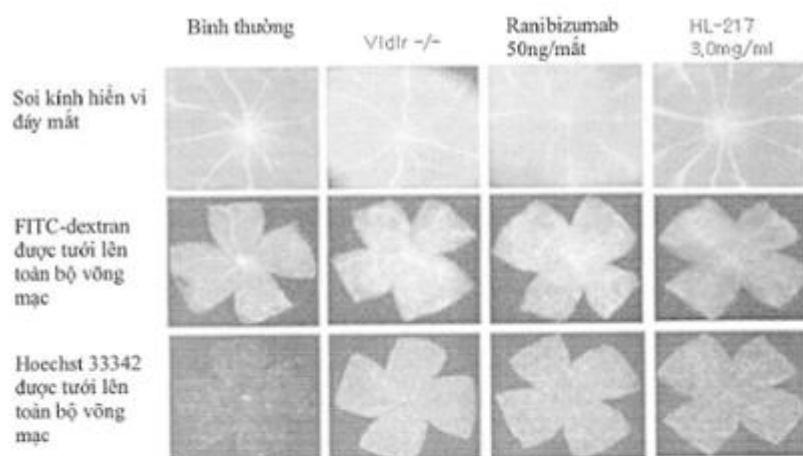
2-27, Yeongmun-ro, Cheoin-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 17040, Republic of Korea

(72) SHIN, Dong-Yeop (KR); KIM, Hu-Seong (KR); LEE, Geun-Hyeog (KR); KIM, Kyung-Joon (KR); CHO, Yun-Seok (KR); O, Mi-Jin (KR); KIM, Mi-Jung (KR).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) CHẾ PHẨM THUỐC NHỎ MẮT DẠNG DUNG DỊCH CHỨA DẪN XUẤT
BENZOPYRAN HOẶC MUỐI DƯỢC DỤNG CỦA NÓ

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm thuốc nhỏ mắt ở dạng dung dịch, chứa (2R,3R,4S)-6-amino-4-[N-(4-clophenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmethyl)amino]-3-hydroxy-2-methyl-2-dimethoxymethyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran hoặc muối dược dụng của nó; propylen glycol làm chất ổn định; và chất điều chỉnh độ pH trong môi trường nước, trong đó chế phẩm thuốc nhỏ mắt có pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,0. Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo sáng chế có thể chứa (2R,3R,4S)-6-amino-4-[N-(4-clophenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmethyl)amino]-3-hydroxy-2-methyl-2-dimethoxymethyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran hoặc muối dược dụng của nó tại nồng độ cao; và có độ ổn định tuyệt vời. Ngoài ra, dược phẩm giúp ngăn ngừa và điều trị bệnh thoái hóa điểm vàng theo sáng chế có thể được bảo quản trong thời gian dài.



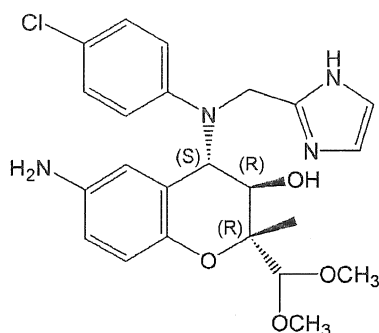
Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch chứa dẫn xuất benzopyran hoặc muối được dụng của nó. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch không chỉ chứa dẫn xuất benzopyran hoặc muối được dụng của nó và chất ổn định cụ thể; mà còn có khoảng giá trị pH cụ thể.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Dẫn xuất benzopyran có công thức 1, tên hóa học của nó là (2R,3R,4S)-6-amino-4-[N-(4-clophenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmetyl)amino]-3-hydroxy-2-metyl-2-dimetoxymetyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran, được biết đến là hợp chất có hiệu quả trị liệu đối với bệnh ung thư, viêm khớp dạng thấp, v.v. (bằng sáng chế Hàn Quốc số 10-0492252).

<Công thức 1>



Tương tự, hợp chất có công thức 1 có thể được điều chế dưới dạng chế phẩm thuốc nhỏ mắt trên cơ sở nguyên liệu có trọng lượng phân tử thấp; và được dùng để ngăn ngừa và điều trị thoái hóa điểm vàng, mà không cần tiêm trực tiếp vào vị trí mắc bệnh như trong liệu pháp tiêm kháng thể (công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 10-2012-0112162). Công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 10-2012-0112162 mô tả chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch hoặc dạng huyền phù. Ví dụ, công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 10-2012-0112162 mô tả chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch chứa hợp chất có công thức 1 có nồng độ 0,06% trọng lượng/thể tích và 0,09% trọng lượng/thể tích, được điều chế bằng cách sử dụng polyetylen glycol và glyxerin làm chất tan.

Trong khi đó, để điều trị hiệu quả bệnh thoái hóa điểm vàng, đòi hỏi chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch phải chứa hợp chất có công thức 1 ở nồng độ cao, ví dụ, ở nồng độ 0,3% trọng lượng/thể tích hoặc cao hơn (tức là, ở nồng độ 3,0 mg/ml hoặc cao hơn). Tuy nhiên, do hợp chất có công thức 1 là vật liệu tan kém trong nước, chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 10-2012-0112162 gặp một vấn đề là hợp chất có công thức 1 không thể tan trong nồng độ cao là 3,0 mg/ ml hoặc cao hơn. Ngoài ra, hợp chất có công thức 1 có độ ổn định kém trong môi trường nước. Do đó, khi hợp chất có công thức 1 có nồng độ cao là 3,0 mg/ ml hoặc cao hơn, có một vấn đề đó là tạo ra sản phẩm phân hủy tăng lên đáng kể.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần được giải quyết

Tác giả sáng chế đã thực hiện nhiều nghiên cứu khác nhau để phát triển chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch không chỉ chứa hợp chất có công thức 1 ở nồng độ cao (ví dụ, nồng độ là 3,0 mg/ml hoặc cao hơn) trong môi trường nước mà còn có độ ổn định được cải thiện. Kết quả là, tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, bằng cách tiến hành quá trình bào chế thông qua điều chỉnh pH của dung dịch đến khoảng cụ thể (tức là, pH 4,0 đến pH 5,0) và sử dụng chất ổn định cụ thể (tức là, propylen glycol), có thể bào chế chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch chứa hợp chất có công thức 1 ở nồng độ cao và có độ ổn định tuyệt vời. Ngoài ra, tác giả sáng chế cũng phát hiện ra rằng, khi chế phẩm thuốc nhỏ mắt thu được được nạp vào trong lọ đựng chần sáng, nó có thể thu được được phẩm có thể được bảo quản trong thời gian dài.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch, bao gồm hợp chất có công thức 1 hoặc muối được dụng của nó; và propylen glycol làm chất ổn định, trong đó chế phẩm thuốc nhỏ mắt có giá trị pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,0.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất được phẩm giúp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thoái hóa điểm vàng thu được bằng cách nạp chế phẩm thuốc nhỏ mắt vào trong lọ đựng chần sáng.

Giải pháp kỹ thuật để giải quyết vấn đề

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch, chứa

(2R,3R,4S)-6-amino-4-[N-(4-clophenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmetyl)amino]-3-hydroxy-2-metyl-2-dimetoxymetyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran hoặc muối được dụng của nó; propylen glycol làm chất ổn định; và chất điều chỉnh độ pH trong môi trường nước, trong đó chế phẩm thuốc nhỏ mắt có giá trị pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,0 được đề xuất.

Trong chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo sáng chế, (2R,3R,4S)-6-amino-4-[N-(4-clophenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmetyl)amino]-3-hydroxy-2-metyl-2-dimetoxymetyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran hoặc muối được dụng của nó có mặt với nồng độ 3 mg/ml hoặc cao hơn, tốt hơn nếu nồng độ nằm trong khoảng từ 3 đến 10 mg/ml. Và, propylen glycol có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 20 mg/ml, tốt hơn nếu từ 5 đến 17 mg/ml, tốt hơn nữa nếu từ 10 đến 15 mg/ml. Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo sáng chế có thể có giá trị pH nằm trong khoảng từ 4,2 đến 4,7, tốt hơn nếu giá trị pH khoảng 4,5.

Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo sáng chế còn có thể chứa thêm một hoặc nhiều tá được được chọn từ nhóm bao gồm chất ổn định bổ trợ, chất đệm và chất bảo quản. Chất ổn định bổ trợ có thể là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit etylendiamintetraaxetic hoặc muối của nó và trometamin. Chất đệm có thể là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm borax, axit boric, muối phosphat, axit xitric, natri xitrat, và axit aminocaproic. Chất bảo quản có thể là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm benzalkonium clorua, clorhexidin gluconat, axit sorbic, clobutanol, và paraben.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thoái hóa điểm vàng thu được bằng cách nạp chế phẩm thuốc nhỏ mắt vào trong lọ đựng chần sáng. Tốt hơn nếu, được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thoái hóa điểm vàng theo sáng chế thu được bằng cách nạp chế phẩm thuốc nhỏ mắt vào trong lọ đựng chần sáng và sau đó đóng gói sản phẩm thu được trong hộp giấy.

Hiệu quả thu được của sáng chế

Chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch theo sáng chế có thể chứa hợp chất có công thức 1 ở nồng độ cao và cũng có độ ổn định tuyệt vời. Ngoài ra, được phẩm theo

sáng chế có thể được bảo quản trong thời gian dài. Do đó, chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch và được phẩm theo sáng chế được sử dụng trong ngăn ngừa và điều trị bệnh thoái hóa điểm vàng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 trình bày kết quả thu được bằng cách đánh giá hiệu quả ức chế chống lại hiện tượng mạch rò rỉ của chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo sáng chế ở mô hình động vật mắc thoái hóa điểm vàng.

Fig. 2 trình bày kết quả thu được bằng cách đánh giá hiệu quả ức chế chống lại sự hình thành mạch máu võng mạc gây bệnh của chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo sáng chế ở mô hình động vật mắc thoái hóa điểm vàng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch, chứa (2R,3R,4S)-6-amino-4-[N-(4-clophenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmetyl)amino]-3-hydroxy-2-metyl-2-dimetoxymetyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran hoặc muối được dụng của nó; propylen glycol làm chất ổn định; và chất điều chỉnh độ pH trong môi trường nước, trong đó chế phẩm thuốc nhỏ mắt có giá trị pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,0.

Trong chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo sáng chế, môi trường nước chứa nước vô trùng dùng để tiêm, nước tinh khiết vô trùng, nước muối sinh lý, v.v..

Trong chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo sáng chế, (2R,3R,4S)-6-amino-4-[N-(4-clophenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmetyl)amino]-3-hydroxy-2-metyl-2-dimetoxymetyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran có cấu trúc hóa học theo công thức 1, như đã mô tả ở trên. Muối được dụng của hợp chất có công thức 1 có thể ở dạng muối cộng axit, muối kim loại kiềm, hoặc muối kim loại kiềm thổ, được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 10-2012-0112162, nhưng không chỉ giới hạn ở các muối này. Trong chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo sáng chế, hợp chất có công thức 1 có thể có mặt với nồng độ là 3 mg/ml hoặc cao hơn, tốt hơn nếu nồng độ nằm trong khoảng từ 3 đến 10 mg/ml.

Sáng chế phát hiện ra rằng, khi tiến hành bào chế hợp chất có công thức 1 sử dụng propylen glycol làm chất ổn định, độ ổn định của chế phẩm thuốc nhỏ mắt thu được có thể được cải thiện đáng kể. Propylen glycol có thể có mặt với nồng độ nằm

trong khoảng từ 1 đến 20 mg/ml, tốt hơn nếu nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 17 mg/ml, tốt hơn nữa nếu nồng độ nằm trong khoảng từ 10 đến 15 mg/ml, tốt nhất nếu nồng độ khoảng 13 mg/ml (tức là, nồng độ nằm trong khoảng từ 12 đến 14 mg/ml).

Sáng chế cũng phát hiện ra rằng, khi pH của chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch được điều chỉnh đến một khoảng giá trị cụ thể (tức là pH 4,0 đến pH 5,0), hợp chất có công thức 1 có thể bị hòa tan trong nồng độ cao, mà không tạo kết tủa. Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo sáng chế có thể có giá trị pH nằm trong khoảng từ 4,2 đến 4,7, tốt hơn nếu giá trị pH khoảng 4,5) (tức là, pH nằm trong khoảng từ 4,4 đến 4,6). Việc điều chỉnh pH có thể được thực hiện sử dụng chất điều chỉnh độ pH thông thường được sử dụng trong lĩnh vực chế phẩm thuốc nhỏ mắt, ví dụ axit hydrocloric và/hoặc natri hydroxit, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này.

Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo sáng chế còn có thể chứa một hoặc nhiều tá dược được chọn từ nhóm bao gồm chất ổn định bổ trợ, chất đệm và chất bảo quản. Hàm lượng của tá dược có thể được lựa chọn thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, khi xem xét về chức năng tương ứng.

Chất ổn định bổ trợ có thể là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit etylenđiamintetraaxetic hoặc muối của nó (ví dụ, muối natri của nó) và trometamin. Ví dụ, chất ổn định bổ trợ có thể được sử dụng với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 10,0 mg/ml, nhưng không chỉ giới hạn ở hàm lượng này.

Chất đệm có thể là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm borax, axit boric, muối phosphat (ví dụ, natri phosphat, natri hydro phosphat, kali phosphat, v.v.), axit citric, natri citrat, và axit aminocaproic. Ví dụ, chất đệm có thể được sử dụng với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 18,0 mg/ml, phụ thuộc vào loại của nó.

Chất bảo quản có thể là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm benzalkonium clorua, clorhexidin gluconat, clorbutanol, axit sorbic (ví dụ, axit sorbic, kali sorbat, natri sorbat, v.v.), và paraben (ví dụ, metylparaben, propylparaben, v.v.). Ví dụ, chất bảo quản có thể được sử dụng với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,5 mg/ml, nhưng không chỉ giới hạn ở hàm lượng này.

Nếu cần, chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo sáng chế có thể được lọc vô trùng bằng, ví dụ, bộ lọc vi khuẩn chẳng hạn màng lọc 0,2 μ m và sau đó được nạp vào lọ đựng

thích hợp.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch, chứa

(2R,3R,4S)-6-amino-4-[N-(4-clophenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmetyl)amino]-3-hydroxy-2-metyl-2-dimetoxymetyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran hoặc muối được dụng của nó; propylen glycol, axit etylendiamintetraaxetic hoặc muối của nó; trometamin; borax; axit boric; benzalkonium clorua; và chất điều chỉnh độ pH trong môi trường nước, trong đó chế phẩm thuốc nhỏ mắt có giá trị pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,0.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch, chứa từ 3 đến 10 mg/ml (2R,3R,4S)-6-amino-4-[N-(4-clophenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmetyl)amino]-3-hydroxy-2-metyl-2-dimetoxymetyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran hoặc muối được dụng của nó; 1 đến 20 mg/ml là propylen glycol; 0,01 đến 1,0 mg/ml là axit etylendiamintetraaxetic hoặc muối của nó; 0,05 đến 10,0 mg/ml là trometamin; 1,0 đến 11,0 mg/ml là borax; 0,1 đến 18,0 mg/ml là axit boric; 0,01 đến 0,5 mg/ml là benzalkonium clorua; và chất điều chỉnh độ pH trong môi trường nước, trong đó chế phẩm thuốc nhỏ mắt có giá trị pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,0.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch, chứa từ 3 đến 10 mg/ml (2R,3R,4S)-6-amino-4-[N-(4-clophenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmetyl)amino]-3-hydroxy-2-metyl-2-dimetoxymetyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran hoặc muối được dụng của nó; 10 đến 15 mg/ml là propylen glycol; 0,5 mg/ml là axit etylendiamintetraaxetic hoặc muối của nó; 0,35 mg/ml là trometamin; 5,8 đến 5,9 mg/ml là borax; 0,5 đến 0,6 mg/ml là axit boric; 0,05 đến 0,15 mg/ml là benzalkonium clorua; và chất điều chỉnh độ pH trong môi trường nước, trong đó chế phẩm thuốc nhỏ mắt có giá trị pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,0 được đề xuất.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm giúp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thoái hóa điểm vàng thu được bằng cách nạp chế phẩm thuốc nhỏ mắt vào trong lọ đựng chắn sáng. Tốt hơn nếu, được phẩm giúp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thoái hóa điểm vàng theo sáng chế có thể thu được bằng cách nạp chế phẩm thuốc nhỏ mắt vào trong lọ đựng chắn sáng và sau đó đóng gói sản phẩm thu được trong hộp giấy. Lọ đựng chắn

sáng bao gồm, ví dụ, lọ đựng polyetylen tỷ trọng thấp (LDPE) không trong suốt và lọ đựng polypropylen (PP) không trong suốt, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế cũng sẽ được mô tả chi tiết thêm cùng với việc tham khảo tới các ví dụ sau đây. Các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và không được dự tính để làm giới hạn của sáng chế.

Trong ví dụ bào chế, ví dụ và ví dụ thực nghiệm sau đây, HL217 có nghĩa là (2R,3R,4S)-6-amino-4-[N-(4-clophenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmetyl)amino]-3-hydroxy-2-metyl-2-dimetoxymetyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran.

Ví dụ bào chế 1: Đánh giá việc sản xuất chế phẩm thuốc nhỏ mắt có nồng độ cao

Việc sản xuất chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch được đánh giá bằng cách hòa tan HL217 theo cách tương tự, ngoại trừ việc sử dụng nồng độ là 0,3% trọng lượng/thể tích (tức là, nồng độ là 3,0 mg/ml) làm hàm lượng HL217, trong dung dịch thuốc nhỏ mắt (dung dịch thuốc nhỏ mắt 0,06% trọng lượng/thể tích và 0,09% trọng lượng/thể tích) được mô tả trong ví dụ bào chế 1 và 2 của công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 10-2012-0112162. Đó là, theo các thành phần và hàm lượng được trình bày trong bảng 1, HL217, polyetylen glycol 400, glyxerin, EDTA, và axit boric được thêm vào nước tinh khiết vô trùng trong khi khuấy. Giá trị pH được điều chỉnh thành 6,5 bằng dung dịch axit hydrocloric và hoặc dung dịch natri hydroxit chứa nước; và sau đó nước tinh khiết vô trùng được thêm vào dung dịch để điều chỉnh về thể tích cuối cùng. Hàm lượng trong bảng 1 đại diện cho hàm lượng của mỗi thành phần trên mỗi 1 mL của tổng thể tích

Bảng 1

Thành phần	Ví dụ bào chế 1 (pH 6,5)
HL217	3,0 mg
Polyetylen glycol 400	150 mg
Glyxerin	120 mg
EDTA	0,5 mg
Axit boric	10 mg
HCl	q.s.
NaOH	q.s.
Bề ngoài của mẫu	Kết tủa được tạo ra

Như được trình bày ở trên, khi nồng độ của thành phần hoạt hóa HL217 tăng lên thành 3,0 mg/ml, kết tủa được tạo ra và do đó dung dịch được bào chế.

Ví dụ bào chế 2: Đánh giá độ tan của HL217 và độ ổn định

(1) độ tan của HL217

Để hòa tan HL217 trong nồng độ cao (trong nồng độ là 0,3% trọng lượng/thể tích hoặc cao hơn), các yếu tố lý hóa khác nhau được đánh giá. Do nồng độ cho phép tối đa của Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ đối với polyetylen glycol 400 là 50 mg/ml trong chế phẩm thuốc nhỏ mắt, hàm lượng của polyetylen glycol 400 được điều chỉnh thành 1/10 (tức là, 15,0 mg) và tương ứng hàm lượng của glycerin cũng được điều chỉnh thành 1/10 (tức là, 12,0 mg) để đánh giá độ tan của HL217. Trong khi đánh giá hiệu quả của các yếu tố lý hóa khác nhau, phát hiện ra rằng pH của dung dịch có ảnh hưởng lớn đến độ tan của HL217. Tức là, khi pH được điều chỉnh về khoảng giá trị từ $4,5 \pm 0,5$ trong số các yếu tố khác, thu được dung dịch trong suốt mà không tạo ra kết tủa. Cụ thể là, theo các thành phần và hàm lượng được trình bày trong bảng 2, HL217, polyetylen glycol 400, glycerin, EDTA, và axit boric được thêm vào nước tinh khiết vô trùng trong khi khuấy. Giá trị pH được điều chỉnh thành 4,5 bằng dung dịch axit hydrocloric và hoặc dung dịch natri hydroxit; và sau đó nước tinh khiết vô trùng được thêm vào dung dịch để điều chỉnh về thể tích cuối cùng. Hàm lượng trong bảng 2 đại diện cho hàm lượng của mỗi thành phần trên 1 mL của tổng thể tích

Bảng 2

Thành phần	Ví dụ bào chế 2-1 (pH 4,5)	Ví dụ bào chế 2-2 (pH 4,5)	Ví dụ bào chế 2-3 (pH 4,5)
HL217	3,0 mg	3,0 mg	3,0 mg
Polyetylen glycol 400	15,0 mg	-	15,0 mg
Glycerin	12,0 mg	12,0 mg	12,0 mg
EDTA	0,5 mg	0,5 mg	0,5 mg
Axit boric	10,0 mg	10,0 mg	10,0 mg
HCl	q.s.	q.s.	q.s.
NaOH	q.s.	q.s.	q.s.
Bề ngoài của mẫu	Dung dịch trong suốt	Dung dịch trong suốt	Dung dịch trong suốt

Như có thể thấy từ kết quả trong bảng 2, mặc dù hàm lượng của chất ổn định hỗ trợ (tức là, polyetylen glycol 400 và glyxerin) là 1/10 lần, vẫn thu được dung dịch trong suốt mà không tạo ra kết tủa dưới điều kiện pH 4,5.

(2) đánh giá độ ổn định

Dung dịch trong ví dụ bào chế 2-1, 2-2, và 2-3 được bảo quản trong 4 tuần lần lượt dưới điều kiện trong tủ lạnh ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$), dưới điều kiện nhiệt độ phòng ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $40\pm 5\%$), và dưới điều kiện tăng tốc ($40\pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm 25%), để đo hàm lượng của sản phẩm phân hủy. Do hàm lượng của sản phẩm phân hủy, hàm lượng của sản phẩm phân hủy tối đa và hàm lượng của tổng hàm lượng phân hủy được đo bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) dưới các điều kiện sau đây.

<Các điều kiện HPLC>

- Đầu dò: Quang phổ kế UV/vis (bước sóng: 254 nm)
- Cột: Cột Luna C8 (4.6 * 250 mm, 5 μm)
- Tốc độ dòng chảy: 1,0 mL/phút
- Thể tích tiêm: 20 μL
- Pha động: dung dịch đệm amoni format : axetonitril = 50 : 50

(dung dịch đệm amoni format được điều chế bằng cách điều chỉnh pH của dung dịch amoni format (10 nM) thành pH 5,5 bằng axit phosphoric).

- Nhiệt độ cột: khoảng 30°C
- Nhiệt độ mẫu: khoảng 4°C

Các kết quả thu được bằng cách đo hàm lượng của sản phẩm phân hủy như đã mô tả ở trên được trình bày trong các bảng 3 đến 5 dưới đây.

Bảng 3: Hàm lượng của sản phẩm phân hủy của dung dịch trong ví dụ bào chế 2-1

Điều kiện bảo quản		Ban đầu	2 tuần	4 tuần
Điều kiện trong tủ lạnh	Sản phẩm phân hủy tối đa	0,32%	0,99%	1,24%
	Tổng sản phẩm phân hủy	0,38%	1,61%	1,80%
Điều kiện nhiệt	Sản phẩm phân hủy tối đa	0,32%	1,37%	2,16%

độ phòng	Tổng sản phẩm phân hủy	0,38%	2,23%	3,61%
Điều kiện được tăng tốc	Sản phẩm phân hủy tối đa	0,32%	2,14%	2,61%
	Tổng sản phẩm phân hủy	0,38%	3,33%	4,00%

Bảng 4: Hàm lượng của sản phẩm phân hủy của dung dịch trong ví dụ bào chế 2-2

Điều kiện bảo quản		ban đầu	2 tuần	4 tuần
Điều kiện trong tủ lạnh	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	0,65%	1,08%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	1,15%	1,53%
Điều kiện nhiệt độ phòng	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	0,98%	1,54%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	1,56%	2,85%
Điều kiện được tăng tốc	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	1,75%	2,54%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	2,53%	3,38%

Bảng 5: Hàm lượng của sản phẩm phân hủy của dung dịch trong ví dụ bào chế 2-3

Điều kiện bảo quản		ban đầu	2 tuần	4 tuần
Điều kiện trong tủ lạnh	Sản phẩm phân hủy tối đa	0,36%	1,10%	1,35%
	Tổng sản phẩm phân hủy	0,42%	1,10%	1,71%
Điều kiện nhiệt độ phòng	Sản phẩm phân hủy tối đa	0,36%	1,52%	1,79%
	Tổng sản phẩm phân hủy	0,42%	1,97%	2,71%
Điều kiện được tăng tốc	Sản phẩm phân hủy tối đa	0,36%	2,54%	3,01%
	Tổng sản phẩm phân hủy	0,42%	3,78%	4,36%

Như có thể thấy từ kết quả trong bảng 3 đến 5, dung dịch trong ví dụ bào chế 2-1 đến 2-3 cho thấy tăng đáng kể sản phẩm phân hủy dưới tất cả các điều kiện sau 2 tuần và 4 tuần, và do đó không thích hợp với hàm lượng sản phẩm phân hủy có thể chấp nhận (sản phẩm phân hủy tối đa: 1% hoặc nhỏ hơn, tổng số sản phẩm phân hủy: 2% hoặc nhỏ hơn).

Ví dụ 1 và 2: Bào chế chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch chứa HL217

(1) Bào chế chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch

Theo các thành phần và hàm lượng được trình bày trong bảng 6, chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch, bao gồm propylen glycol thay cho polyetylen glycol/glyxerin, được điều chế. Tức là, theo các thành phần và hàm lượng trình bày trong bảng 6, HL217, propylen glycol, (các) chất ổn định (EDTA và/hoặc trometamin), chất đệm (axit boric và borax) và benzalkonium clorua được thêm vào nước tinh khiết vô trùng trong khi khuấy. Giá trị pH được điều chỉnh thành 4,5 bằng dung dịch axit hydrocloric và hoặc dung dịch natri hydroxit; và sau đó nước tinh khiết vô trùng được thêm vào dung dịch để điều chỉnh về thể tích cuối cùng. Hàm lượng trong bảng 6 đại diện cho hàm lượng của mỗi thành phần trên 1 mL của tổng thể tích

Bảng 6

Thành phần	Ví dụ 1 (pH 4,5)	Ví dụ 2 (pH 4,5)
HL217	3,0 mg	3,0 mg
Propylen glycol	13,0 mg	13,0 mg
EDTA	0,5 mg	0,5 mg
trometamin	-	0,35 mg
Axit boric	5,82 mg	5,82 mg
Borax	0,588 mg	0,588 mg
Benzalkonium clorua	0,1 mg	0,1 mg
HCl	q.s.	q.s.
NaOH	q.s.	q.s.
Bề ngoài của mẫu	Dung dịch trong suốt	Dung dịch trong suốt

(2) Đánh giá độ ổn định

Dung dịch trong ví dụ 1, và 2 được bảo quản trong 4 tuần lần lượt dưới điều kiện trong tủ lạnh ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$), dưới điều kiện nhiệt độ phòng ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $40\pm 5\%$), và dưới điều kiện tăng tốc ($40\pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm 25%), để đo hàm lượng của sản phẩm phân hủy theo cách tương tự như trong (2) ví dụ bào chế 2. Kết quả được trình bày trong bảng 7 và 8 dưới đây.

Bảng 7: Hàm lượng của sản phẩm phân hủy của dung dịch trong ví dụ 1

Điều kiện bảo quản		ban đầu	2 tuần	4 tuần
Điều kiện trong tủ lạnh	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	Không phát hiện ra	0,03%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	Không phát hiện ra	0,03%
Điều kiện nhiệt độ phòng	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	0,06%	0,16%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	0,09%	0,21%
Điều kiện được tăng tốc	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	0,34%	0,79%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	0,66%	1,62%

Bảng 8: Hàm lượng của sản phẩm phân hủy của dung dịch trong ví dụ 2

Điều kiện bảo quản		ban đầu	2 tuần	4 tuần
Điều kiện trong tủ lạnh	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	Không phát hiện ra	0,04%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	Không phát hiện ra	0,04%
Điều kiện nhiệt độ phòng	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	0,07%	0,18%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	0,10%	0,23%
Điều kiện được tăng tốc	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	0,36%	0,88%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	0,64%	1,60%

Như có thể thấy từ các kết quả trong bảng 6 đến 8, khi sử dụng propylen glycol và điều chỉnh pH của dung dịch thành pH 4,5, thu được dung dịch trong suốt mà không tạo ra kết tủa và tạo ra sản phẩm phân hủy giảm đi đáng kể dưới tất cả các điều kiện bảo quản (tức là, dưới điều kiện trong tủ lạnh, dưới điều kiện nhiệt độ phòng, và dưới điều kiện được tăng tốc). Do đó, chế phẩm thuốc nhỏ mắt thích hợp cho hàm lượng sản phẩm phân hủy có thể chấp nhận (sản phẩm phân hủy tối đa: 1% hoặc nhỏ hơn, tổng số sản phẩm phân hủy: 2% hoặc nhỏ hơn). Và tương tự, dung dịch được điều chế bằng cách bổ sung thêm trometamin làm chất ổn định cho thấy độ ổn định tăng lên

một chút dưới điều kiện làm tăng tốc so với dung dịch mà không được thêm trometamin, mặc dù không đáng kể.

Ví dụ 3 và 4: Bào chế chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch chứa HL217

(1) Bào chế chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch

Theo các thành phần và hàm lượng được trình bày trong bảng 9, chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch được điều chế. Đó là, chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch được điều chế theo cách tương tự như trong ví dụ 2, lần lượt tăng nồng độ của HL217 thành 5,0 mg/ml và 10,0 mg/ml. Hàm lượng trong bảng 9 đại diện cho hàm lượng của mỗi thành phần trên mỗi 1 mL của tổng thể tích

Bảng 9

Thành phần	Ví dụ 3 (pH 4,5)	Ví dụ 4 (pH 4,5)
HL217	5,0 mg	10,0 mg
Propylen glycol	13,0 mg	13,0 mg
EDTA	0,5 mg	0,5 mg
trometamin	0,35 mg	0,35 mg
Axit boric	5,82 mg	5,82 mg
Borax	0,588 mg	0,588 mg
Benzalkonium clorua	0,1 mg	0,1 mg
HCl	q.s.	q.s.
NaOH	q.s.	q.s.
Bề ngoài của mẫu	Dung dịch trong suốt	Dung dịch trong suốt

(2) Đánh giá độ ổn định

Dung dịch trong ví dụ 3 và 4 được bảo quản trong 4 tuần lần lượt dưới điều kiện trong tủ lạnh ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$), dưới điều kiện nhiệt độ phòng ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $40\pm 5\%$), và dưới điều kiện được tăng tốc ($40\pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm 25%), để đo hàm lượng của sản phẩm phân hủy theo cách tương tự như trong (2) Ví dụ bào chế 2. Kết quả được trình bày trong bảng 10 và 11 dưới đây.

Bảng 10: Hàm lượng của sản phẩm phân hủy của dung dịch trong ví dụ 3

Điều kiện bảo quản		ban đầu	2 tuần	4 tuần
Điều kiện trong tủ lạnh	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	0,03%	0,04%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	0,03%	0,04%
Điều kiện nhiệt độ phòng	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	0,08%	0,16%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	0,10%	0,22%
Điều kiện được tăng tốc	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	0,35%	0,79%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	0,67%	1,63%

Bảng 11: Hàm lượng của sản phẩm phân hủy của dung dịch trong ví dụ 4

Điều kiện bảo quản		ban đầu	2 tuần	4 tuần
Điều kiện trong tủ lạnh	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	0,03%	0,04%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	0,07%	0,05%
Điều kiện nhiệt độ phòng	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	0,07%	0,15%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	0,10%	0,23%
Điều kiện được tăng tốc	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	0,33%	0,89%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	0,62%	1,71%

Như có thể thấy từ các kết quả trong bảng 9 đến 11, khi sử dụng propylen glycol và điều chỉnh pH của dung dịch thành pH 4,5, thu được dung dịch trong suốt chứa HL217 ở nồng độ cao (ví dụ, 10 mg/ml) và thích hợp đối với hàm lượng sản phẩm phân hủy có thể chấp nhận (sản phẩm phân hủy tối đa: 1% hoặc nhỏ hơn, tổng số sản phẩm phân hủy: 2% hoặc nhỏ hơn) dưới tất cả các điều kiện (tức là, dưới điều kiện trong tủ lạnh, dưới điều kiện nhiệt độ phòng, và dưới điều kiện được tăng tốc).

Ví dụ 5 đến 7: Bào chế chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch chứa HL217

(1) Bào chế chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch

Theo các thành phần và hàm lượng được trình bày trong bảng 12, chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch được điều chế. Đó là, chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch được điều chế theo cách tương tự như trong ví dụ 2, lần lượt thay đổi nồng độ của propylen glycol thành 1,0 mg/ml, 5,0 mg/ml và 20,0 mg/ml. Hàm lượng trong bảng 12 đại diện cho hàm lượng của mỗi thành phần trên mỗi 1 mL của tổng thể tích

Bảng 12

Thành phần	Ví dụ 5 (pH 4,5)	Ví dụ 6 (pH 4,5)	Ví dụ 7 (pH 4,5)
HL217	3,0 mg	3,0 mg	3,0 mg
Propylen glycol	1,0 mg	5,0 mg	20,0 mg
EDTA	0,5 mg	0,5 mg	0,5 mg
trometamin	0,35 mg	0,35 mg	0,35 mg
Axit boric	5,82 mg	5,82 mg	5,82 mg
Borax	0,588 mg	0,588 mg	0,588 mg
Benzalkonium clorua	0,1 mg	0,1 mg	0,1 mg
HCl	q.s.	q.s.	q.s.
NaOH	q.s.	q.s.	q.s.
Bề ngoài của mẫu	Dung dịch trong suốt	Dung dịch trong suốt	Dung dịch trong suốt

(2) Đánh giá độ ổn định

Dung dịch trong ví dụ 5 đến 7 được bảo quản trong 4 tuần lần lượt dưới điều kiện trong tủ lạnh ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$), dưới điều kiện nhiệt độ phòng ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $40\pm 5\%$), và dưới điều kiện được tăng tốc ($40\pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm 25%), để đo hàm lượng của sản phẩm phân hủy theo cách tương tự như trong (2) Ví dụ bào chế 2. Kết quả được trình bày trong bảng 13 đến 15 dưới đây.

Bảng 13: Hàm lượng của sản phẩm phân hủy của dung dịch trong ví dụ 5

Điều kiện bảo quản		ban đầu	2 tuần	4 tuần
Điều kiện trong tủ lạnh	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	Không phát hiện ra	Không phát hiện ra
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	Không phát hiện ra	Không phát hiện ra
Điều kiện nhiệt độ phòng	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	0,07%	0,16%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	0,09%	0,21%
Điều kiện được tăng tốc	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	0,35%	0,87%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	0,64%	1,66%

Bảng 14: Hàm lượng của sản phẩm phân hủy của dung dịch trong ví dụ 6

Điều kiện bảo quản		ban đầu	2 tuần	4 tuần
Điều kiện trong tủ lạnh	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	Không phát hiện ra	Không phát hiện ra
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	Không phát hiện ra	Không phát hiện ra
Điều kiện nhiệt độ phòng	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	0,06%	0,16%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	0,09%	0,22%
Điều kiện được tăng tốc	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	0,34%	0,79%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	0,64%	1,57%

Bảng 15: Hàm lượng của sản phẩm phân hủy của dung dịch trong ví dụ 7

Điều kiện bảo quản		ban đầu	2 tuần	4 tuần
Điều kiện trong tủ lạnh	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	Không phát hiện ra	Không phát hiện ra
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	Không phát hiện ra	Không phát hiện ra
Điều kiện nhiệt độ phòng	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	0,08%	0,16%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	0,14%	0,20%
Điều kiện được tăng tốc	Sản phẩm phân hủy tối đa	Không phát hiện ra	0,33%	0,83%
	Tổng sản phẩm phân hủy	Không phát hiện ra	0,62%	1,56%

Như có thể thấy từ các kết quả trong bảng 12 đến 15, khi sử dụng propylen glycol tại nồng độ là 1 mg/ml đến 20 mg/ml, thu được dung dịch trong suốt mà không tạo ra kết tủa và thích hợp đối với hàm lượng sản phẩm phân hủy có thể chấp nhận (sản phẩm phân hủy tối đa: 1% hoặc nhỏ hơn, tổng số sản phẩm phân hủy: 2% hoặc nhỏ hơn) dưới tất cả các điều kiện (tức là, dưới điều kiện trong tủ lạnh, dưới điều kiện nhiệt độ phòng, và dưới điều kiện được tăng tốc).

Ví dụ bào chế 1: Thử nghiệm độ bền với ánh sáng

Độ bền với ánh sáng của chế phẩm thuốc nhỏ mắt được đánh giá sử dụng lần lượt lọ đựng polyetylen tỷ trọng thấp (LDPE) trong suốt [PurellPE1810E tự nhiên (GERRESHEIMER)] làm lọ đựng trong suốt, lọ đựng polyetylen tỷ trọng thấp (LDPE) không trong suốt [PurellPE1810E màu trắng (GERRESHEIMER)] làm lọ đựng không trong suốt, và một hộp giấy. Tức là, chế phẩm thuốc nhỏ mắt được điều chế trong ví dụ 2 được bảo quản dưới điều kiện bảo quản trong bảng 16 dưới đây. Mỗi nhóm thử nghiệm được đặt trong buồng chụp ảnh và sau đó được phơi với ánh sáng cực tím trong 40 giờ dưới điều kiện 5 w/m² hoặc phơi với ánh sáng nhìn thấy trong 40 giờ dưới

điều kiện 30000 Luxo/giờ. Sau khi phơi trong 40 giờ, hàm lượng của sản phẩm phân hủy được đo theo cách tương tự như trong (2) Ví dụ bào chế 2. Kết quả được trình bày trong bảng 17 dưới đây.

Bảng 16

	Điều kiện bảo quản
Nhóm thử nghiệm 1	Chế phẩm thuốc nhỏ mắt trong ví dụ 2 được bảo quản trong lọ đựng LPDE trong suốt.
Nhóm thử nghiệm 2	Chế phẩm thuốc nhỏ mắt trong ví dụ 2 được bảo quản trong lọ đựng LPDE không trong suốt.
Nhóm thử nghiệm 3	Chế phẩm thuốc nhỏ mắt trong ví dụ 2 được nạp vào trong lọ đựng LPDE trong suốt và sau đó được bảo quản trong hộp giấy.
Nhóm thử nghiệm 4	Chế phẩm thuốc nhỏ mắt trong ví dụ 2 được nạp vào trong lọ đựng LPDE không trong suốt và sau đó được bảo quản trong hộp giấy.

Bảng 17

	Ánh sáng cực tím				Ánh sáng nhìn thấy			
	Nhóm thử nghiệm 1	Nhóm thử nghiệm 2	Nhóm thử nghiệm 3	Nhóm thử nghiệm 4	Nhóm thử nghiệm 1	Nhóm thử nghiệm 2	Nhóm thử nghiệm 3	Nhóm thử nghiệm 4
Sản phẩm phân hủy tối đa	0,30%	0,10%	0,03%	0,03%	0,72%	0,03%	0,03%	0,03%
Tổng sản phẩm phân hủy	1,11%	0,13%	0,03%	0,06%	3,43%	0,04%	0,06%	0,04%

Như có thể thấy từ các kết quả của bảng 17. Tốt hơn nếu chế phẩm thuốc nhỏ mắt chứa HL217 được nạp vào trong lọ đựng không trong suốt; và tốt hơn nữa nếu chế phẩm thuốc nhỏ mắt chứa HL217 được nạp vào trong lọ đựng không trong suốt sau đó

được bảo quản trong hộp giấy.

Ví dụ bào chế 2: Thử nghiệm hiệu quả ở động vật

Hiệu quả chống lại thoái hóa điểm vàng được chứng minh sử dụng chuột mất chức năng gen có thụ thể lipoprotein mật độ rất thấp (*vldlr*) (chuột C57B1/6, Jackson Laboratory, USA) làm mô hình chuột mắc thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi tác (AMD). Thuốc tiêm Lucentis™ (Novartis, Basel, Switzerland) được sử dụng làm đối chứng dương.

Nhóm đối chứng được nhỏ 1 giọt nước muối sinh lý vô trùng, vào mỗi mắt của chuột bình thường (n=8), mỗi ngày hai lần trong 3 tuần. Nhóm mắc AMD được nhỏ 1 giọt nước muối sinh lý vô trùng, vào mỗi mắt của chuột mất chức năng gen *vldlr* (chuột *vldlr* -/-), mỗi ngày hai lần trong 3 tuần. Nhóm đối chứng dương nhận 1 µl thuốc tiêm Lucentis™ (chứa 50 ng/µl ranibizumab) vào mỗi mắt của chuột *vldlr*, bằng cách cung cấp trực tiếp vào dịch kính mắt sử dụng kim tiêm Hamilton (Hamilton company, Reno, NV, USA). Nhóm thử nghiệm được nhỏ 1 giọt chế phẩm thuốc nhỏ mắt trong ví dụ 2, vào mỗi mắt của chuột *vldlr* -/-, ngày hai lần trong 3 tuần.

Các thử nghiệm sau đó được thực hiện để đánh giá bất kỳ bất thường nào của mạch máu võng mạc, chẳng hạn sự hình thành mạch và độ thấm mạch máu bất thường. Khi mổ tử thi, tiến hành gây mê bằng cách tiêm trong bụng 10 mg/kg zolazepam (Zoletil, Virbac, Carros, France) và 10 mg/kg xylazin hydroclorua (Rumpun, Bayer, Frankfurt, Germany). Khoang bụng và khoang ngực được rạch để giữ an toàn cho tim; và sau đó 50 mg/mL florescein-dextran (khối lượng phân tử 10 Kda, Sigma, St. Louis, MO, USA) và 10 mg/mL Hoechst 33342 (Sigma) trong PBS vô trùng (1 mL) được tiêm vào tâm thất trái. Sau 10 phút, mắt được lấy ra và cố định trong dung dịch paraformaldehyt 4% trong 2 giờ để tách võng mạc. Võng mạc đã tách ra được đặt trên một phiến kính, được nhỏ keo dán lam kính chứa nước (Fluoromount™, Sigma, St. Louis, MO, USA) và sau đó được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Để phân tích định lượng thuốc nhuộm đánh dấu, máu được lấy từ tim 10 phút sau khi tiêm thuốc nhuộm, được truyền PBS vô trùng để loại bỏ thuốc nhuộm còn sót lại ra khỏi mạch máu, sau đó mắt được lấy ra để tách võng mạc. Võng mạc đã tách được đồng nhất bằng 100 µL PBS và sau đó được ly tâm để thu được dịch nổi, trong đó lượng FITC-dextran sau đó được đo bằng máy đo quang phổ. Cường độ huỳnh quang được

đo trong các điều kiện kích thích 485 nm và phát xạ 530 nm; và được tính toán với việc hiệu chỉnh các giá trị huỳnh quang FITC và nồng độ protein võng mạc trong máu. Kết quả của chúng được thể hiện trong Fig. 1.

Ngoài ra, các thử nghiệm sau đây đã được thực hiện để đánh giá quá trình hình thành mạch dưới võng mạc. Mô võng mạc đã tách ra được cố định với 4% paraformaldehyt trong 1 giờ và sau đó phản ứng với *Griffonia bandeiraea simplicifolia* isolectin B4 liên hợp với Alexa Fluor 594 (IB4 Alexa Fluor 594, độ pha loãng 1: 100; đầu dò phân tử, Hoa Kỳ) trong 2 giờ. Sau khi rửa đủ với PBS, mô võng mạc được đặt trên một phiến kính và nhỏ keo dán lam kính chứa nước (Fluoromount™, Sigma, St. Louis, MO, USA). Sau khi làm khô đủ, kết quả được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang và được chụp ảnh lại. Phần võng mạc được nhuộm H&E và sau đó mạch máu mới phát triển dưới võng mạc được phân tích bằng phần mềm ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Kết quả của chúng được thể hiện trong Fig. 2.

Như thấy trong Fig. 1, ở chuột bình thường, đường viền của các mạch máu rõ ràng và tính toàn vẹn của mạch máu bình thường được duy trì tốt. Tuy nhiên, ở chuột *vldlr* ^{-/-}, thuốc nhuộm đánh dấu huỳnh quang được tiêm vào mạch máu bị rò rỉ ra ngoài mạch máu (mũi tên màu trắng) để tăng cường độ huỳnh quang của võng mạc. Ngoài ra, vật liệu nhuộm Hoechst 33342, thể hiện huỳnh quang màu xanh lam, cũng bị rò rỉ ra khỏi mạch máu và do đó nhiều phát hiện về mạch rò rỉ đã được quan sát thấy; và các vùng mạch máu mới tạo ra dưới võng mạc (mũi tên đỏ) được quan sát thấy. Tuy nhiên, ở mắt được điều trị bằng chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo Ví dụ 2, rò rỉ mạch và hình thành mạch gây bệnh đã bị ức chế. Nhóm đối chứng dương cho thấy hiệu quả đáng kể chỉ ở tuần thứ 2 dùng thuốc.

Như có thể thấy từ Fig. 2, trong trường hợp phân tích nhuộm isolectin B4, chuột *vldlr* ^{-/-} cho thấy các búi mạch máu mới hình thành dưới võng mạc (mũi tên màu trắng) ở một số vị trí rải rác nhưng diện tích của chúng bị giảm đi khi sử dụng chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo Ví dụ 2. Ngoài ra, trong các phân tích nhuộm H&E của các phần võng mạc, chuột *vldlr* ^{-/-} cho thấy nhiều mạch máu mới hình thành bất thường ở vùng dưới võng mạc (vùng mũi tên), bị giảm đi khi sử dụng chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo Ví dụ 2.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm thuốc nhỏ mắt dạng dung dịch, chứa (2R,3R,4S)-6-amino-4-[N-(4-clophenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmetyl)amino]-3-hydroxy-2-metyl-2-dimetoxymetyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran hoặc muối được dụng của nó; propylen glycol làm chất ổn định; và chất điều chỉnh độ pH trong môi trường nước, trong đó chế phẩm thuốc nhỏ mắt này có giá trị pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,0.
2. Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo điểm 1, trong đó (2R,3R,4S)-6-amino-4-[N-(4-clophenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmetyl)amino]-3-hydroxy-2-metyl-2-dimetoxymetyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran hoặc muối được dụng của nó có mặt với nồng độ là 3 mg/ml hoặc cao hơn.
3. Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo điểm 1, trong đó (2R,3R,4S)-6-amino-4-[N-(4-clophenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmetyl)amino]-3-hydroxy-2-metyl-2-dimetoxymetyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran hoặc muối được dụng của nó có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 3 đến 10 mg/ml.
4. Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo điểm 1, trong đó propylen glycol có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 20 mg/ml.
5. Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo điểm 1, trong đó propylen glycol có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 17 mg/ml.
6. Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo điểm 1, trong đó propylen glycol có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 10 đến 15 mg/ml.
7. Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo điểm 1, trong đó chế phẩm thuốc nhỏ mắt có độ pH nằm trong khoảng từ 4,2 đến 4,7.
8. Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo điểm 1, trong đó chế phẩm thuốc nhỏ mắt có độ pH khoảng 4,5.
9. Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa thêm một hoặc nhiều tá dược được chọn từ nhóm bao gồm chất ổn định bổ trợ, chất đệm, và chất bảo quản.
10. Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo điểm 9, trong đó chất ổn định bổ trợ là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit etylendiamintetraaxetic hoặc muối của nó và trometamin.

11. Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo điểm 9, trong đó chất đệm là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm borax, axit boric, muối phosphat, axit xitric, natri xitrat, và axit aminocaproic.

12. Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo điểm 9, trong đó chất bảo quản là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm benzalkonium clorua, clorhexidin gluconat, axit sorbic, clobutanol, và paraben.

13. Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo điểm 1, chứa (2R,3R,4S)-6-amino-4-[N-(4-clophenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmetyl)amino]-3-hydroxy-2-metyl-2-dimetoxymetyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran hoặc muối được dụng của nó; propylen glycol, axit etylendiamintetraaxetic hoặc muối của nó; trometamin; borax; axit boric; benzalkonium clorua; và chất điều chỉnh độ pH trong môi trường nước.

14. Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo điểm 1, chứa từ 3 đến 10 mg/ml (2R,3R,4S)-6-amino-4-[N-(4-clophenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmetyl)amino]-3-hydroxy-2-metyl-2-dimetoxymetyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran hoặc muối được dụng của nó; 1 đến 20 mg/ml propylen glycol; 0,01 đến 1,0 mg/ml axit etylendiamintetraaxetic hoặc muối của nó; 0,05 đến 10,0 mg/ml trometamin; 1,0 đến 11,0 mg/ml borax; 0,1 đến 18,0 mg/ml axit boric; 0,01 đến 0,5 mg/ml benzalkonium clorua; và chất điều chỉnh độ pH trong môi trường nước.

15. Chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo điểm 1, chứa từ 3 đến 10 mg/ml (2R,3R,4S)-6-amino-4-[N-(4-clophenyl)-N-(1H-imidazol-2-ylmetyl)amino]-3-hydroxy-2-metyl-2-dimetoxymetyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran hoặc muối được dụng của nó; 10 đến 15 mg/ml propylen glycol; 0,5 mg/ml axit etylendiamintetraaxetic hoặc muối của nó; 0,35 mg/ml trometamin; 5,8 đến 5,9 mg/ml borax; 0,5 đến 0,6 mg/ml axit boric; 0,05 đến 0,15 mg/ml benzalkonium clorua; và chất điều chỉnh độ pH trong môi trường nước.

16. Dược phẩm giúp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thoái hóa điểm vàng thu được bằng cách nạp chế phẩm thuốc nhỏ mắt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15 vào lọ đựng chắn sáng.

17. Dược phẩm giúp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thoái hóa điểm vàng theo điểm 16, trong đó dược phẩm này có thể thu được bằng cách nạp chế phẩm thuốc nhỏ mắt vào trong lọ đựng chắn sáng và sau đó đóng gói sản phẩm thu được trong hộp giấy.

FIG. 1

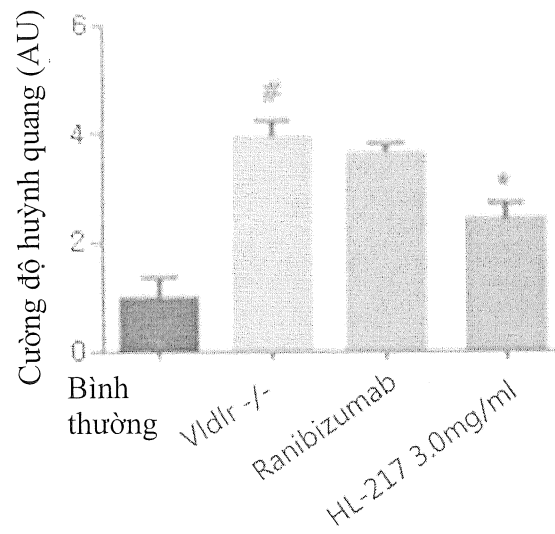
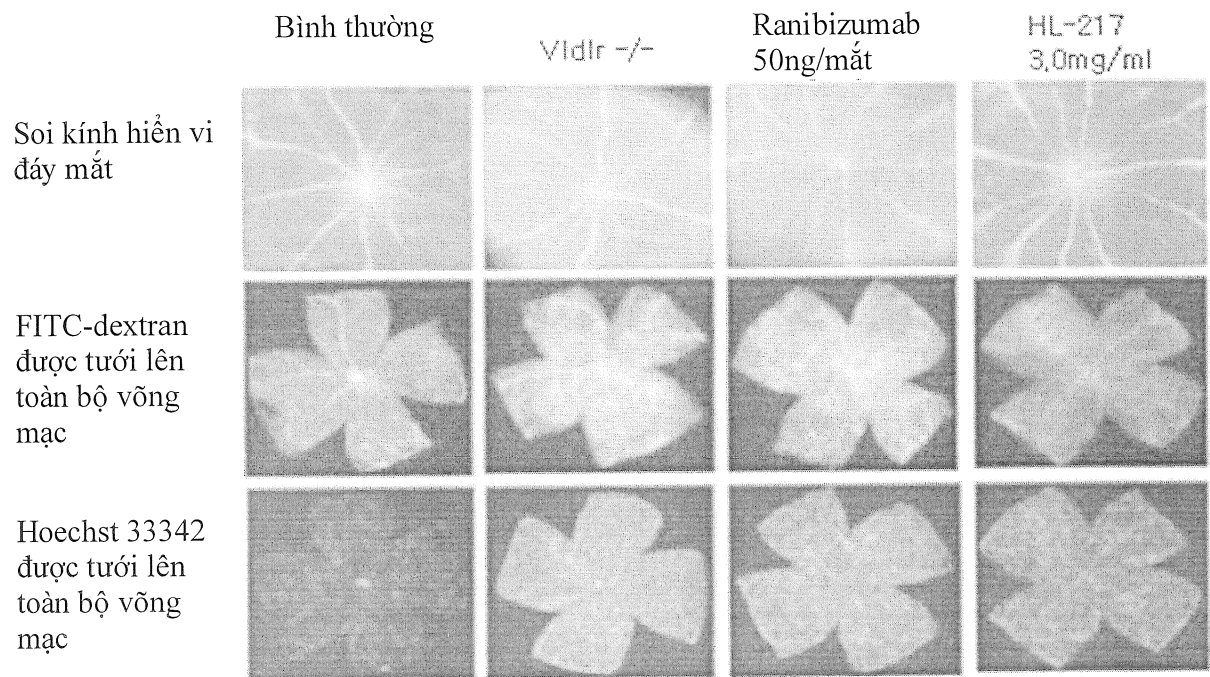


FIG. 2

